

## Tesis de Posgrado

# Receptores para antígenos convencionales en linfocitos T alorreactivos

Piazzon, M. Isabel

1982

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Piazzon, M. Isabel. (1982). Receptores para antígenos convencionales en linfocitos T alorreactivos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1731\\_Piazzon.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1731_Piazzon.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Piazzon, M. Isabel. "Receptores para antígenos convencionales en linfocitos T alorreactivos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1731\\_Piazzon.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1731_Piazzon.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

RECEPTORES PARA ANTIGENOS CONVENCIONALES EN  
LINFOCITOS T ALORREACTIVOS

Autor: M. Isabel PIAZZON

Director: Dra. Christiane DOSNE PASQUALINI

Lugar de trabajo:

Sección Leucemia Experimental  
Instituto de Investigaciones Hematológicas  
Academia Nacional de Medicina

Tesis presentada para optar al título de  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Buenos Aires 1982

1731

a Paula y a Guillermo

"Algunas veces he creído hasta seis cosas imposibles  
antes del desayuno"

Alicia a través del espejo

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo, realizado en la Sección Leucemia Experimental del Instituto de Investigaciones Hematológicas de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, ha sido posible gracias al apoyo de diferentes personas e instituciones a quienes deseo expresar mi agradecimiento.

A la Dra. Christiane Dosne de Pasqualini, Jefe de la Sección Leucemia Experimental y Directora de esta Tesis, a quien debo mi formación como investigadora, por habernos contagiado su inagotable entusiasmo, por habernos enseñado a pensar y a expresarnos libremente, por la creatividad con que encara cotidianamente su trabajo y por el afecto que ha volcado en todos los que trabajamos con ella.

Al Dr. Sol Libertario Rabasa, Asesor Científico de la Sección Leucemia Experimental, por sus críticas entusiastas y constructivas en el análisis de los resultados obtenidos.

A mis amigas y compañeras Marta Matusevich y Adriana Déroche con las que compartí diariamente no sólo mi trabajo sino también los momentos difíciles y las alegrías de estos últimos años. Para ellas, que han sabido contenerme con su afecto y su respeto, mi agradecimiento más profundo.

Al resto de mis colegas quienes me acompañaron y estimularon constantemente en mi trabajo.

A los Sres. Antonio Morales, Juan J. Portalluppi, Helvio Zandri y al resto del personal técnico y de apoyo, sin cuyo incansable esfuerzo y dedicación no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A la Srta. Mónica Adlassnig por su ayuda en la preparación de este manuscrito.

A la Dra. C. Barrera por haberme dado la emoción de su abrazo en aquella Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología.

A los restantes miembros de la Sociedad Argentina de Inmunología, por haber facilitado la discusión de estos trabajos.

A la Dra. Amada Segal, por haberme recibido tan cálidamente en su casa cuando estaba lejos de la mía.

A Laura, amiga desde los lejanos 16, quien soportó la lectura de este trabajo en las Cuatro Estaciones de este año.

A mis padres y hermano. A mi tía Tita. A mi familia grande...

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a FUNDALEU (Fundación contra la Leucemia), instituciones cuyo apoyo económico a través de las becas con que me distinguieron, hicieron posible este trabajo.

INTRODUCCION .....	1
I. Regulación de la respuesta inmune: conceptos generales .....	1
II. Antígenos de histocompatibilidad .....	13
1. Determinación genética del dis- tinto de los aloinjertos .....	15
2. Antígenos mayores y menores de histocompatibilidad .....	23
3. El complejo mayor de histocom- patibilidad .....	24
3.a. Organización genética .....	25
3.b. Expresión fenotípica .....	29
3.c. Polimorfismo .....	33
3.d. Funciones .....	34
4. Reacciones de histocompatibili- dad y polimorfismo alogeneico en los invertebrados .....	35
III. Linfocitos T alorreactivos .....	41
1. Participación de linfocitos T alorreactivos en el rechazo de injertos alogeneicos .....	44
2. Participación de linfocitos T alorreactivos en las reaccio- nes de injerto contra huésped .....	45
3. Reacciones de injerto contra huésped, autoinmunidad y lin- fomas .....	50
4. Técnicas experimentales para la inducción de reacciones de injerto contra huésped .....	53
4.a. Ensayo local de Ford y Simonsen .....	53
4.b. Ensayo de Simonsen para recién nacidos .....	57
4.c. Inducción de daño fetal por células T alorreac- tivas .....	59

5. Participación de linfocitos T alorreactivos en la preñez .....	60
5.a. Inmunología de la preñez .....	60
5.b. Linfocitos T alorreactivos maternos .....	65
5.c. Linfocitos T alorreactivos en la leche .....	67
6. Idiotipos en células T alorreactivas .....	69
IV. Linfocitos T reactivos a antígenos convencionales .....	72
1. Restricción de las funciones T por el complejo mayor de histocompatibilidad .....	72
1.a. Restricción de la citotoxicidad mediada por linfocitos T por el complejo mayor de histocompatibilidad .....	77
1.b. Restricción de otras funciones T por el complejo mayor de histocompatibilidad .....	78
2. Hipótesis del reconocimiento dual y de la modificación de lo propio .....	86
3. Rol del timo .....	87
V. Modelos de receptores T .....	93
1. Modelo de Jerne .....	94
2. Modelo de Janeway, Binz y Wigzell .....	97
3. Modelo de Williamson .....	105
4. Modelo de Bevan .....	113
5. Modelo de Benacerraf .....	114
6. Otros modelos .....	117
OBJETIVOS .....	119
ESQUEMAS EXPERIMENTALES .....	122

Inmunización con GRCo .....	122
1. Inmunización por vía i.p. con GRCo .....	122
2. Efecto de la inmunización con GRCo i.p. sobre los niveles de alorreac- tividad T esplénicos .....	122
3. Citotoxicidad complemento-dependien- te sobre ganglios poplíteos de rato- nes que sufren reacciones locales de injerto contra huésped .....	122
4. Efecto de un suero con actividad anti-idiotípica BALB/c anti-GRCo so- bre la alorreactividad T BALB/c anti- AKR .....	126
4.1. Obtención de suero BALB/c anti- GRCo .....	126
4.2. Purificación de anticuerpos BALB/c anti-GRCo .....	126
4.3. Obtención del suero con activi- dad anti-idiotípica BALB/c anti- GRCo .....	126
4.4. Detección de actividad anti- idiotípica BALB/c anti-GRCo .....	126
4.5. Efecto de dicho suero sobre la alorreactividad T BALB/c anti- AKR .....	126
5. Detección de anticuerpos anti-idiotí- picos BALB/c anti-AKR en ratones BALB/c inoculados con 10 a 12 dosis de GRCo por vía i.p. ....	126
5.1. Obtención de suero BALB/c anti- AKR .....	128
5.2. Obtención de suero C57Bl/6J anti- AKR .....	128
5.3. Obtención de suero BALB/c normal .....	128
5.4. Obtención de IgG BALB/c anti-AKR, IgG C57Bl/6J anti-AKR y de IgG BALB/c normal .....	128
5.5. Ensayos de hemoaglutinación indi- recta .....	128
6. Reacciones autoinmunes en ratones BALB/c inoculados con 10-12 dosis de GRCo i.p. ....	128



6.1. Ensayo local de Ford y Simonsen en ratones singeneicos adultos .....	128
6.2. Ensayo sistémico de Simonsen en ratones singeneicos recién naci <u>dos</u> .....	128
7. Incidencia de leucemias en ratones inoculados con 10-12 dosis de GRCo .....	132
7.1. Observación del porcentaje de leucemias espontáneas .....	132
7.2. Pasajes celulares y acelulares de las leucemias .....	132
Inmunización con GRC .....	132
8. Efecto de la inoculación de GRC por vía i.p. sobre la incidencia de daño fetal .....	132
9. Efecto de la inmunización intrauterina con GRC sobre los niveles alorreactivos T en los ganglios que drenan el útero y en el bazo .....	133
9.1. Inducción de pseudopreñez por ino- culación de progesterona .....	133
9.2. Inoculación intrauterina de GRC .....	133
9.3. Peso de los ganglios paraaórticos de los ratones inoculados con GRC por vía i.u. ....	133
9.4. Niveles de alorreactividad T en ganglios paraaórticos drenantes de cuernos uterinos inoculados con GRC .....	135
9.5. Niveles de alorreactividad T esplé- nica de ratones inoculados por vía i.u. con GRC .....	135
10. Incidencia de leucemias en ratones inocu- lados con GRC por vía i.p. ....	135
10.1. Observación del porcentaje de leuce- mias y período de latencia .....	135
10.2. Pasajes celulares y acelulares de las leucemias .....	135
MATERIALES Y METODOS .....	138
1. Animales .....	138

2. Sueros .....	138
2.1. Suero BALB/c anti-GRCo .....	138
2.2. Suero Swiss anti-GRCo .....	138
2.3. Suero BALB/c anti-AKR .....	139
2.4. Suero C57Bl/6J anti-AKR .....	139
2.5. Suero BALB/c normal .....	139
2.6. Suero F1(BALB/c x AKR)normal .....	140
2.7. Suero anti-idiotipo BALB/c anti-GRCo .....	140
2.7.a. Purificación de anti- cuerpos BALB/c anti-GRCo .....	140
2.7.b. Inoculación de anticuer- pos BALB/c anti-GRCo a ra- tones F1(BALB/c x AKR) .....	141
2.8. Titulación del suero BALB/c anti- GRCo: ensayo de hemoaglutinación directa .....	142
2.9. Titulación del suero Swiss anti- GRCo .....	142
2.10. Detección de actividad anti-idio- típica BALB/c anti-GRCo: ensayos de inhibición de la hemoaglutina- ción .....	143
2.11. Obtención de IgG BALB/c anti-AKR, IgG C57Bl/6J anti-AKR y de IgG BALB/c normal .....	143
2.12. Detección de anticuerpos anti-idio- típicos BALB/c anti-AKR: ensayos de hemoaglutinación indirecta .....	143
3. Inmunizaciones .....	144
3.1. Inmunización intraperitoneal con GRCo .....	144
3.2. Inmunización intraperitoneal con GRC .....	145
3.3. Inmunización intrauterina con GRC .....	145
4. Inducción del estado de pseudopreñez con progesterona .....	146
4.1. Inoculación de progesterona .....	146
4.2. Determinación de niveles de proges- terona en suero .....	146
5. Peso de los ganglios paraaórticos en ra- tones inmunizados por vía i.u. con GRC .....	147

6. Preparación de las suspensiones celulares .....	147
7. Reacciones de injerto contra huésped .....	148
7.1. Ensayo local de Ford y Simonsen .....	148
7.1.a. Niveles de alorreactividad T en ratones inmunizados con GRC por vía i.p. ....	148
7.1.b. Efecto de un suero con actividad anti-idiotípica BALB/c anti-GRCo sobre la alorreactividad T BALB/c anti-AKR .....	149
7.1.c. Niveles de alorreactividad T en bazo y ganglios drenantes del cuernos inmunizados con GRC .....	149
7.2. Citotoxicidad complemento dependiente en ganglios poplíteos de F1(BALB/c x AKR) inoculados con células esplénicas BALB/c en la almohadilla plantar .....	150
7.3. Ensayo de Simonsen en ratones recién nacidos .....	151
7.3.a. Niveles de alorreactividad T en ratones inmunizados con GRC por vía i.p. ....	151
7.3.b. Niveles de alorreactividad T en bazo y ganglios drenantes de cuernos uterinos inmunizados con GRC .....	151
8. Efecto de la inmunización intraperitoneal con GRCo en la inducción de daño fetal .....	152
9. Detección de reacciones autoinmunes en ratones BALB/c inmunizados con 10-12 dosis de GRCo por vía i.p. ....	153

9.1. Reacciones locales de injerto contra huésped en ratones adul <u>t</u> tos singeneicos .....	153
9.2. Ensayo de Simonsen para recién nacidos en ratones singeneicos .....	154
10. Incidencia de leucemias espontáneas en ratones inoculados a repetición con GRC o GRCo por vía i.p. ....	154
11. Pasajes de leucemias espontáneas en rato <u>n</u> nes singeneicos .....	155
11.1. Pasajes celulares .....	155
11.2. Pasajes acelulares .....	155
RESULTADOS .....	156
1. Efecto de la inmunización con glóbulos ro <u>j</u> jos de conejo por vía i.p. sobre la alo- rreactividad T esplénica .....	156
1.1. En combinaciones que involucran dife <u>r</u> rencias a nivel de antígenos mayores de histocompatibilidad .....	156
1.1.a. Niveles alorreactivos T esplé <u>n</u> nicos medidos mediante reaccio <u>n</u> es de GVH en híbridos F1(BALB/c x AKR) adultos .....	156
1.1.b. Niveles alorreactivos T esplé- nicos medidos mediante reaccio <u>n</u> es de GVH en ratones de la ce <u>l</u> pa Swiss recién nacidos .....	160
1.2. En combinaciones que no involucran di <u>f</u> ferencias a nivel de antígenos mayo <u>r</u> es de histocompatibilidad.....	160
1.2.a. Niveles alorreactivos T esplé- nicos medidos mediante reaccio <u>n</u> es de injerto contra huésped en híbridos F1(BALB/c x C57Bl/ Ks) adultos .....	163
1.2.b. Niveles alorreactivos T esplé- nicos medidos mediante reaccio <u>n</u> es de GVH en híbridos F1(BALB/c x DBA/2) adultos y recién nacidos ...	163
2. Citotoxicidad complemento dependiente sobre ganglios poplíteos de ratones BALB/c que su <u>n</u> fren reacciones de GVH locales .....	165

3. Determinación de actividad anti-idiotípica BALB/c anti-GRCo en el suero F1 (BALB/c x AKR) .....	170
4. Efecto de un suero con actividad anti-idiotípica BALB/c anti-GRCo sobre la alorreactividad T BALB/c anti-AKR .....	170
5. Efecto de la inoculación con GRC por vía i.p. sobre la incidencia de daño fetal .....	175
5.1. Cruzamientos BALB/c x BALB/c .....	175
5.2. Cruzamientos BALB/c x Swiss .....	177
5.3. Cruzamientos BALB/c x DBA/2 .....	179
5.4. Cruzamientos Swiss x Swiss .....	179
5.5. Cruzamientos Swiss x AKR .....	179
6. Peso de ganglios paraaórticos de los ratones inoculados con GRC por vía i.u. ....	182
7. Efecto de la inmunización intrauterina con GRC sobre los niveles alorreactivos T en bazo y ganglios que drenan el útero .....	186
7.1. Niveles de alorreactividad en ganglios paraaórticos .....	186
7.1.a. Alorreactividad T BALB/c anti-Swiss .....	186
7.1.b. Alorreactividad T BALB/c anti-AKR .....	188
7.2. Niveles de alorreactividad en bazo .....	190
7.2.a. Alorreactividad T BALB/c anti-Swiss .....	190
7.2.b. Alorreactividad T BALB/c anti-AKR .....	190
8. Detección de anticuerpos anti-idiotípicos BALB/c anti-AKR en ratones inmunizados con 10-12 dosis de GRCo por vía i.p. ....	190
9. Detección de reacciones autoinmunes en ratones inmunizados con 10-12 dosis de GRCo .....	193
9.1. Reacciones de injerto contra huésped en ratones singeneicos adultos .....	193

9.2. Reacciones de injerto contra huésped en ratones singeneicos recién nacidos .....	196
10. Incidencia de leucemias en ratones BALB/c inmunizados con 8 a 12 dosis de GRC o GRCo por vía i.p. ....	196
DISCUSION .....	200
RESUMEN .....	227
BIBLIOGRAFIA .....	230
GLOSARIO, SINONIMIA Y ABREVIATURAS .....	255

I N T R O D U C C I O N

## I. REGULACION DE LA RESPUESTA INMUNE: CONCEPTOS GENERALES.

Los vertebrados poseen un sistema inmunológico altamente complejo que les permite defenderse de las infecciones. Su respuesta inmune se encuentra regulada de manera precisa. Los mecanismos de regulación actuantes determinan si existirá o no respuesta al antígeno, cuál será la magnitud de la misma, qué clase de anticuerpos se producirán y qué subpoblaciones de células serán inducidas a activarse. Obviamente, la regulación del sistema es necesaria para impedir una respuesta a cada antígeno que asuma las proporciones de un gamopatía policlonal o de un síndrome linfoproliferativo.

### Linfocitos T

Uno de los niveles más importantes de regulación del sistema inmune está dado por la actividad de células denominadas linfocitos T (112, 191).

La mayoría de los antígenos inducen la activación de una compleja red de linfocitos T funcionalmente diferentes (18, 88, 109, 167, 214), que regulan la actividad de las células B (88, 151, 167) -productoras de anticuerpos- y la de ellos mismos. Diferentes subpoblaciones de células T intervienen en la respuesta:

Los linfocitos T citotóxicos (Tc) (88) destru-



yen células que poseen en su superficie determinantes antigénicos diferentes a los del propio organismo, por ejemplo, células infectadas por un virus (células que expresan determinantes antigénicos codificados por el genoma viral) o células de tejidos extraños. Estas células Tc serían, también, capaces de destruir células tumorales (185). Para que pueda lograrse un nivel de citotoxicidad adecuado, es necesario que otra subpoblación T interactúe con los linfocitos Tc. A estas células T se las denomina linfocitos T colaboradores o helper (Th) y determinan los niveles de citotoxicidad (88, 167). Existen también, linfocitos T colaboradores que interactúan con las células B para que éstas puedan producir anticuerpos. Los linfocitos T denominados supresores (Ts) (44, 85, 108, 109, 118, 225), suprimen la respuesta inmune, actuando, generalmente, a través de los T colaboradores.

En algunas especies animales, estas subpoblaciones de células T poseen en su superficie, aloantígenos que permiten distinguirlas una de otras (109).

Existe también otra forma clásica de subdividir a las células T: linfocitos T denominados alorreactivos y linfocitos T denominados reactivos a antígenos convencionales. Los linfocitos T alorreactivos responden a los antígenos denominados antígenos mayores de histocompatibilidad extraños -dentro de la especie- y los linfocitos T reactivos a antígenos convencionales

son aquellos que reaccionan frente al resto del universo antigénico.

### Reconocimiento de antígenos propios

A principios de siglo se estableció que el concepto de inmunidad significaba el rechazo de lo extraño, o no propio, y al mismo tiempo la falta de respuesta frente a lo propio, lo que se denominó el "horror autotoxicus". Más adelante, esta definición pasó a integrar uno de los dogmas más importantes de la inmunología cuando Burnet propuso la teoría de la vigilancia inmunológica (171) en la cual se involucraba a los linfocitos T en la destrucción de toda célula que tuviera en su superficie antígenos extraños al individuo, por ejemplo, las células tumorales nacientes. Más adelante, si bien esta teoría fue cuestionada en algunos aspectos, siguió prevalenciando como función primordial del sistema inmune, el concepto de rechazo de todo lo no propio, sea ésto una bacteria, un virus, una célula neoplásica, un tejido o un órgano ajeno.

Recientemente, se ha puesto de manifiesto una característica esencial de modo de operación de los mecanismos inmunorregulatorios: el sistema inmune está preparado para reconocer antígenos que son propios del organismo (32, 232, 242). Así, el concepto de autoinmunidad ha sufrido cambios grandes ya que anteriormente, se pensaba que no existía reconocimiento de determinantes anti

génicos propios durante la madurez inmunológica y que cuando este reconocimiento existía, se desencadenaban enfermedades autoinmunes (226). Actualmente, algunos investigadores consideran que el deficiente reconocimiento de los antígenos propios -por ejemplo, el de los antígenos mayores de histocompatibilidad propios- constituiría el factor común más importante en los desórdenes autoinmunes experimentales y naturales en animales y seres humanos (226, 243, 244).

Uno de los mecanismos de regulación de la respuesta inmune descubierto recientemente, implica el reconocimiento de antígenos propios presentes en las moléculas de anticuerpos. Este reconocimiento induce al desencadenamiento de reacciones inmunes contra dichos determinantes antigénicos propios presentes en las inmunoglobulinas. Se producen así, reacciones inmunes en cadena que contribuyen a lograr respuestas equilibradas. Este tipo de reconocimiento de antígenos propios suele denominarse red de idiotipos-anti-idiotipos (232).

Se denomina idiotipo al conjunto de ciertos determinantes antigénicos presentes generalmente, en la región hipervariable de las inmunoglobulinas (46,49).

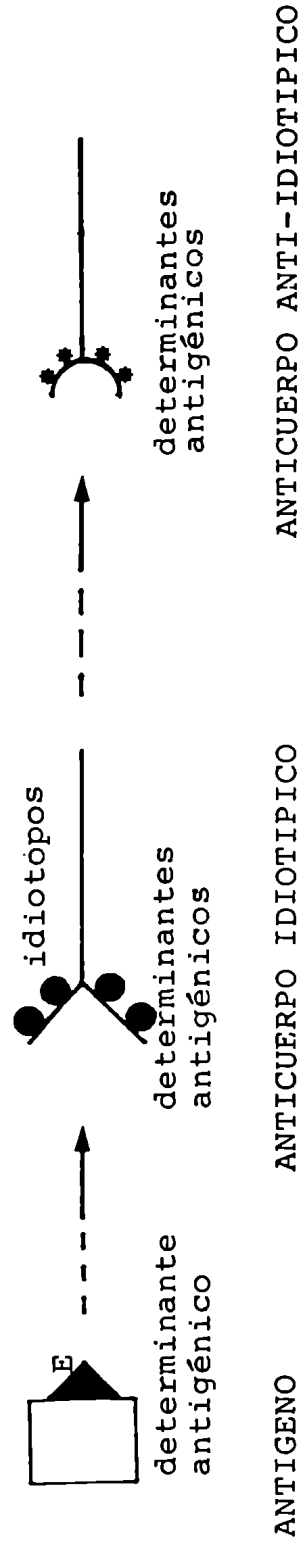
El idiotipo de las inmunoglobulinas resulta antigénico para el propio individuo que las produce, esto es, resulta auto-antigénico y se fabricarán anticuerpos contra él. A estos anti-anticuerpos se los denomina anticuerpos anti-idiotípicos (105).Cada uno de los

determinantes antigénicos que constituyen el idiotipo de una inmunoglobulina se denomina idiotipo (Figura 1) (197). Existen idiotipos ubicados dentro de la cavidad del sitio de combinación de la molécula de anticuerpo e idiotipos que se encuentran por fuera de dicha cavidad. Suele hablarse también, de tres tipos de idiotipos: los ubicados sobre la cadena liviana de las inmunoglobulinas, los de cadena pesada y los de combinación -estos últimos, están determinados por ciertas secuencias de aminoácidos expuestas por la disposición espacial que adoptan ambas cadenas-. El mismo idiotipo puede estar asociado con más de una clase de anticuerpos (IgG, IgM, etc.) (39).

El idiotipo de la molécula de inmunoglobulina es propio para cada individuo de la población. La definición original de idiotipo fue la siguiente (51): "son las especificidades antigénicas de los anticuerpos producidos por un individuo en su respuesta a determinados epitopos" (determinantes antigénicos externos). Esto implica que las regiones variables de las inmunoglobulinas son únicas para cada individuo. Así, si se inmuniza a dos individuos con un mismo epitopo, ambos fabricarán anticuerpos que reaccionarán con dicho epitopo pero, sus inmunoglobulinas presentarán determinantes idiotípicos diferentes (Figura 2). Incluso, un mismo individuo en una segunda inmunización fabrica anticuerpos con idiotipos diferentes a aquellos presentes en la respuesta primaria.

Las células B poseen como receptor para el antígeno, moléculas de la misma inmunoglobulina que van a producir una vez transformadas en células plasmáticas.

Figura 1

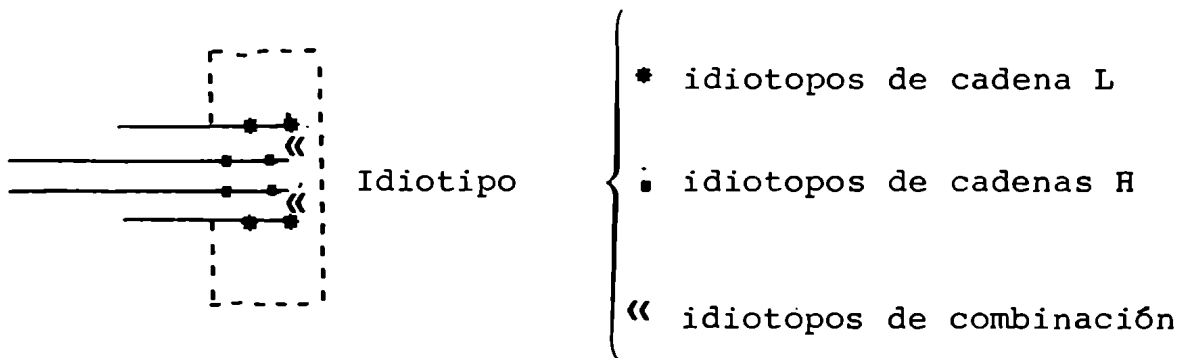


La figura esquematiza a un antígeno con su epitopo (E) que induce la formación de anticuerpos contra E, los que poseen a su vez determinantes antigénicos (idiotopos) que darán lugar a la aparición de anticuerpos anti-idiotípicos.

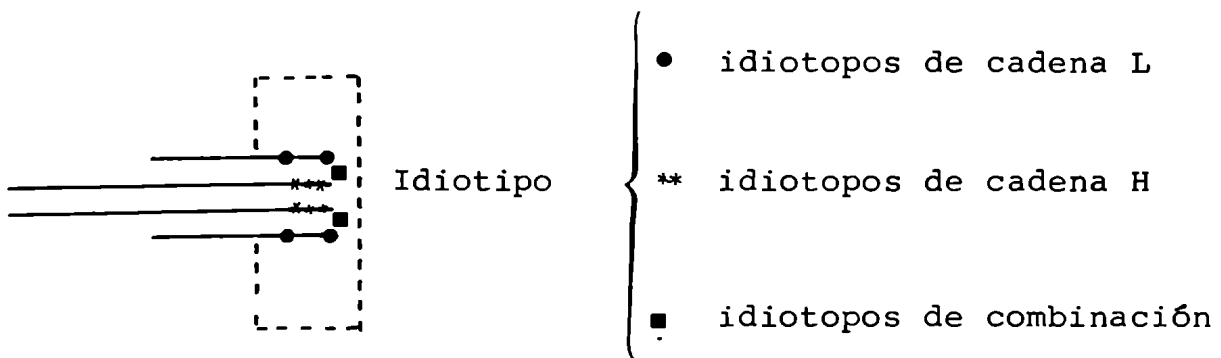
Figura 2

Para un mismo determinante antigénico:

Individuo A



Individuo B



Los idiotipos son propios de los individuos. En la figura se esquematiza la respuesta de dos individuos de una población a un mismo epitopo. Ambos producen anticuerpos que reaccionan con el epitopo pero estos anticuerpos poseen idiotipos diferentes y en consecuencia ambos inducirán la aparición de anticuerpos anti-idiotípicos distintos. Se señalan además, los idiotopos de cadena liviana (L), los de cadena pesada (H) y los de combinación.

En consecuencia, dicho receptor tiene el mismo idiotipo que el anticuerpo (70).

El receptor de los linfocitos T (141) no es una inmunoglobulina. Su estructura aún no ha podido ser caracterizada. Sin embargo, se sabe que el receptor T comparte con los anticuerpos y con los receptores B algunos determinantes idiotípicos (29, 30, 37). La mayoría de los autores sostiene que sólo se comparten los codificados por los genes de la región VH de las inmunoglobulinas (que codifican para la parte variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina) (50, 69, 70, 84, 142, 188). Unos pocos afirman que también se compartirían algunos presentes en la región variable de la cadena liviana (51).

La red de idiotipos-anti-idiotipos (39, 94, 103, 110, 114) -o red de Jerne (115)- tendría gran importancia en la regulación de la respuesta inmune (69, 70, 71).

La teoría de la red afirma, en su concepción general, que cuando penetra un epitopo al organismo se genera una respuesta inmune contra él, o sea se estimulan clones de células B precomisionadas para responder al determinante antigénico y células T que regularán el nivel de la respuesta y -en algunos casos- actuarán directamente contra él (por ejemplo, actuando como células citotóxicas efectoras). Los determinantes idiotípicos presentes en los anticuerpos y en los receptores de las células B y T activadas, activarán a su vez a otros clones de célu-

las B que fabricarán anticuerpos anti-idiotípicos (195). El papel biológico de los anticuerpos anti-idiotípicos -si bien no está perfectamente determinado parecería ser relevante para la regulación de la respuesta inmune (49, 122, 168, 169, 214): pueden interactuar con los anticuerpos idiotípicos neutralizándolos, estimular o suprimir a los clones B que posean los receptores idiotípicos y también interaccionar con las células T (27) cuyo receptor presente idiotipos similares.

Se ha demostrado también la presencia de clones de células T anti-idiotípicas (38, 40, 72, 170), las que por lo general, muestran actividad supresora aunque se ha demostrado in vitro que también poseen actividad estimuladora. En las Figuras 3 y 4 se esquematizan algunas de las interacciones citadas.

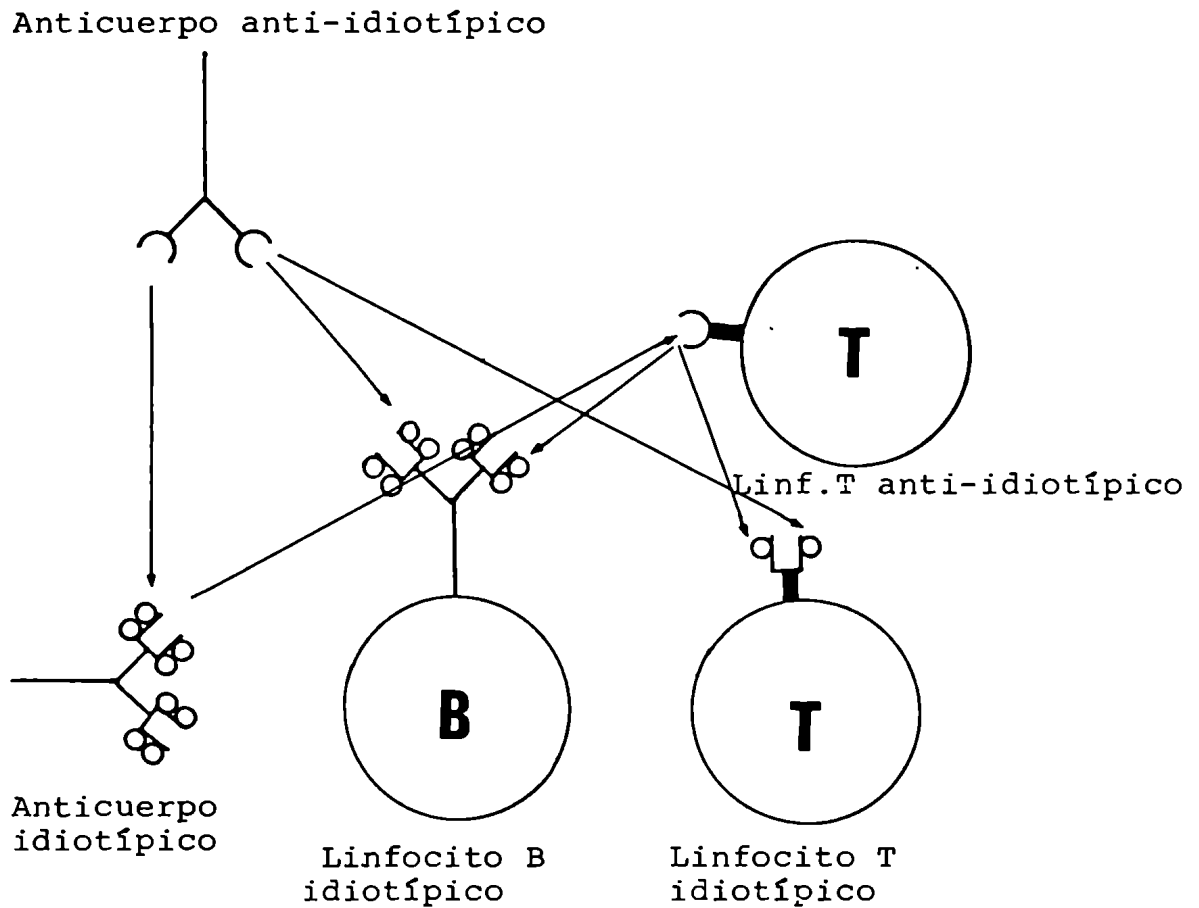
Los anticuerpos anti-idiotípicos presentan a su vez, determinantes idiotípicos propios y en consecuencia, generan anticuerpos anti-(anti-idiotípicos). Se produciría así, una especie de cascada de anticuerpos en la que cada uno de los niveles intervendría en la regulación de los otros.

Existe otro tipo de reconocimiento de antígenos propios, reconocimiento que resulta imprescindible para que el sistema inmune funcione adecuadamente.

La superficie de prácticamente todas las células

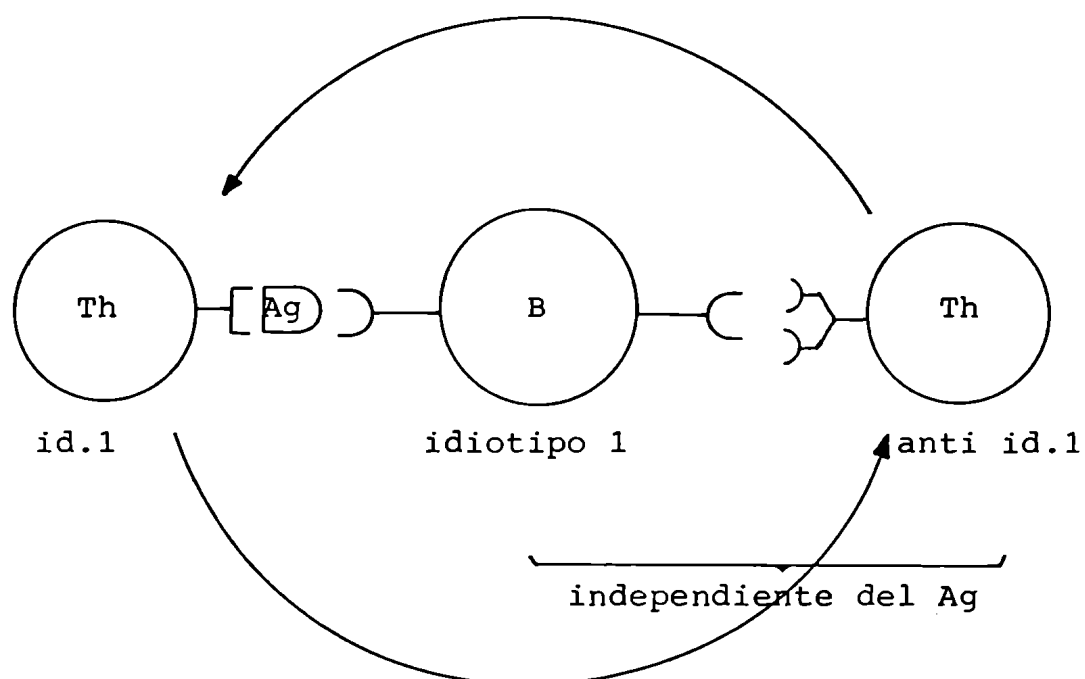


Figura 3



En la figura se esquematizan algunas de las interacciones posibles de los anticuerpos anti-idiotípicos y de las células T anti-idiotípicas con anticuerpos y receptores celulares B y T idiotípicos.

Figura 4



La figura representa algunas de las interacciones celulares entre células idiotípicas y antiidiotípicas. La célula Th antiidiotípica (anti id.1) reconoce al receptor idiotípico (id.1) de la célula B y también al de la célula Th idiotípica (id.1). Ambas células Th se estimulan mutuamente. El esquema descrito ha sido mostrado experimentalmente.

nucleadas del organismo expresa antígenos que se denominan antígenos mayores de histocompatibilidad. Cada individuo de la población expresa una serie de antígenos mayores de histocompatibilidad que le son propios (139)

Para que los linfocitos T de un organismo puedan interactuar tanto con los linfocitos B como con otras células, deben reconocer en la superficie de estas células antígenos mayores de histocompatibilidad propios. Este fenómeno se denomina restricción de las funciones T por el complejo mayor de histocompatibilidad (194) y será desarrollado extensivamente a lo largo de este trabajo.

Estos hechos permitieron tener una visión diferente del sistema inmune: éste no sólo está capacitado para reconocer aquello que le resulta extraño, sino que en realidad para poder defender al organismo de las agresiones externas, debe poder reconocer lo propio en forma adecuada. Por otra parte, los mamíferos han desarrollado la capacidad de aceptar lo no propio: desde el punto de vista de la inmunobiología, el feto puede ser considerado un injerto alógeneico (11, 12). La madre reconoce a dicho injerto (10) y a pesar de poseer grandes poblaciones de linfocitos T capaces de reaccionar contra los antígenos de histocompatibilidad del feto diferentes de los propios, lo acepta durante largo tiempo sin rechazarlo.

Hemos dicho ya que los linfocitos T suelen dividirse en dos grandes grupos: aquellos que reconocen a los

antígenos mayores de histocompatibilidad extraños y aquellos que reconocen al resto de los antígenos. Estos últimos, para funcionar adecuadamente, deben reconocer además a los antígenos mayores de histocompatibilidad propios. Clásicamente, se las ha considerado poblaciones celulares independientes.

A lo largo de este trabajo se estudiará cuál es la relación que existe entre ambas poblaciones. Pregunta que tal vez puede expresarse como: ¿cuál es la relación existente entre el reconocimiento de los antígenos mayores de histocompatibilidad propios y extraños y de qué manera interviene esta relación en los mecanismos de regulación de la respuesta inmune?.

## II. ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Durante mucho tiempo se ha esperado el día en que fuera posible reemplazar tejidos u órganos dañados por injertos provenientes de otros seres humanos. El transplante de células, tejidos u órganos entraña dos tipos diferentes de inconvenientes: el primero de ellos, lo representa el acto mismo del transplante; el segundo, mucho más grave por cierto, se refiere a la incompatibilidad de los aloinjertos (injertos transplantados de un individuo a otro de la misma especie).

Los injertos del mismo receptor, denominados autoinjertos, o bien los injertos provenientes de hermanos geme

los o de miembros de una cepa endocriada (de igual constitución genética), por lo general, resultan permanentemente exitosos. Por el contrario, los injertos alogeneicos son normalmente rechazados. Los autoinjertos de piel, si bien pasan por una etapa de cambios reparatorios menores, reasumen su condición original con un alto grado de perfección. Los aloinjertos de piel adquieren una buena irrigación sanguínea y se comportan en un principio como autoinjertos. Sin embargo, pronto son infiltrados por gran cantidad de leucocitos, predominantemente linfocitos e histiocitos; se observa el cese del flujo sanguíneo, desintegración y separación de la epidermis entera y muerte de la población celular injertada. Usualmente, la reacción se completa en dos semanas. Los aloinjertos de otros tejidos sólidos, normales o malignos, o de órganos que establecen conexiones vasculares con su huésped por sí mismos o por anastomosis vascular quirúrgica, sufren un destino similar.

Los aloinjertos que contienen un número significativo de células T inmunológicamente competentes, montan reacciones citotóxicas contra el huésped denominadas reacciones de injerto contra huésped (GVH) (76, 92). Esto ocurre principalmente en los trasplantes de médula ósea (178) en los que, a causa de la inmunosupresión que sufre el paciente, resultan a menudo fatales (58, 59, 66, 229, 249).

La destrucción de los aloinjertos es uno de los fenómenos inmunológicos más reproducibles y se manifiesta en todos los vertebrados examinados e incluso en algunos invertebrados (42, 104).

La inmunología de transplante es sin embargo, rica en excepciones. Una de ellas resulta la presencia de fetos en los mamíferos de cría libre. La relación materno-fetal representa uno de los enigmas más fascinantes de la inmunobiología de transplante.

Desde el comienzo de este siglo, oncólogos, embriólogos, genetistas, endocrinólogos e inmunólogos han utilizado los transplantes como poderosa herramienta analítica para el estudio de numerosos problemas biomédicos. Los procedimientos de transplante han jugado sin duda, un rol indiscutible en la elucidación de diversas incógnitas inmunológicas. La experimentación en este campo ha permitido conocer -entre otras- el significado funcional del timo, el de la bursa de Fabricius, la bioquímica de los antígenos involucrados en las reacciones a aloinjertos, el fenómeno de la restricción de las funciones T por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y el papel que actualmente se atribuye al timo en la maduración del sistema inmune.

## II. 1. DETERMINACION GENETICA DEL DESTINO DE LOS ALOINJERTOS.

Los antígenos responsables del desencadenamiento de las reacciones de rechazo de los injertos alogeneicos, se encuentran determinados genéticamente. En el año 1903, Jensen descubrió que los tumores espontáneos podían a veces, ser propagados de ratón en ratón al injertarles células

las tumorales viables. Observó que no todos los ratones eran igualmente susceptibles al crecimiento de dichos tu mores y hablaba de "inmunidad activa" en los animales más refractarios al trasplante tumoral. El estudio del trans plante de tumores pronto llevó a la observación de que la regresión de los tumores transplantados se debía a alguna clase de rechazo activo del injerto por parte del huésped. Se reconoció que los tumores diferían unos de otros en su facilidad de trasplante y que la "raza" de los animales en los que el tumor era transplantado influía en la toma o en el rechazo del injerto. En esa época los animales considerados de la misma "raza" no tenían mucho más en común que el color, el origen geográfico o el pedigree de familia, de modo que si bien pudieron realizarse algunas observaciones, la carencia de animales genéticamente uniformes dificultaba la comprensión del problema abordado.

El desarrollo de cepas endocriadas fue iniciado por Little y otros genetistas (65, 221, 222). Se lograron progenies endogámicas a partir de varios lotes de ra tones. El apareamiento se realizaba por cruzamiento her mano-hermana. Luego de 15-20 generaciones, se logró un alto grado de uniformidad genética en todos los animales de cada línea. Estos ratones reaccionaban como gemelos idénticos y mostraban igual susceptibilidad o igual resis tencia a la implantación de ciertos tumores. En la Tabla 1 se muestran algunas de las cepas endocriadas de ratones utilizadas más habitualmente (220). Hacia 1902-1903, se había demostrado que tumores originados en una cepa de ra tones parcialmente endocriados, casi siempre crecían pro-

Tabla 1: CEPAS ENDOCRIADAS DE RATONES FRECUENTEMENTE UTILIZADAS EN INVESTIGACIONES INMUNOLOGICAS Y ONCOLOGICAS (154a, 220).

Cepa	Color	Características	H-2	Desarrollada por
AKR/J	albino	Muy alta incidencia de leucemia espontánea (85%) a los 6-8 meses de edad.	k	Furth, 1928-36
BALB/c	albino	Baja incidencia de tumor mamario (2%). Pocos tumores de ovario y adrenales en animales viejos. Algunos tumores de pulmón. Incidencia de leucemia, 15%.	d	Bagg, 1913
CBA/CaJ	agouti	Alta incidencia de tumor mamario. Algunos hepatomas.	k	Strong, 1920
C3H/HeJ	agouti	Muy alta incidencia de tumores mamarios en hembras apareadas (90%), menor en vírgenes. Hepatomas en machos. Incidencia de leucemia, 1%.	k	Strong, 1920
C57B1/6J	negro	Incidencia de tumor mamario, 1% en apareadas y 0% en vírgenes. Baja incidencia de otro tipo de tumores.	b	Little, 1921
C57B1/10J	negro	Baja incidencia tumoral. Resistente a algunos tumores de C57B1/6J.	b	Little, 1921
C57/Ks	negro	A diferencia de otras cepas de C57B1 posee el H-2 <sup>d</sup> en lugar del H-2 <sup>b</sup> .	d	Biesele, 1947 Kaliss, 1948
C58/J	negro	Muy alta incidencia de leucemia (85%) antes del año de edad	k	MacDowell, 1921
DBA/1	marrón claro (gray)	Tumor mamario en 75% de hembras apareadas luego del año de edad y en algunas vírgenes alrededor de los 18 meses. Resistente a la mayoría de los tumores transplantables de DBA/2.	q	Little, 1909
DBA/2	marrón claro (gray)	Algunos tumores mamarios en viejas hembras apareadas. Resistente a tumores transplantables de DBA/1. Aproximadamente 30% de las hembras hacen leucemias espontáneas.	d	Little, 1909

Nota: Los porcentajes de tumores indicados son aproximados. Los datos pueden variar según los diferentes laboratorios, particularmente en algunas subcepas.



gresivamente si el tumor era transplantado en esa misma línea de ratones pero no crecían cuando se los transplantaba en un stock de animales no relacionados. Tyzzer en 1909, encontró que los híbridos de la primera generación (F1) producidos por apareamiento de esta línea de ratones con ratones del stock resistente, eran siempre susceptibles al crecimiento del tumor, lo cual sugería que los factores responsables del crecimiento tumoral estaban determinados por genes que se expresaban en condición heterocigota. Los ratones derivados de la intercrusa de los F1 (generación F2) eran resistentes al crecimiento tumoral. Estos resultados eran difíciles de interpretar en esa época y no parecía corresponder a una explicación simple de herencia basada en la teoría de Mendel. El hecho de que todos los F1 fueran susceptibles sugería la presencia de un carácter dominante. Sin embargo, de acuerdo a las leyes de Mendel, si la susceptibilidad al crecimiento tumoral dependía de la expresión de un solo gen dominante, las 3/4 partes de los F2 hubieran debido ser susceptibles.

El problema fue resuelto en 1914, por Little quien postuló que la aceptación del injerto tumoral dependía de un gran número de "factores de susceptibilidad" compartidos por el tejido tumoral y los tejidos del huésped y que cada uno de ellos, estaba codificado por genes independientes. La aceptación de tumores originados en ambas cepas parentales por parte de los híbridos F1, se debía a que estos híbridos heredaban un set completo de cromosomas de cada padre, incluyendo todos los "genes de susceptibilidad" o genes de histocompatibilidad como se

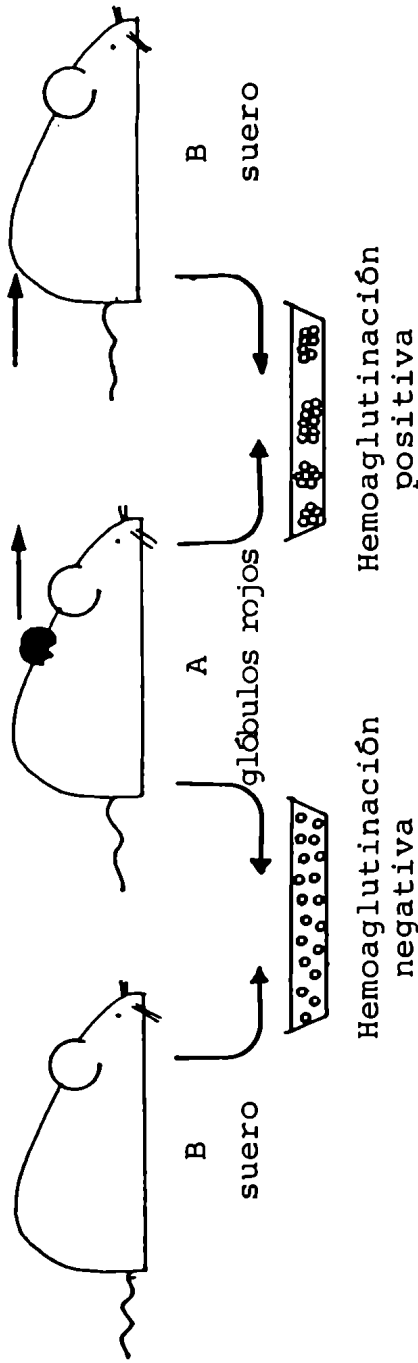
los denomina actualmente. Los F2 eran genéticamente heterogéneos. Observando el número de ratones F2 susceptibles a la toma del tumor se realizaron los primeros cálculos del número de genes de histocompatibilidad, suponiendo que estos genes no estuvieran ligados.

En 1938, Gorer (131, 216) demostró serológicamente la existencia de variación antigénica en los glóbulos rojos de ratones de distintas cepas y que existía un antígeno, al que denominó "antígeno 2", común a los glóbulos rojos, células de tejidos normales y células tumorales de una cepa particular de ratones.

Los animales que no expresaban este antígeno en la superficie de sus tejidos (ahora sabemos que expresaban otros) cuando eran inoculados con injertos de tumor de un dador que sí expresaba este antígeno 2, rechazaban sistemáticamente dicho injerto (Figura 5). Estos hallazgos mostraban la existencia de antígenos responsables del rechazo de injertos no sólo en células tumorales sino también en células normales. De esta manera, Gorer reformuló la teoría genética de Little en términos inmunológicos (25): "Los tejidos normales y neoplásicos contienen factores isoantigénicos que están determinados genéticamente". "Estos factores isoantigénicos presentes en el tejido injertado y ausentes en el huésped, son capaces de desencadenar una respuesta que determina la destrucción del injerto ..."

Los hallazgos de Gorer, si bien desilusionaron a quienes investigaban el problema del crecimiento

Figura 5: EXPERIMENTO DE GORER QUE LLEVO AL DESCUBRIMIENTO DEL H-2



El esquema (131) ilustra la experiencia que permitió a Gorer concluir que el antígeno de grupo sanguíneo número 2 del ratón dependía de un gen que controlaba el crecimiento o rechazo de trasplantes de tumores. En el ratón A se desarrolla un tumor. Dicho tumor es rechazado por el ratón B. El suero del ratón B que rechazó el tumor del ratón A es capaz de aglutinar los glóbulos rojos del ratón A: o sea, que los anticuerpos anti-tumor A, reconocen sobre los glóbulos rojos A el antígeno que posee también dicho tumor. Gorer llamó antígeno 2 a este antígeno. El suero de un ratón B con tumor (al que no se trasplantó el tumor A, no aglutina los glóbulos rojos A). Así, este antígeno 2 fue reconocido como un antígeno que controlaba no sólo el rechazo de tumores sino también, el rechazo de injertos de tejidos normales. Por esto, se lo rebautizó antígeno de histocompatibilidad o antígeno H-2.

tumoral, abrieron un campo de enorme e insospechada importancia en el desarrollo de los conocimientos inmunológicos.

Estudios realizados posteriormente permitieron enunciar los principios generales de la inmunogenética de transplante (25, 88, 151).

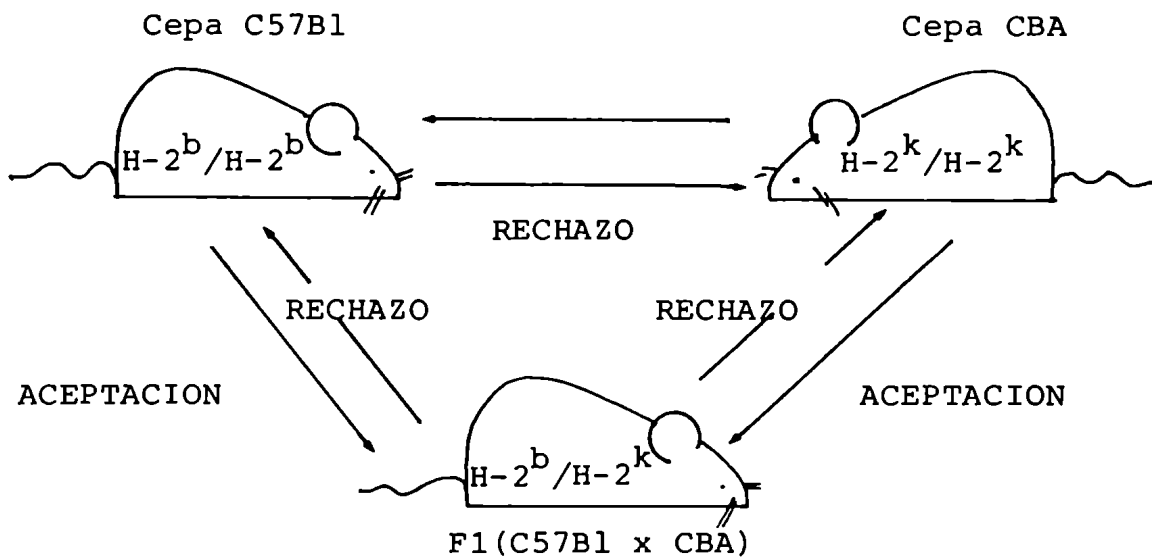
1. La aceptación o rechazo de un injerto está determinada por la presencia o ausencia en las células injertadas de antígenos extraños al huésped. La presencia de estos antígenos está determinada genéticamente. Se los denomina antígenos de transplante o de histocompatibilidad y a los genes que codifican para ellos, genes de histocompatibilidad. Cada gen puede poseer una serie de alelos en la población.

2. Los alelos de histocompatibilidad son codominantes: sus productos son demostrables en el heterocigota.

3. Los injertos paternos -dentro de cepas endocriadas- son aceptados en sus híbridos F1 ya que el F1 posee todos los antígenos de ambas cepas parentales.

4. Los injertos de tejido de híbridos F1 a sus padres se rechazan, ya que éstos no poseen uno de los sets de antígenos de histocompatibilidad: aquellos característicos de la otra cepa. En la Figura 6 se presenta un esquema que ilustra los conceptos.

Figura 6



Destino de aloinjertos de piel realizados entre ratones de dos cepas distintas: C57B1 y CBA, y su híbrido F1. Aunque sólo se indican los genotipos H-2 de las dos cepas, debe recordarse que ellas difieren en múltiples loci de histocompatibilidad. Puesto que los alelos de histocompatibilidad son codominantes, el híbrido F1 posee todos los antígenos de transplante presentes en ambas cepas parentales. Sólo se aceptan los aloinjertos que no posean antígenos de histocompatibilidad que no estén presentes en el huésped (25)

## II. 2. ANTIGENOS MAYORES Y MENORES DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

Los tejidos normales y neoplásicos presentan antígenos de histocompatibilidad expresados en la superficie de sus células. Cuando se realiza un transplante alogeneico, estos antígenos son reconocidos por los linfocitos del huésped, como extraños y las células o tejidos transplantados son rechazados.

Existen dos clases de antígenos de histocompatibilidad: los antígenos de histocompatibilidad mayores o fuertes y los antígenos de histocompatibilidad menores o débiles (79, 138, 233). Ambos desencadenan en el huésped reacciones inmunes: los antígenos mayores de histocompatibilidad extraños inducen un rechazo rápido del injerto, los menores un rechazo más lento (25).

Los antígenos mayores de histocompatibilidad están codificados por un complejo génico en el cual los genes se encuentran ligados. Los antígenos menores no parecen estar codificados por complejos génicos; los genes que los codifican suelen estar ubicados en diferentes lugares del genoma. En el ratón existen por lo menos treinta antígenos menores de histocompatibilidad localizados en diferentes cromosomas (131).

A lo largo de este trabajo denominaremos células T alorreactivas a aquellas que reconocen a los antígenos mayores de histocompatibilidad extraños y excluirémos de esta denominación a las que reconocen a los diferentes an-

tígenos menores extraños.

Los antígenos mayores de histocompatibilidad poseen una función que trasciende largamente a la de provocar el rechazo de tejidos u órganos alogeneicos. Su presencia en la superficie celular resulta de fundamental importancia en la regulación de la respuesta inmune. Describiremos entonces dichos antígenos mayores de histocompatibilidad y el complejo génico que los codifica.

### II. 3. EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

A partir del descubrimiento de Gorer de las moléculas que recibieron el nombre de antígenos de histocompatibilidad, varios investigadores observaron su presencia en muchos otros vertebrados (36, 138, 184, 189, 212, 213, 251), incluyendo al ser humano (53, 56, 57, 151, 202).

Estos antígenos podían ser reconocidos de dos modos: se podían fabricar antisueros contra ellos para estudiarlos serológicamente y además, las células y tejidos que los poseían eran destruidos o rechazados cuando se introducían en individuos cuyos correspondientes antígenos no eran exactamente los mismos. Gorer, Lyman y Snell (131, 216), trabajando en ratones, denominaron al gen que codificaba para estos antígenos gen H-2. Estudios posteriores demostraron que el H-2 consistía en una serie de genes y lo denominaron entonces complejo mayor de histocompatibilidad o complejo H-2.

Originalmente, el interés de los inmunólogos por

el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) se centraba exclusivamente en el obstáculo que su presencia ofrecía para el transplante de órganos o tejidos. Sin embargo, los estudios que se realizaron, pronto hicieron evidente la importancia del CMH en la respuesta inmune frente al resto del universo antigénico.

### II. 3.a. Organización genética del complejo mayor de histocompatibilidad del ratón.

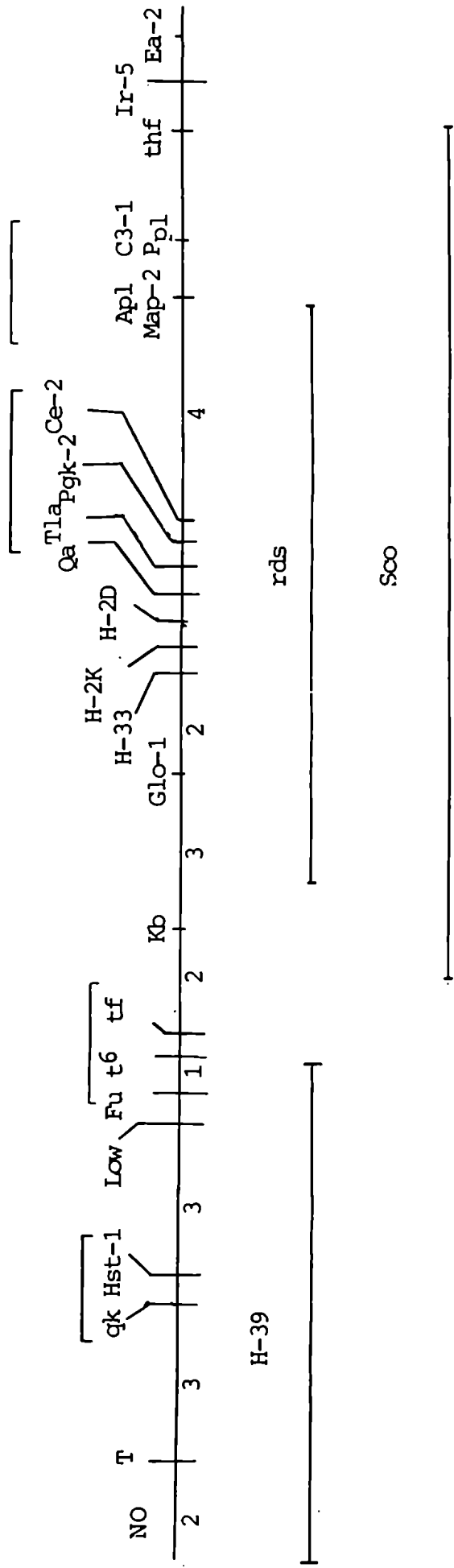
La descripción del H-2 que haremos a continuación, se basó fundamentalmente en la de Jan Klein (130, 131). El H-2 se encuentra localizado en el cromosoma 17 del ratón (80, 161) (Figura 7). En ese mismo cromosoma han sido identificados otros tres grupos de loci: loci que controlan la diferenciación embriónica (T, t, Kb, Fu y qk), loci que controlan el crecimiento del pelo (th y thf) y loci que codifican para isoenzimas (Pgk-2, Ce-2, Ap1, Glo-1 y Map-2). Algunos de estos grupos podrían formar parte de complejos funcionales similares al H-2, en particular el grupo T, t (236).

El complejo H-2 (Figura 8) posee una longitud de 0.3 a 1.5 centimorgans dependiendo de qué loci se consideren pertenecientes o no a él.

Originalmente los bordes del complejo estaban demarcados por el locus H-2K en el extremo centromérico y el locus H-2D en el extremo telomérico. Estos dos loci están separados por una distancia de 0.3 centimorgans. Sin embar

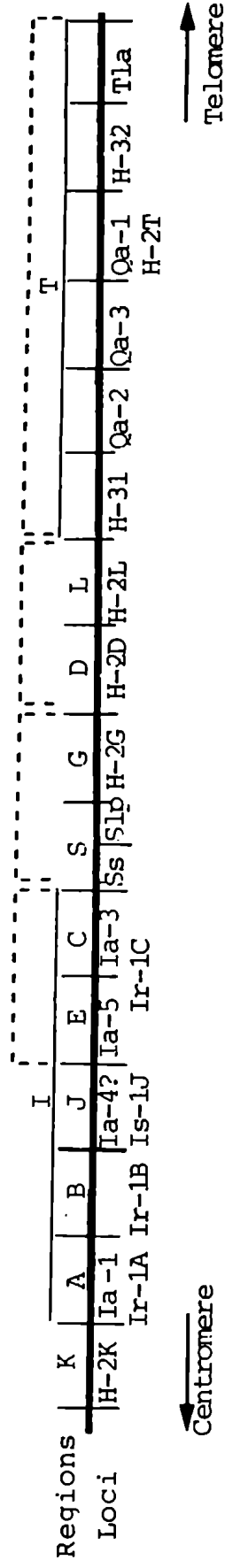


Figura 7: MAPA GENETICO DEL CROMOSOMA 17 DEL RATON



La figura (130) muestra el mapa genético del cromosoma 17, dentro del cual se ubica el H-2. Los corchetes indican que no se conoce el orden de los loci encerrados en ellos; los segmentos, que el locus no ha sido mapeado precisamente y pueden encontrarse en algún lugar dentro de los límites de dichos segmentos.

Figura 8: MAPA GENETICO DEL COMPLEJO H-2



La figura (1.30) muestra el mapa genético del complejo H-2. Los corchetes indican que el orden de los loci señalados dentro de ellos se desconoce.

go, estudios recientes indican que varios loci que se encuentran ubicados a la derecha del locus H-2D están funcional y bioquímicamente relacionados con algunos de los loci pertenecientes al complejo H-2 y entonces, podrían formar parte de dicho complejo. Si se consideran estos loci como pertenecientes al complejo, éste se extendería desde el locus H-2K hasta el T1a y su longitud sería de 1.5 centimorganos.

La posición de cada uno de los loci en el mapa, se determina mediante el estudio de los recombinantes derivados de padres heterocigotas en los cuales dos cromosomas 17 han sufrido procesos de recombinación dentro del complejo (216).

Dos loci separados por recombinación pueden, o bien estar adyacentes o bien, separados por uno o más loci que se desconocen. Por esta razón se denominan regiones a un sector del cromosoma que posee por lo menos, uno, pero probablemente más de un locus. Una región en la que se han identificado varios loci presumiblemente relacionados, suele subdividirse en subregiones. Como se ve, este último término que suele encontrarse en la bibliografía es confuso (125, 164) y últimamente se tiende a utilizar únicamente el término regiones.

El complejo mayor de histocompatibilidad del ratón (H-2) se divide corrientemente en seis regiones. Estas se denominan: K, I, S, G, D y T. La región I suele dividirse en 5 subregiones: A, B, J, E y C.

En la región I a pesar de que se señalan cinco loci, sólo dos o tres de ellos, han demostrado ser efectivamente diferentes. El locus Ia-1 es claramente diferente del H-2K y del resto de los loci de la

región I y al menos, existe otro locus Ia entre las regiones A y S. El locus Ia-4 mapea también en el mismo segmento cromosómico y su separación funcional de los loci Ia-3 e Ia-5 está bien documentada. El locus Ir-1B es el locus menos firmemente establecido de los cinco, ya que para demostrar su existencia existe solamente un recombinante.

En la región S, se indican como loci separados los Ss y Slp; sin embargo, su separación en dos loci diferentes hasta el momento, está sustentada únicamente por datos bioquímicos tentativos (236) y no existen recombinantes que indiquen su definitiva separación.

También es incierta la existencia del locus H-2G. La existencia de los loci H-2D y H-2L en la región D si bien está suficientemente documentada, no se considera totalmente determinada ya que hasta el momento, no se han encontrado recombinantes, o sea, no se ha detectado crossing-over entre ellos. Por último, los loci indicados dentro de la región T son tentativos. Como puede verse, los mapas del complejo mayor de histocompatibilidad contienen desde 10 a 18 loci. Algunos investigadores han sugerido que cada región podría contener un grupo de varios loci de los cuales se expresaría solamente uno, pero hasta el momento no existe evidencia experimental que demuestre esta suposición (129).

### II. 3. b. Expresión fenotípica.

Los loci del H-2 pueden dividirse en tres clases de acuerdo a su expresión fenotípica. Estas clases se

designan 1, 2 y 3.

Los loci pertenecientes a la clase 1 son el H-2K y el H-2D. Ambos codifican para glicoproteínas de membrana denominadas respectivamente, K y D.

Estas moléculas glicoproteicas consisten en una cadena polipeptídica simple de alrededor de 350 aminoácidos, a la que se unen dos cadenas laterales de carbohidratos. En la membrana celular, la molécula se encuentra asociada no covalentemente a un polipéptido más corto de 100 aminoácidos de longitud y de un peso molecular de 12.000. Este polipéptido menor está codificado por un gen que no forma parte del complejo mayor de histocompatibilidad y existe en forma libre en el suero y otros fluidos como moléculas denominadas  $\beta$ 2 microglobulina (236).

Las moléculas K y D muestran una fuerte homología en su estructura primaria. Dicha homología es tan fuerte como la existente entre dos alelos de cada una de ellas. También, existe homología entre las moléculas de la clase 1 de diferentes especies lo cual indicaría un origen evolutivo común de los genes correspondientes.

Las moléculas de clase 1 pueden detectarse ya sea serológicamente o bien histogenéticamente generando linfocitos citotóxicos para células que poseen estas moléculas en su superficie.

Los loci de clase 2 son los pertenecientes a la región I del H-2. Codifican para moléculas denominadas Ia que son también glicoproteínas de membrana. Los genes deno

minados Ir (17, 18) mapean en las mismas posiciones que los genes Ia y no ha sido posible encontrar un producto de los genes Ia diferente a los productos de los genes Ir. Actualmente, suele usarse el término Ir para los genes y el Ia para el producto codificado por dichos genes.

Los dos genes Ir que están bien definidos mapean uno en la subregión A y el otro, lo haría o bien en la subregión E o en la C. Codifican para glicoproteínas de membrana constituidas por dos cadenas polipeptídicas unidas no covalentemente: la cadena alfa posee un peso molecular de 35.000 a 38.000 y la beta un PM de 25.000 a 28.000 (48, 236). El número de cadenas de carbohidratos (156) es desconocido. Los datos que se poseen con respecto a la secuencia de aminoácidos permiten sacar conclusiones tentativas acerca de la homología de las moléculas Ia. No se ha encontrado homología entre las cuatro cadenas y entre las cadenas de clase 1 y 2.

Falta establecer con certeza si ambas cadenas en las dos moléculas están controladas por el complejo H-2 y si así fuera, cuántos genes y qué región del complejo codifica para los polipéptidos individuales.

Si bien los antígenos codificados por los loci de clase 2 originariamente fueron detectados con anticuerpos, mostraron luego ser responsables de la activación de linfocitos T en el cultivo mixto de linfocitos y en la generación de linfocitos T citotóxicos (88). Los genes Ir regulan la respuesta inmune medida por producción de anticuerpos, hipersensibilidad retardada o proliferación de linfocitos T in vitro (155).

Se ha observado que estos genes pueden tanto exacerbar como suprimir la respuesta inmune: por ejemplo, una cepa determinada de ratones puede producir altos niveles de anticuerpos contra determinado antígeno, mientras que otra cepa puede ser mala productora de anticuerpos contra ese mismo antígeno. Si estas dos cepas se cruzan y se analizan las poblaciones segregantes, se encuentra -en el caso más simple- que el nivel de anticuerpos está controlado por uno o dos genes que mapean en la región I. Se han descrito cuatro genes Ir: tres de ellos, aumentan la respuesta inmune y uno, la suprime. Los genes estimulantes de la respuesta mapean en las subregiones A, B, C o E y el gen supresor en la subregión J (99). Estos genes han demostrado ser muy específicos ya que aparentemente pueden distinguir entre dos antígenos muy relacionados y por ejemplo, efectuar una alta respuesta hacia uno de ellos y una baja respuesta hacia el otro.

Los genes de la clase 3<sup>o</sup> codifican para proteínas del suero. Estas son las proteínas denominadas Ss y Slp y constituyen el componente C4 de la vía clásica del complemento. Ambas proteínas poseen un peso molecular de 200.000 y están constituidas por tres cadenas polipeptídicas unidas covalentemente. Estas cadenas se denominan alfa (PM 87.000), beta (PM 78.000) y gamma (PM 33.000). Las tres moléculas derivan del clivaje de una cadena precursora, por lo cual presumiblemente estarían codificadas por un gen único. Se han encontrado pequeñas diferencias en la cadena gamma de la proteína Ss y en la de la Slp, lo cual sugiere que las dos proteínas podrían estar controladas por dos genes. Más recientemente se han encontrado genes ligados al CMH que codifican

para otros componentes del complemento: C3 en el ratón, Bf en el cobayo (33), en el mono Rhesus (251) y C2 en humanos.

### II. 3. c. Polimorfismo.

Una de las propiedades más remarcables de los loci del H-2 es su polimorfismo genético (128). Se habla de polimorfismo genético cuando en la población existen varios alelos de cada locus en frecuencias que no pueden ser explicadas por mutaciones recientes. Esta propiedad hace a los loci que constituyen el CMH, diferentes de casi todos los demás genes de los individuos. Por ejemplo, al testear en las poblaciones de ratones los genes que controlan para aloenzimas, se encuentra que aproximadamente el 60% de los loci son monomórficos, esto es, en estos loci se encuentra sólo un alelo en cada uno de ellos dentro de la población. El 40% restante son polimórficos pero sólo dos y muy raramente tres alelos pueden encontrarse en la población para cada uno de ellos. Usualmente, uno de los tres posee una frecuencia considerablemente más alta que la de los otros dos. La mayoría de los ratones (90%) son homocigotas para los loci polimórficos. En los loci pertenecientes al H-2 la situación es completamente diferente. Estudios realizados en poblaciones de ratones silvestres muestran que los loci de clase I contienen al menos 20 alelos para cada uno; esto es, 20 alelos para las moléculas K y 20 para las D. y se considera que esta estimación estaría por debajo del número real. El alelo más frecuente del locus de la clase I en las poblaciones silvestres se halló sólo en el 12% de los ratones. La mayoría de los alelos estaban presentes con frecuencias inferiores al 2%. Más del 90% de los ratones eran heterocigotas para estos loci



(132, 133, 134, 137). La presencia de tantos alelos en poblaciones de ratones silvestres representa un verdadero polimorfismo que no puede ser explicado por una aparición local de mutaciones recientes. En los ratones domésticos se han encontrado 56 alelos para el locus H-2K y 45 para el locus H-2D. Considerando el alto grado de heterocigosis y la cantidad de loci del complejo, la variabilidad de este complejo en las poblaciones naturales resulta extraordinaria.

Este polimorfismo en los loci del H-2 podría explicarse de dos maneras: o bien es tan alto por ser tolerado por las especies o sea, los diferentes alelos no producen ni ventajas ni desventajas selectivas para los individuos, o bien la selección natural favorece la presencia de tantos alelos en la población. Si bien no se puede aún descartar completamente el primer supuesto, existen suficientes indicios que permiten sustentar el segundo de ellos (128).

#### II. 3. d. Funciones.

Se han señalado casi sesenta funciones del complejo mayor de histocompatibilidad (129). Los antígenos de la superficie celular codificados por los genes del complejo mayor de histocompatibilidad constituyen la barrera más importante para alcanzar la aceptación de trasplantes alogeneicos, ya que desencadenan reacciones T de rechazo por parte del huésped transplantado. Son estos mismos antígenos mayores de histocompatibilidad los principales responsables de desencadenar reacciones de injerto contra huésped

cuando se inoculan células T inmunocompetentes alogenéicas en huéspedes inmunosuprimidos, como ocurre durante los transplantes de médula ósea (126, 127). En la Tabla 2 pueden observarse las funciones descritas hasta el momento para este complejo génico.

Sin embargo, probablemente el rol más importante del CMH fue puesto en evidencia cuando se comprendió su participación en lo que se denominó restricción de las funciones T por el complejo mayor de histocompatibilidad.

#### II. 4. REACCIONES DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y POLIMORFISMO ALOGENEICO EN LOS INVERTEBRADOS.

Las reacciones alogeneicas tienen antecedentes filogenéticos importantes a lo largo de casi toda la escala zoológica.

Una de las características compartidas por todos los Phyla, desde los protozoarios hasta los mamíferos, es el extensivo grado de polimorfismo alogeneico de las macromoléculas de la superficie celular. La ocurrencia de reacciones primarias agudas de rechazo de aloinjertos al nivel de esponjas y celenterados, según algunos autores, podría representar los orígenes de la inmunidad mediada por células y del complejo mayor de histocompatibilidad.

La inmunidad de transplante es probablemente el único indicador que puede ser aplicado a través de todo el

Tabla 2: FUNCIONES CONTROLADAS POR EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

1. Antígenos de clase I detectables serológicamente.
2. Antígenos desencadenantes de reacciones agudas de aloinjertos.
3. Resistencia híbrida a injertos tumorales parentales.
4. Resistencia híbrida a células de exudado peritoneal.
5. Antígenos desencadenantes de reacciones de injerto contra huésped.
6. Niveles de Ss.
7. Resistencia híbrida al trasplante de médula ósea.
8. Resistencia a los virus oncogénicos.
9. Antígenos que desencadenan linfocitotoxicidad mediada por células.
10. Inhibición alogeneica.
11. Antígenos desencadenantes de reacciones de cultivo mixto de linfocitos.
12. Respuesta inmune a antígenos T-dependientes.
13. Efecto alogeneico.
14. Alotipos de proteína del suero Slp.
15. Niveles de andrógenos.
16. Reactividad a eritrocitos de carnero.
17. Colaboración T-B.
18. Peso de testículos, glándula vesicular, timo y nódulos linfáticos.
19. Nivel de proteínas con capacidad de unirse a hormonas.
20. Autoinmunización en combinaciones padres en F1.
21. Actividad del complemento.
22. Antígenos de clase 2 (Ia) serológicamente detectables.
23. Forma de la mandíbula.
24. Expresión de Thy-1 en células de ganglios linfáticos.
25. Respuesta de esplenocitos a fitohemoaglutinina.
26. Inmunidad mediada por células a antígenos virales.

27. Inmunidad mediada por células a antígenos bacterianos.
28. Expresión del receptor para complemento.
29. Producción de factores activadores de células B.
30. Producción de factores supresores de células T.
31. Supresión inmune.
32. Exacerbación de aloinjertos.
33. Expresión del gen de Brachyury (T).
34. Duración de la esplenomegalia inducida por Brucella.
35. Velocidad de la síntesis de DNA.
36. Inducción de células efectoras.
37. Inmunidad mediada por células a células modificadas por haptenes.
38. Inmunidad mediada por células a antígenos menores de histocompatibilidad.
39. Niveles de AMP cíclico.
40. Colaboración células T-macrófagos.
41. Inducción de labio leporino por cortisona.
42. Sensibilidad a la testosterona en ratones orquidectomizados.
43. Ontogénesis de los antígenos H-2 en eritrocitos.
44. Desarrollo de hipersensibilidad retardada.
45. Producción de células "natural killers".
46. Comportamiento para el apareamiento.
47. Proliferación de células T inducida por antígenos.
48. Celularidad esplénica.
49. Efecto de corticoesteroides sobre células tímicas.
50. Expresión de antígenos H-Y sobre células de timo y piel.
51. Proporción de linfocitos T y B.
52. Efecto de la castración sobre el peso del timo.
53. Supresión de las reacciones de cultivo mixto de linfocitos.
54. Inmunidad mediada por células a antígenos asociados a tumores.
55. Efecto citostático de linfocitos inmunes.

56. Producción del factor de inhibición de la migración de macrófagos.
57. Factor colaborador para la generación de linfocitos T efectores.
58. Peso corporal.

El autor (129) denomina a esta Tabla "Teatro del absurdo" queriendo señalar que aún no se comprendía claramente cuál es la principal función biológica del CMH, y cómo se relacionan las funciones entre sí. La restricción de las funciones T por el CMH da una buena respuesta a varias de las funciones atribuidas al CMH. Sin embargo, quedan aún varias incógnitas a resolver.

espectro filogenético (42). Invertebrados multicelulares desde esponjas y corales hasta equinodermos y procordados poseen una capacidad altamente discriminativa para el "inmunorreconocimiento" alogeneico que da lugar a reacciones de histoincompatibilidad (104).

Aunque diversos protozoarios muestran polimorfismo alogeneico de sus antígenos ciliares y de otras macromoléculas de la superficie celular, éstos son reconocidos en un sentido inmune solamente por huéspedes multicelulares. Alotransplantes de núcleos o citoplasma entre distintas cepas de Amoeba o Stentor son a menudo, exitosos. Sin embargo, cuando las transferencias no son compatibles, los receptores usualmente mueren sin producir clones. Esta incompatibilidad puede caracterizarse como intracelular y enzimática si bien, esto no significa negar que los protozoarios posean sitios específicos de unión en su superficie celular. Existen postulaciones que sostienen que aquellos sitios específicos para la entrada de aminoácidos en Amoeba proteus, podrían haber evolucionado hacia aquellos responsables del reconocimiento inmune en los Metazoa.

En las esponjas existe incompatibilidad intraespecífica. Las zonas de contacto entre dos esponjas alogeneicas aparecen generalmente separadas por un borde discreto. No se encontraron reacciones citotóxicas u otras secuelas de rechazo. Simplemente no se fusionan. En algunas combinaciones se vio sin embargo, muerte celular en la interfase del aloinjerto. Segundos aloinjertos morían significativamente más rápido. El polimorfismo de la histocompatibilidad parece ser grande.

Entre los celenterados, se encontró incompatibilidad alo-

geneica en dos de sus tres clases: Hydrozoa y Antozoa. Los efectos de la incompatibilidad van desde la no fusión hasta la citotoxicidad aguda. Pueden observarse también, reacciones aceleradas de segundos aloinjertos.

Entre los helmintos existe un amplio espectro de incompatibilidad alogeneica. Células que algunos autores comparan a leucocitos son capaces de mostrar citotoxicidad xeno y alogeneica in vitro.

En los artrópodos, se discute si puede hablarse de rechazo o no de aloinjertos: algunos autores observaron la encapsulación de xenoinjertos pero no la de aloinjertos. Otros afirman que también puede hablarse de rechazo de aloinjertos, por ejemplo, en Hymenoptera.

Muchos moluscos pueden distinguir entre iso, alo y xenoinjertos.

En los equinodermos y tunicados, se ha descrito inmunoreconocimiento alogeneico. En algunas estrellas de mar existe especificidad y al menos memoria de corto tiempo. En los tunicados, la aloincompatibilidad implica reacciones de rechazo crónicas. En algunas especies solitarias se observó la invasión de la interfase huésped-aloinjerto por gran número de células que los autores llaman linfocitos, granulocitos y fagocitos. Experimentos de fusión alogeneica en diversas especies coloniales de ascidias, han revelado un extensivo grado de polimorfismo alogeneico que muestra un control genético complejo (230).

En el tunicado colonial *Botryllus primigenus* la aloagresión celular parece estar controlada por un locus al que se denominó locus F (211). Este locus posee múltiples alelos en la población y se lo propone como la mejor aproximación a un complejo mayor de histocompatibilidad ancestral. Los miembros de cada colonia de estos tunicados son genéticamente estériles. Mientras que para fusionarse con otros miembros deben compartir al menos uno de los dos alelos posibles de F, sólo los espermatozoides alogeneicos son capaces de fertilizar. Las colonias son estériles. Se postula que la reacción aloagresiva a los espermatozoides alogeneicos facilita o estimula su penetración en las células maternas al punto de ser un requerimiento casi obligatorio para la fertilización. Esto podría haber constituido una ventaja selectiva para la aparición de un gran polimorfismo.

Como puede observarse, los mecanismos de aloagresión son más antiguos que las inmunoglobulinas que se desarrollaron sólo a partir de los vertebrados. El posterior desarrollo del CMH hasta el de los mamíferos, se postula a través de mecanismos de duplicación génica, mutaciones y recombinaciones desiguales, lo cual resulta análogo al desarrollo postulado para las familias de multigenes de las inmunoglobulinas.

### III. LINFOCITOS T ALORREACTIVOS

Se denominan linfocitos T alorreactivos a los



linfocitos T que reaccionan contra los antígenos mayores de histocompatibilidad de su especie no propios.

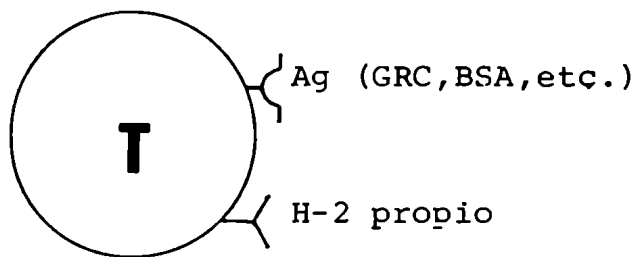
Los linfocitos T alorreactivos poseen receptores que reconocen a los diferentes antígenos codificados por loci del CMH de la especie.

Se demostró que la subpoblación de linfocitos T alorreactivos con receptores hacia los antígenos MHC de una cepa determinada de ratones H-2<sup>a</sup>, por ejemplo, eran diferentes a aquellas que reaccionaban frente a antígenos H-2<sup>b</sup>, y estas últimas diferentes a las que se estimulaban frente a los antígenos H-2<sup>c</sup>, etc. De modo que las poblaciones T alorreactivas que reaccionan hacia cada tipo de H-2 son poblaciones separadas y se cree que no existe su perposición importante entre ellas (3, 13, 106, 140, 149, 150, 261).

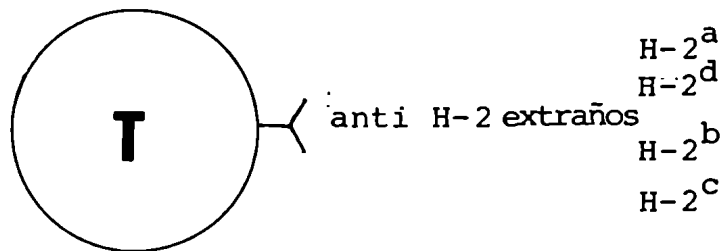
Los linfocitos T alorreactivos difieren de los que reaccionan hacia antígenos convencionales en dos aspectos importantes (106) (Figura 9):

1. Los linfocitos T alorreactivos existen en la población normal no inmunizada en una frecuencia muy alta. La frecuencia de las células T que pueden responder a un antígeno convencional es de  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$ , pero la frecuencia de células T que responden a aloantígenos codificados por el CMH es de cien a mil veces mayor. Se calcula que aproximadamente del 3 al 6% de los linfocitos T de todo individuo no inmunizado es capaz de

Figura 9: CARACTERISTICAS DE LAS POBLACIONES T ALORREACTIVAS QUE LAS DIFERENCIAN FUNCIONALMENTE DE LAS POBLACIONES T REACTIVAS A ANTIGENOS CONVENCIONALES.



Frecuencia baja en individuos normales no inmunizados  
 Aumentan su frecuencia por sensibilización in vivo



Frecuencia alta en individuos normales no inmunizados  
 No aumentan su frecuencia por sensibilización in vivo

reaccionar contra cualquier HLA o H-2 no propio (21, 83, 154, 210, 246, 261).

2. Mientras que la frecuencia de los linfocitos T reactivos a antígenos convencionales aumenta por inmunización in vivo, la frecuencia de los linfocitos T alorreactivos no aumenta por inmunización in vivo con los correspondientes antígenos mayores de histocompatibilidad no propios (92).

### III. 1. PARTICIPACION DE LINFOCITOS T ALORREACTIVOS EN EL RECHAZO DE INJERTOS ALOGENEICOS.

Los linfocitos T alorreactivos responden rechazando los injertos alogeneicos y se los considera los principales responsables de dicho rechazo. Los linfocitos T que responden a los antígenos menores de histocompatibilidad participan también en la respuesta a los trasplantes alogeneicos. Sin embargo, el comportamiento de estos dos tipos de células en el rechazo de aloinjertos aparenta ser diferente. Cuando se hace un injerto de piel que difiere en H-2 con el huésped, el rechazo suele completarse aproximadamente a las dos semanas, y en este caso, a mayor tamaño del injerto -mayor cantidad de antígeno- el rechazo es más rápido. Si el injerto de piel difiere del huésped sólo en antígenos menores de histocompatibilidad, el tiempo de rechazo es mucho mayor pudiendo durar meses (131) y a mayor tamaño del injerto corresponde un mayor tiempo de sobrevida del mismo (25).

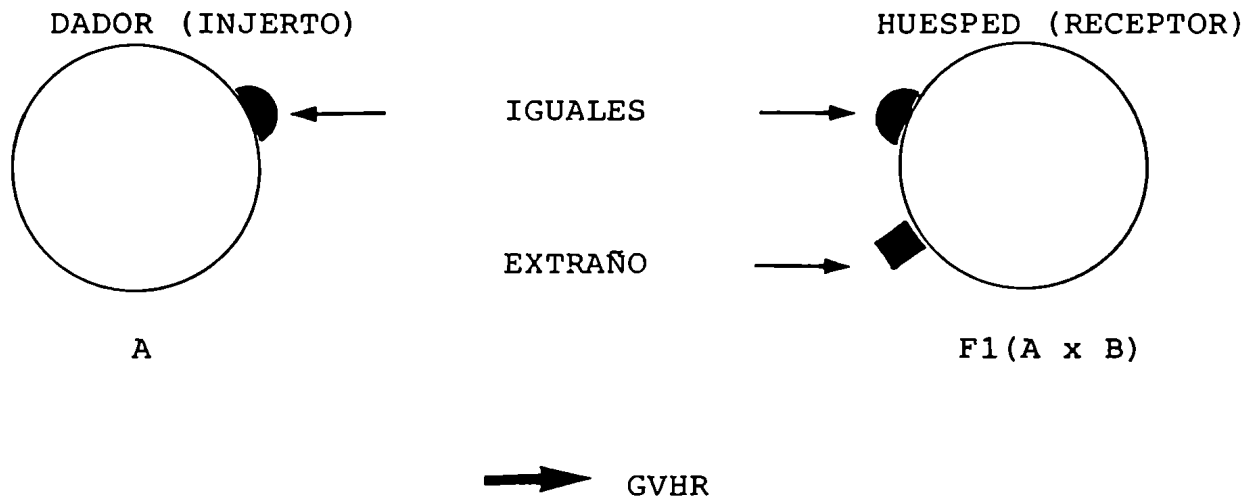
Las células T reactivas a antígenos menores de histocompatibilidad poseen baja frecuencia en individuos normales no inmunizados y su frecuencia aumenta por inmunización in vivo con dichos antígenos menores (92). O sea, se comportan en este aspecto, como células T reactivas a antígenos convencionales.



### III. 2. PARTICIPACION DE CELULAS T ALORREACTIVAS EN REACCIONES DE INJERTO CONTRA HUESPED.

Las reacciones de injerto contra huésped (GVH) (6, 74, 76, 77, 211, 213) se producen cuando linfocitos T que reaccionan hacia antígenos de histocompatibilidad se introducen natural o experimentalmente en huéspedes total o parcialmente inmunoincompetentes. Dichos linfocitos T inician el ataque citotóxico de las células del huésped que se encuentra incapacitado para defenderse exitosamente de la agresión. La Figura 10 esquematiza las bases de las reacciones de injerto contra huésped (88).

La reacción de injerto contra huésped puede definirse entonces, como la respuesta inmune de los linfocitos T injertados, hacia los antígenos de histocompatibilidad extraños presentes en el huésped (54). Los efectos de esta reacción se manifiestan en una patología heterogénea (19, 95, 201, 235, 247, 249) denominada enfermedad de GVH o enfermedad alogeneica. Dicha patología, como hemos señalado, puede inducirse natural o experimentalmente, injertando células linfoides maduras, inmunocompetentes, en un

Figura 10: BASES DE LA REACCION DE INJERTO CONTRA HUESPED



La figura (88) esquematiza uno de los modelos para la inducción de reacciones de injerto contra huésped: A y el híbrido F1(A x B) comparten el Ag  pero, el F1(AxB) contiene un Ag  que A no tiene. Puesto que A es el injerto y es inmunocompetente y el F1(A x B), el huésped, ocurre la GVHR por el ataque de las células T del dador (A) hacia los antígenos de histocompatibilidad del receptor (F1(A x B)).

huésped inmaduro, inmunoincompetente. La falla del huésped para reconocer al injerto como no propio o para montar una respuesta adecuada, rápida, contra él, permite el ataque (por parte de las células injertadas) de sus tejidos, especialmente de los linfomiéloides (74).

Se acepta que las células que inician la reacción son los linfocitos T del injerto, y que son algunos de éstos los que median el daño tisular en el huésped como células citotóxicas efectoras. Debe señalarse, sin embargo que, en ocasiones, la reacción se ve modificada por complejos efectos secundarios, entre otros (74, 75): la activación de las células B del huésped; la activación de virus latentes (55, 193); inmunodeficiencias (166, 203, 204, 205) e infecciones (179, 186, 229); reacciones autoinmunes (2, 55) y neoplasias (55) y por modificaciones tales como la flora patógena ambiental y endógena (186); la resistencia genética del huésped al injerto y factores inmunorregulatorios (anti-idiotipos, células T supresoras, etc.).

La reacción de GVH se produce por el reconocimiento por parte de los linfocitos T del injerto de los antígenos de histocompatibilidad extraños expresados en el huésped. Dicho reconocimiento involucra dos componentes: antígenos en la superficie celular, que estimulan la respuesta y receptores en las células que responden.

Los antígenos mayores de histocompatibilidad constituyen el principal desencadenante de las reacciones de GVH (97) pero, los antígenos menores de histocompatibi

lidad, en algunas circunstancias, son capaces también de desencadenar este tipo de reacciones (138, 228, 229). La antigenicidad de las moléculas codificadas por los loci de histocompatibilidad menores, dependería de aquellas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad. La interdependencia de los antígenos mayores y menores ha sido demostrada sólo in vitro, pero es probable que dicha relación exista también in vivo (1, 187).

En el ratón existen cuatro regiones del CMH involucradas en las reacciones de injerto contra huésped; éstas son: las regiones K; IA; IC y D (126, 127, 136). Estudios realizados con mutantes (129) sugieren que una sola molécula, como por ejemplo la codificada por la región H-2K o H-2D, es antigénicamente compleja, es decir, presenta varios determinantes antigénicos. Tal vez uno de los hallazgos más sorprendentes resulta la observación de que un único determinante antigénico es tan fuerte como estimulante de los linfocitos T, como lo es una molécula que lleva múltiples determinantes. En algunos casos, la sustitución de un único aminoácido en la molécula es suficiente para desencadenar una reacción T capaz de matar una célula o un ratón. Este tipo de estudios sugiere también que la reacción es usualmente mucho más fuerte en combinaciones que involucran alelos relacionados por su origen mutante que en combinaciones que involucran alelos no relacionados. Esto parecería significar que el receptor del linfocito T estaría diseñado de modo de reconocer diferencias alogeneicas sutiles más que extremas. (183).

Dos subpoblaciones T (45) están involucradas en las reacciones de GVH. Ambos tipos se encuentran presentes en diferentes proporciones en los distintos compartimientos linfoides. Las primeras evidencias de cooperación celular en las respuestas mediadas por células fueron descritas por Cantor y Asofsky en 1970, en la reacción de GVH (5). Usando células parentales de timo y de sangre periférica, mostraron que la inoculación de mezclas de células de estos dos sitios en huéspedes F1, provocaban reacciones de GVH mayores que la suma de las reacciones provocadas por cada uno de los tipos celulares por separado. Estos autores designaron a estos dos tipos de células que actúan sinérgicamente: T1, constituyentes primarios de células T en timo y bazo y precursoras de las células responsables del daño inmunológico; y T2, presentes en mayores proporciones en sangre periférica y nódulos linfáticos, que amplifican la actividad de las T1. Así las T1 son las iniciadoras de la reacción (o sus precursoras) mientras que las T2 son las amplificadoras de la respuesta (45). Actualmente, se denomina a las T1, células T citotóxicas (Tc) y a las T2, células T colaboradoras (Th).

Existen dos técnicas in vitro que en alguna medida reflejan la actividad de ambas subpoblaciones (77, 92): el cultivo mixto de linfocitos (MLC) y la citotoxicidad mediada por linfocitos (CML). El MLC (67) refleja la rama aferente y el proceso central de la reacción y evidencia el reconocimiento antigénico y la proliferación celular subsecuente; la CML representa un modelo con-



trolado que permite estudiar la fase efectora de la reacción. Así, la célula proliferante amplificadora (Th) -evidenciada principalmente en el MLC- promueve el desarrollo de las células efectoras Tc. Las células Th son selectivamente activadas por los determinantes antigénicos codificados por la región I del CMH o sea, por antígenos de clase 2. Las Tc responden primariamente a los determinantes codificados por las regiones H-2K y H-2D, esto es, por antígenos de clase 1 del CMH. Sólo se desarrolla una fuerte citotoxicidad cuando ambos tipos de células son estimulados (88). En contraste con la interacción cooperativa, se ha demostrado también actividad supresora por parte de células T (Ts) (181, 203, 204, 205).

### III. 3. REACCIONES DE INJERTO CONTRA HUESPED, AUTOINMUNIDAD Y LINFOMAS.

En 1959, Kaplan y Smithers publicaron un trabajo que muestra las similitudes que existen entre ratones que sufren reacciones de GVH y pacientes con linfoma Hodgkin (117). Proponían que el tumor, como las células injertadas en el ratón, atacaba al paciente y así, causaba muchos de los hallazgos clínicos y patológicos. Hacia 1960, predijeron que ratones F1, inoculados con esplenocitos parentales, desarrollarían linfomas malignos como consecuencia de la estimulación antigénica de las células injertadas por los antígenos de híbrido. Esta predicción se cumplió en 1965 (55). A partir de ese momento, las reacciones crónicas de GVH han sido estudiadas tanto como modelos de autoinmunidad (2, 68, 139, 198) como de inducción de linfomas malignos.

Los trabajos de Armstrong (4) muestran los cambios ocurridos en el bazo de ratones F1 inoculados con células esplénicas parentales: durante meses se observaba una esplenomegalia progresiva; histológicamente, los bazos eran inicialmente hiperplásicos, luego, aumentaba la desorganización en su arquitectura y finalmente, eran neoplásicos. Estudios realizados en 48 combinaciones parentales en F1, mostraron que el hallazgo más común en los F1 que desarrollaron linfomas era la esplenomegalia (4). También era frecuente el incremento en el tamaño de los nódulos linfáticos y de las placas de Peyer; el timo no era hiperplásico y nunca estaba involucrado como neoplásico. Aunque el tumor más común que se desarrollaba durante las GVHR fue llamado retículo sarcoma tipo B, actualmente se duda de que esta terminología sea la correcta. Las dificultades para definir con precisión la naturaleza celular de estos linfomas malignos, recuerdan la continua controversia acerca de la nomenclatura de los linfomas malignos humanos. El hecho de que el timo nunca aparezca involucrado, el origen anatómico en áreas del tejido linfático dependientes de células B, su común asociación con inmunoglobulinas monoclonales en suero y su apariencia histológica altamente pleomórfica, sugieren un origen en células B. Sin embargo, no existen aún estudios sistemáticos de estos linfomas inducidos por GVHR usando marcadores celulares inmnológicos.

Se ha señalado la importancia de las diferencias en H-2 en la inducción de este tipo de linfomas (87). Diferencias en la región I del CMH parecerían ser críticas. Sin embargo, debe señalarse que estas diferencias en H-2 no serían un requerimiento absoluto para la inducción de linfomas. Existen trabajos que describen la inducción de

linfomas luego de dos años de desencadenadas reacciones de GVH que involucraban diferencias en un único antígeno menor de histocompatibilidad. Algunos autores sugieren que este tipo de sistemas reflejaría mucho mejor el desarrollo de linfomas espontáneos que aquellas reacciones de GVH que involucran combinaciones dador-receptor fuertemente incompatibles.

Existen datos que sugieren el papel de reacciones inmunes dirigidas contra el receptor de las células que desencadenan las reacciones de GVH como el factor desencadenante en el desarrollo de los linfomas malignos.

La reducción de la actividad inmunológica de las células injertadas disminuye drásticamente la incidencia de linfomas: por ejemplo, cuando se transfieren timocitos de la cepa de ratones AKR que se sabe que contienen virus oncogénicos (96) pero que no pueden provocar reacciones de GVH, la incidencia de linfomas es extremadamente baja (87). En contraste, células esplénicas de AKR inducen linfomas con una alta incidencia.

La posibilidad de que los linfomas aparezcan durante el curso de las reacciones crónicas de GVH a causa de la inmunosupresión que frecuentemente se encuentra en estos animales (34), parecería no ser la causante de los linfomas ya que no se encontró correlación entre dicha inmunosupresión y la incidencia de estas neoplasias (218).

### III. 4. TECNICAS EXPERIMENTALES PARA LA INDUCCION DE REACCIONES DE INJERTO CONTRA HUESPED.

Existen diferentes métodos experimentales (98, 217) para desencadenar reacciones de injerto contra huésped. Algunos de ellos, permiten una buena cuantificación de los niveles de alorreactividad T. A lo largo de este trabajo se utilizarán tres ensayos de injerto contra huésped: el ensayo local de Ford y Simonsen (82), el de Simonsen para recién nacidos (92) y la inducción de daño fetal por pasaje transplacentario de linfocitos T alorreactivos (12).

#### III. 4. a. Ensayo local de Ford y Simonsen

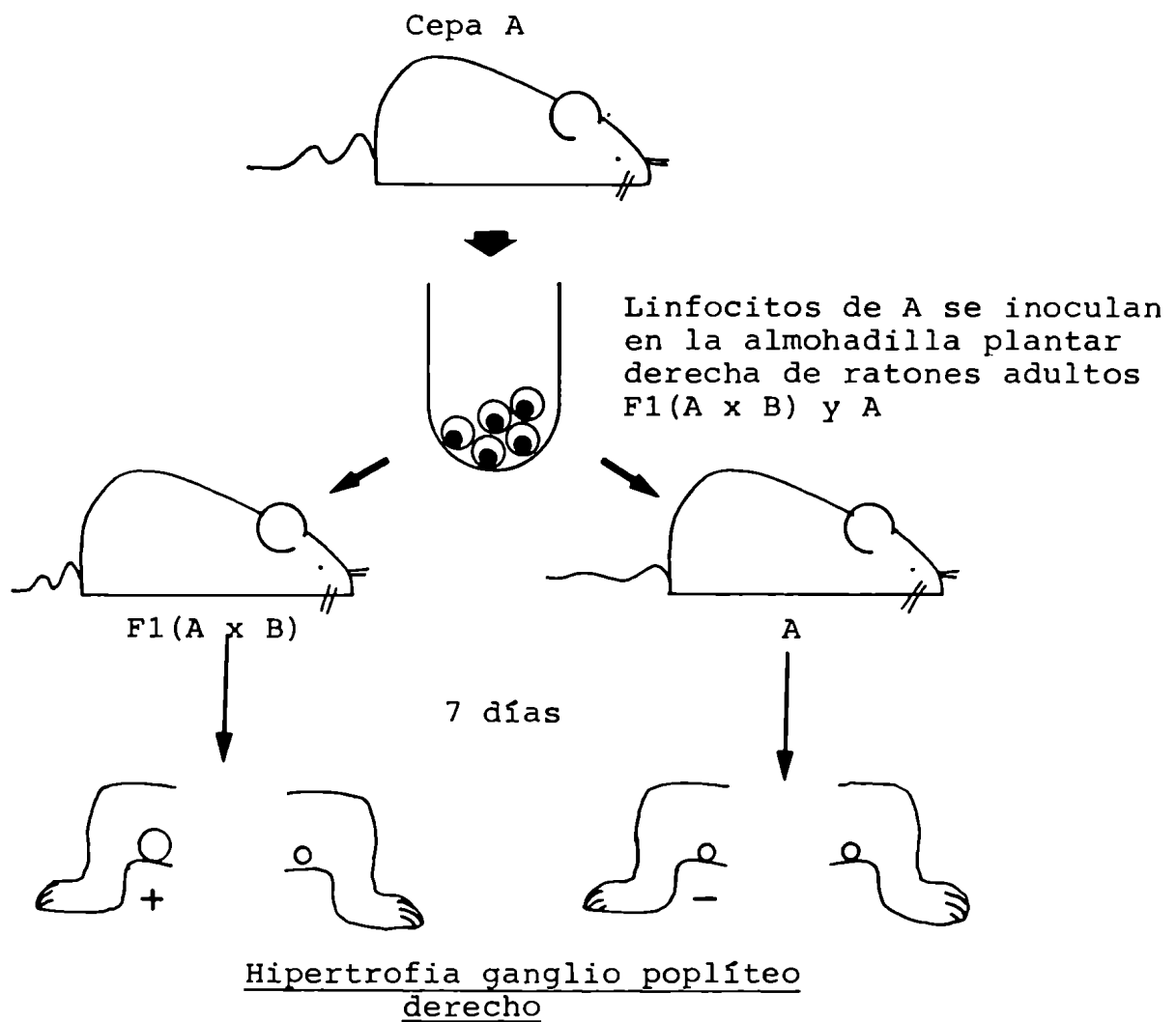
Este ensayo (82, 98) consiste en la inoculación de células inmunocompetentes A en una de las almohadillas plantares de un híbrido F1 (A x B) adulto. Dicho híbrido F1, por ser A y B, o sea, por expresar en la superficie de sus células antígenos de histocompatibilidad A y B como propios, no reconoce como no propios a los antígenos de histocompatibilidad de las células A y por lo tanto, no las rechaza. Las células A del injerto reconocen como no propios a los antígenos de histocompatibilidad B del huésped F1 (A x B) y desencadenan en él, reacciones de GVH. La reacción se cuantifica extrayendo a los 7 días de la inoculación, los ganglios poplíteos derecho e izquierdo -ganglios drenantes de la almohadilla plantar- del F1. La diferencia de peso entre ambos, o sea entre el ganglio

drenante de la almohadilla plantar inoculada y el contralateral, permite la cuantificación de la reacción (Figura 11). Una de las ventajas de este método consiste en el hecho de que no resulta necesario inmunosuprimir artificialmente al huésped, cosa habitual en otro tipo de ensayos.

Cuando injerto y huésped comparten el mismo H-2 y difieren en antígenos menores de histocompatibilidad -salvo que exista sensibilización previa de las células del injerto- no se detecta por este método reacción positiva de GVH. Existe sin embargo una excepción y ésta se produce cuando injerto y huésped comparten el mismo H-2 pero difieren en el locus Mls. En este caso, sí se detecta reacción positiva de GVH.

Hemos dicho que el F1 (A x B) no reconoce como extraños a los antígenos de histocompatibilidad de las células A. Sin embargo, hay algo en estas células que sí resulta inmunogénico para el híbrido F1 y este inmunógeno resulta ser el receptor T anti H-2 B de las células A. O sea, el híbrido F1 no reconocería como propio el receptor (o parte de él) A anti-H-2 B. En algunas circunstancias experimentales es posible detectar la respuesta del F1 (AxB) contra los receptores A anti-B. Dicha respuesta consistiría en la fabricación de anticuerpos anti-idiotípicos del F1 (AxB) anti-(A-antiB) o sea, anticuerpos que reconocen como determinantes antigénicos parte del receptor anti-B de las células A (27). Los F1 serían también capaces de desencadenar una respuesta mediada por células T contra el receptor anti-B (13). Dicha respuesta T parecería tener la característica de no actuar únicamente sobre el receptor A anti-B, sino que también

Figura 11: ENSAYO LOCAL DE INJERTO CONTRA HUESPED



La figura esquematiza el ensayo local de Ford y Simonsen: cuando se inoculan linfocitos provenientes de un ratón de la cepa A, en la almohadilla plantar de un híbrido F1(AxB), los linfocitos inoculados desencadenan la reacción de GVH. Dicha reacción se evidencia por el aumento de tamaño del ganglio poplíteo drenante.

actuaría sobre receptores T, C anti-B, D anti-B, etc., siendo C y D células de animales que difieren o no de A en H-2 (14). Esta respuesta T del F1 se detecta cuando el injerto se realiza por vía endovenosa o intraperitoneal. En el ensayo local de Ford y Simonsen, no se ha investigado si este tipo de respuesta se da o no y, de suceder, en qué grado opera.

Algunos autores sugieren que cuando se realizan ensayos locales de GVH (en ratas), el bazo y otros órganos linfáticos del huésped F1 sufren efectos de la reacción lo que se visualizaría por un leve aumento del tamaño esplénico, por ejemplo.

El aumento de tamaño del ganglio poplíteo drenante se debe, en la mayoría de los casos, a la proliferación de las células del injerto; en algunas pocas combinaciones, a la proliferación de las células del F1 (76, 92). Resulta probable que el aumento leve del peso esplénico refleje más bien la respuesta del F1 contra los receptores A anti-B. No se pretende con esto afirmar que en uno de los compartimientos linfoides - ganglios poplíteos- ocurra exclusivamente una de las reacciones -GVH- y en el otro -bazo- la otra-respuesta del F1-. Es probable que en ambos compartimientos coexistan ambos fenómenos, pero tal vez en cada uno de ellos predomine uno de los dos.

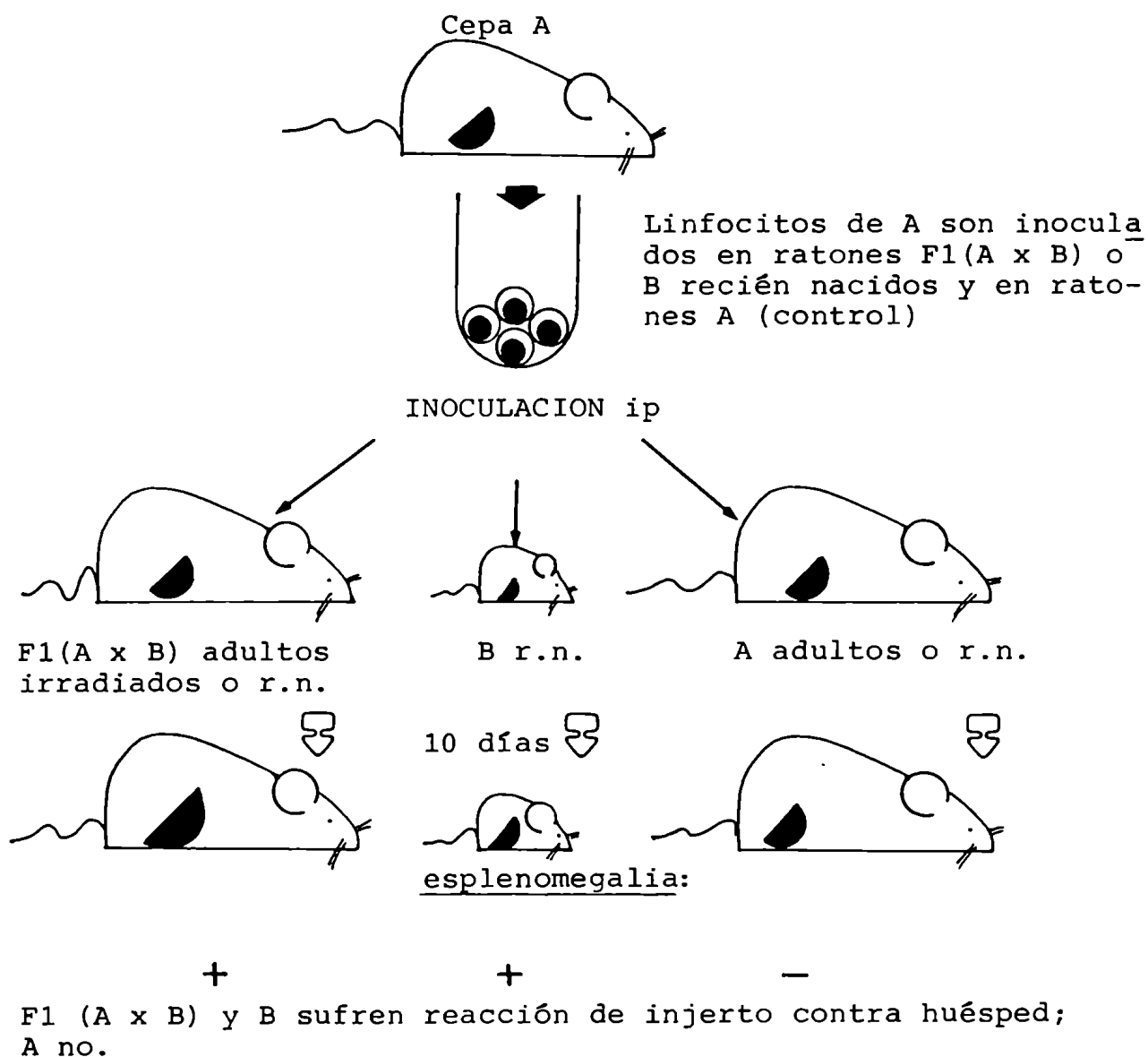
Debe quedar claro sin embargo, que el aumento del peso de los ganglios poplíteos refleja la intensidad de la reacción de GVH; en cambio, no se podría afirmar que lo mismo ocurre con respecto al leve aumento del peso esplénico que a veces se detecta.

### III. 4.b. Ensayo de Simonsen para recién nacidos

El ensayo de Simonsen para recién nacidos consiste en la inoculación de un injerto A por vía intraperitoneal en recién nacidos de la cepa B (77). Los ratones recién nacidos son inmunológicamente inmaduros. Esto no significa necesariamente que los ratones recién nacidos no presenten ningún nivel de respuesta inmune pero si algún grado de ésta existe, no alcanza para defenderlos del ataque citotóxico T por parte del injerto. En consecuencia, los animales mueren en un tiempo mayor o menor según la dosis de células injertadas y las diferencias de histocompatibilidad entre injerto y huésped. En el ensayo de Simonsen para recién nacidos, diez días después de la inoculación del injerto, se sacrifican los animales y se pesan los bazo (Figura 12). Se calcula un índice esplénico (IE) dividiendo el peso del bazo por el peso corporal. Si se divide este índice por el índice presentado por ratones de la misma cepa y edad no inoculados, se obtiene el llamado índice esplénico de Simonsen (IEs). Se considera que existe reacción positiva de GVH cuando este IEs es mayor de 1.3. Estos índices permiten cuantificar la reacción de injerto contra huésped. El aumento del peso esplénico que se detecta a los 10 días se debe, en la mayoría de los casos, a la proliferación de las células del huésped inducidas por las células T del injerto. Si se deja proseguir la reacción, los animales mueren con atrofia de bazo y timo presentando además otros signos particulares. El cuadro total se denomina "runting" (12). Esta técnica presenta como la anterior la



Figura 12: ENSAYO SISTEMICO DE INJERTO CONTRA HUESPED



La figura esquematiza la inducción de reacciones sistémicas de injerto contra huésped.

ventaja de no tener que utilizar inmunosupresores.

III. 4. c. Inducción de daño fetal por células T alorreac-  
tivas.

El pasaje transplacentario de linfocitos maternos T alorreactivos induce reacciones de injerto contra huésped en el feto. Se denomina "runting" o enfermedad secundaria a una serie de signos, que se presentan en los animales desde el nacimiento hasta el destete, producidos por reacciones de GVH debidas al pasaje de linfocitos T maternos (12, 24). Las células T reactivas a antígenos menores de histocompatibilidad son también capaces de inducir "runting". Los animales presentan signos característicos de estar sufriendo reacciones sistémicas de GVH: diarrea, pérdida de peso, caquexia, etc., y finalmente, mueren con atrofia de timo y bazo. Existen diversos grados de daño fetal y éstos van desde abortos tempranos hasta muerte de la cría antes del destete aproximadamente a los 30 a 40 días de vida (173).

Si bien la inducción experimental de este tipo de reacciones de injerto contra huésped no resulta fácil de realizar, se ha logrado inducir daño fetal por pretratamiento de la madre con antígenos paternos, o por sensibilización pasiva de la madre con linfocitos singeneicos inmunes al padre (12, 24). En nuestro laboratorio, hemos logrado inducir daño fetal por pretratamiento de la madre con piel, linfocitos y tumores de origen paterno (152) y con un tu-

mor heterogéneo de origen no paterno (153). En estos casos, se mostró una excelente correlación entre daño fetal y niveles de alorreactividad T esplénicos de la madre hacia los antígenos de histocompatibilidad de la cepa paterna (176).

Algunos autores atribuyen al pasaje transplacentario de linfocitos T alorreactivos de la madre hacia el feto producido "naturalmente" en humanos, la causa del pico de leucemias que existen en los niños alrededor de los dos años de vida, correlacionando así reacciones crónicas de GVH con la inducción de leucemias (76, 92).

### III. 5. PARTICIPACION DE LINFOCITOS T ALORREACTIVOS EN LA PREÑEZ.

#### III. 5. a. Inmunología de la preñez.

Desde el punto de vista de la inmunobiología, el feto puede considerarse como un injerto alogeneico (11, 12, 172) y como tal, según las leyes de transplante, debería ser rechazado por la madre. Esto no ocurre sin embargo, en condiciones normales. Se han postulado algunos mecanismos que intentan explicar el éxito de este tipo particular de aloinjertos, la preñez, en las poblaciones de mamíferos de cría libre: En todas las especies estudiadas existe un mecanismo de aislamiento vascular estricto entre la madre y el feto. No hay comunicaciones vasculares directas como ocurre en el caso de la parabiosis y de los ór

ganos transplantados. Esencialmente la sangre del feto y la sangre de la madre se dializan entre sí, separados por una barrera ininterrumpida (11), el trofoblasto de la placenta.

Uno de los primeros intentos para explicar el no rechazo del feto se basaba en la afirmación de que éste era antigénicamente inmaduro (9). Hoy se puede asegurar que esto no es cierto. El feto expresa tempranamente una gran variedad de antígenos, entre ellos, antígenos de histocompatibilidad mayores y menores (10). En el ratón, por ejemplo, algunos antígenos menores de histocompatibilidad, incluyendo el H-Y, se expresan ya en las primeras divisiones que sufre la cigota. Los antígenos mayores de histocompatibilidad aparecen primeramente expresados por el blastocisto temprano, poco antes de la implantación, en las células de la masa celular interna y sus derivados. Dentro de éstos, los antígenos Ia se detectan por primera vez, en células de un embrión de once días de gestación. Estudios recientes demostraron la presencia de antígenos H-2 de ambos haplotipos de origen materno y paterno, sobre el trofoblasto y se encontró que su densidad antigénica era equivalente a la de los timocitos adultos.

Se ha postulado que la madre elabora anticuerpos específicos contra el trofoblasto (248) que modularían las respuestas inductoras del rechazo, favoreciendo los mecanismos de aceptación del tejido desconocido (238). También se sugiere la existencia de complejos inmunes (227) y de anticuerpos anti-Ia con funciones bloqueantes,

que bloquearían al antígeno evitando su ataque por parte del sistema inmune (101, 238).

Durante mucho tiempo el útero fue considerado como un sitio inmunológicamente privilegiado, incapaz de expresar inmunidad de transplante. Actualmente, ésto no se considera cierto (9). Injertos alogeneicos de piel y linfocitos se rechazan en el útero en forma normal. Si el huésped se encuentra en el período temprano de preñez o pseudopreñez, se desarrolla una respuesta decidual que abarca el área que ocupa el injerto y la sobrevivida del mismo se prolonga por unos días. Sin embargo, finalmente, los tejidos son rechazados. Cuando la hembra está sensibilizada o bien cuando se sensibiliza en forma pasiva a hembras tolerantes al aloinjerto, el rechazo se produce bruscamente. Estos hechos disminuyen la posibilidad de que los tejidos deciduales puedan conceder al feto protección contra un estado de sensibilidad existente (11).

Cuando se sensibiliza uno de los cuernos uterinos del ratón con aloinjertos y luego se preña a la hembra, el cuerno uterino sensibilizado presenta un mayor número de fetos y un mayor peso placentario que el cuerno contralateral no inmunizado. Se encontró que este efecto se debía a la presencia de antígenos menores de histocompatibilidad en los tejidos usados para la sensibilización (10). Esta observación junto al hecho de que segundas preñeces parecerían ser mejores que las primeras en cuan

to a número de fetos a término, tamaño de los mismos y peso placentario, sugiere que la sensibilización materna, en determinadas condiciones, colaboraría al desarrollo del aloinjerto fetal.

Desde los primeros estadios del desarrollo placentario y a través de toda la gestación, el trofoblasto sincicial sintetiza y mantiene en alta concentración hormonas y otras sustancias que según algunos autores poseerían un rol inmunosupresor local (11, 215).

Aunque las diferentes especies varían ampliamente en la estructura placentaria y en la intimidad del encuentro entre el trofoblasto y el tejido uterino, todas comparten la producción de progesterona por el epitelio trofoblástico y/o por el cuerpo lúteo del ovario. En todas ellas, su función es el mantenimiento de la preñez. Sus efectos inmunodepresores tanto in vivo como in vitro hacen suponer que la supresión local de la respuesta inmune celular de la madre por altas concentraciones tisulares de progesterona constituiría un mecanismo importante para evitar el rechazo del feto. Se postula también un efecto de la progesterona denominado "insecticida" que alejaría a los linfocitos de los sitios en los que su concentración es alta (8, 10).

Otros trabajos muestran una acción inmunoexacerbante de algunos esteroides sexuales femeninos (145).

Se ha postulado también que el blastocisto posee una carga negativa neta en su superficie debida al contenido de sialomucina de su plasmalema y se ha sugerido que esta fuerza electrostática puede actuar para repeler a los linfocitos evitando las interacciones mediadas por células en la frontera materno-fetal (9). Otros autores demostraron que la gonadotropina coriónica humana producida por el sinciciotrofoblasto puede contribuir a negativizar la carga neta de este tejido y los linfocitos próximos.

Se han encontrado también sustancias inmunosupresoras producidas por el feto que cruzarían la placenta entrando a la circulación materna. Una de ellas es la alfa feto-proteína, una glicoproteína sintetizada por el saco vitelino y el hígado fetal, presente en altas concentraciones en sangre y líquido amniótico.

Sin embargo, los estudios realizados para determinar si la madre estaba inmunológicamente suprimida demostraron por el contrario, que la regulación materna no difería respecto al estado de no preñez y que además, respondía al estímulo inmunogénico representado por la unidad fetoplacentaria. Esta respuesta materna es expresada en una variedad de formas (10, 11): por el agrandamiento de los nódulos linfáticos drenantes del útero grávido, la proliferación en ellos de células pironinofílicas en las áreas paracorticales (linfocitos T) y de células plasmáticas en la medular (linfocitos B), por el desarrollo de inmunidad celular contra los antígenos mayores y menores de histocompatibilidad de origen paterno y por la presencia

de anticuerpos hemoaglutinantes, leucoaglutinantes y linfocitotóxicos, entre otros. Esta inmunidad materna puede ser iniciada durante una primera preñez y aumentada en intensidad durante ésta y posteriores preñeces. Existen evidencias de la presencia en suero de preñadas, de anticuerpos dirigidos contra antígenos fetales. Es pertinente decir que los aloanticuerpos dirigidos contra aloantígenos paternos en el feto no son detectados en el suero de los niños al nacimiento, mientras que anticuerpos similares resultantes de preinmunizaciones o preñeces previas, sí se encuentran en dicho suero. Esto sugiere la existencia de un mecanismo de protección sobre bases inmunológicamente específicas (8).

#### 5. b. Linfocitos T alorreactivos maternos

A pesar de los estudios realizados no está aún claro el por qué de la sobrevivencia exitosa del feto dentro del útero materno. Sin duda alguna, las células T alorreactivas maternas resultan las poblaciones potencialmente capaces de dañar al feto, actuando como células citotóxicas efectoras, cosa que ocurre tanto en algunos casos naturales como mediante maniobras experimentales. Por lo tanto, la regulación de dichas poblaciones resultaría imprescindible para el desarrollo fetal.

Si bien dañar al feto resulta experimentalmente difícil, es posible hacerlo. La inmunización de la madre



-en determinadas condiciones- con tejidos de la cepa paterna, puede provocar daño fetal (24). Este daño fetal es causado por el pasaje transplacentario de linfocitos T alorreactivos maternos que desencadenan en el feto reacciones de injerto contra huésped (12).

En estudios realizados en nuestro laboratorio hemos mostrado que, en los primeros días de preñeces murinas alogeneicas y singeneicas, se observa en los ganglios que drenan el útero (ganglios paraaórticos), un aumento significativo de la alorreactividad T materna. Este aumento T alorreactivo existe al mismo tiempo en el bazo (179, 180). La alorreactividad se encuentra aumentada no sólo hacia los antígenos de histocompatibilidad de la cepa paterna. El aumento se registra también hacia otras cepas no relacionadas con el feto (180). Y al noveno día de preñez, los niveles alorreactivos T y la respuesta a mitógenos en los ganglios paraaórticos se encuentran disminuídos con respecto a los niveles normales (41, 90). La disminución alorreactiva opera no sólo hacia la cepa paterna sino también hacia otras cepas. Nuestra postulación (171, 173) es que el aumento temprano de los niveles T alorreactivos -en ese momento, no perjudiciales para el feto ya que éste aún no expresa antígenos mayores de histocompatibilidad- permite poner en marcha mecanismos inmunorregulatorios por parte de la madre que operen sobre estas poblaciones T. Estos hechos se correlacionan con los fuertes aumentos alorreactivos T registrados muy tempranamente durante el crecimiento

de un tumor alogeneico en condiciones experimentales que evitan el rechazo del mismo en los huéspedes (176).

En cuanto al mecanismo que induce este tipo de aumentos en los niveles alorreactivos T, se discutirá a lo largo de este trabajo.

### III. 5. c. Linfocitos T alorreactivos en la leche.

Se ha comprobado que resulta posible el pasaje de linfocitos T alorreactivos desde la leche al feto (8, 24, 200).

La hipertrofia e hiperplasia del epitelio ductal y secretorio que se producen en la glándula mamaria durante la preñez, se encuentran asociados con una conspicua infiltración linfocitaria de sus tejidos conectivo y epitelial. Linfocitos de varios tipos son ingredientes constantes de la leche y del calostro. En la mayor parte de los mamíferos el número de estas células presentes en la leche es sólo ligeramente inferior al número de leucocitos en la corriente sanguínea. Este contenido casi masivo de células leucocitarias en la leche podría hacer suponer una porosidad inevitable del epitelio alveolar. Según este supuesto, la presencia de células inmunocompetentes protegería a las mamas de las invasiones microbianas y, como resultado de esto, se ofrecería al lactante un producto más limpio. No existen, sin embargo, buenas evidencias que apoyen esta propuesta. Algunos estudios in

tentan determinar el papel que estas células pueden jugar en el lactante. Se ha podido establecer que dichas células llegan a los tejidos del lactante y pueden influenciar su reactividad inmunológica. Linfocitos aparentemente viables han sido detectados en el estómago de ratas y ratones lactantes (200). El pH del estómago de la rata al nacer es de 6.6 y se ha observado que permanece por encima de 5.0 hasta tres semanas después del nacimiento. Por otra parte se ha establecido que la leche de rata posee una alta capacidad de buffer. La actividad péptica detectada en el estómago de ratas lactantes es escasa hasta más allá de las dos semanas de vida. Se han rescatado macrófagos del estómago de ratas de una semana de edad, que presentaban una capacidad fagocítica inalterada. Otros autores demostraron que leucocitos bovinos marcados eran capaces de atravesar el epitelio del tracto gastrointestinal cuando se les daba de comer a conejos recién nacidos. Estudios realizados en humanos demostraron que las condiciones gástricas pueden no ser perjudiciales para la sobrevivencia de células en ese medio. Aunque el pH del jugo gástrico del lactante humano es de 3.5, la producción de ácido clorhídrico durante los primeros meses de vida es bastante baja. Al mamar, el pH sube en pocos minutos por encima de 6.0, para declinar recién después de un período postprandial de 3 horas.

Existen trabajos en los que se observa la inducción de reacciones de injerto contra huésped en lactan

...tes a los que se ha hecho mamar de nodrizas alogeneicas (8, 200). La utilización de ratones recién nacidos de la cepa BALB/c nu/nu, que son ratones congénitamente atímicos, ha permitido realizar experimentos que sugieren que efectivamente existe pasaje y funcionalidad de linfocitos T a través de la leche (8).

### III. 6. IDIOTIPOS EN CELULAS T ALORREACTIVAS.

Los linfocitos B y T reactivos hacia los mismos determinantes antigénicos, poseen determinantes idiotípicos muy similares (29, 30, 50). Este concepto parecería ser cierto tanto para linfocitos B y T reactivos a antígenos convencionales como para aquellos reactivos a aloantígenos (31).

Mediante el uso de anticuerpos anti-idiotípicos preparados contra receptores de linfocitos T o contra anticuerpos de la misma especificidad, se han analizado los receptores de las células T alorreactivas que expresan determinantes idiotípicos. Las características celulares de estos idiotipos son las siguientes:

1. Los linfocitos T inmunocompetentes poseen idiotipos con reactividad contra un haplotipo dado.

2. Estos idiotipos están presentes con una alta densidad en la superficie celular. Dichas densidades son comparables a las que presentan los linfocitos B, lo cual

indicaría que serían aproximadamente de  $10^4$  o más por linfocito pequeño.

3. En lo que respecta a reactividad contra antígenos de histocompatibilidad fuertes, no existe evidencia de que exista más de un grupo de receptores idiotípicos por linfocito T. Es decir, un linfocito T que reacciona contra un haplotipo dado, no reaccionará contra otros haplotipos. Si existen linfocitos con reactividad doble hacia antígenos mayores de histocompatibilidad, su frecuencia debe ser muy baja.

4. Los idiotipos con reactividad hacia aloantígenos mayores de histocompatibilidad se encuentran presentes tanto en células T normales no inmunes como sobre células T inmunes, ya sea obtenidas en cultivos mixtos de linfocitos o bien, en células T citotóxicas.

Ahora existen pruebas de que las células T colaboradoras y aquellas que se diferencian hacia células efectoras, poseen grupos diferentes de determinantes idiotípicos. Esto se demuestra mediante el uso de determinantes anti-Lyt. La absorción de un antisuero anti-idiotípico que inicialmente inhibía tanto la citotoxicidad mediada por células como el cultivo mixto de linfocitos, con células Lyt-1+ o Lyt-2,3<sup>+</sup>, resulta en un antisuero que inhibe la citotoxicidad mediada por linfocitos o el cultivo mixto de linfocitos respectivamente.

5. Estos idiotipos son producidos por los linfo

cidos T, lo que puede demostrarse mediante técnicas de marcado interno. Los anticuerpos anti-idiotípicos obtenidos ya sea contra idiotipos de células T como aquellos obtenidos contra aloanticuerpos, suprimen específicamente funciones T tales como el cultivo mixto de linfocitos (MLC), la citotoxicidad mediada por linfocitos (CMC), las reacciones de injerto contra huésped (GVH) y el rechazo de aloinjertos. También se demostró la presencia de idiotipos en células T utilizando técnicas de fluorescencia. Se determinó que alrededor del 6% de los linfocitos T de ratas normales no inmunes, expresaban receptores idiotípicos con reactividad contra un haplotipo dado.

La alta frecuencia de estos idiotipos sobre células T permitió encontrar moléculas de receptores idiotípicos en el suero de ratas normales y en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos T normales. Estos receptores poseían la capacidad de unirse específicamente al antígeno y de inhibir específicamente la unión de an ticuerpos anti-idiotípicos a los correspondientes linfocitos T.

Las moléculas aisladas de receptores T de ratas aparecen en tres formas moleculares: una estructura de dos cadenas con PM de aproximadamente 150.000, una cadena polipeptídica simple con PM 72.000 y un producto de degradación parcial de la cadena polipeptídica simple cuyo PM oscila entre 30.000 y 40.000. Las tres formas no sólo expresan determinantes idiotípicos sino que también son capaces de unirse específicamente al antígeno. Estas moléculas derivadas de linfocitos T presentan determinantes idiotípicos que también

están presentes en los correspondientes linfocitos B. Debe aclararse que lo opuesto no es necesariamente cierto.

#### IV. LINFOCITOS T REACTIVOS A ANTIGENOS CONVENCIONALES

Las células T reactivas a antígenos convencionales presentan una característica funcional que las diferencia del resto de las células que participan en la respuesta inmune. Esta característica funcional se denomina "restricción de las funciones T por el complejo mayor de histocompatibilidad" (188, 194).

##### IV. 1. RESTRICCIÓN DE LAS FUNCIONES T POR EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

Para combatir una infección el sistema inmune posee una serie de poblaciones celulares que interactúan entre sí (88).

Podemos entonces describir conceptualmente y como ejemplo qué es lo que sucede cuando el organismo es infectado por un virus (178): Los linfocitos B serán los responsables de la síntesis y producción de anticuerpos, los que fundamentalmente neutralizarán el virus circulante y los linfocitos T citotóxicos destruirán aquellas células infectadas por el virus. Existen otras poblaciones celulares que intervienen en la respuesta inmune. Para la gran mayo-

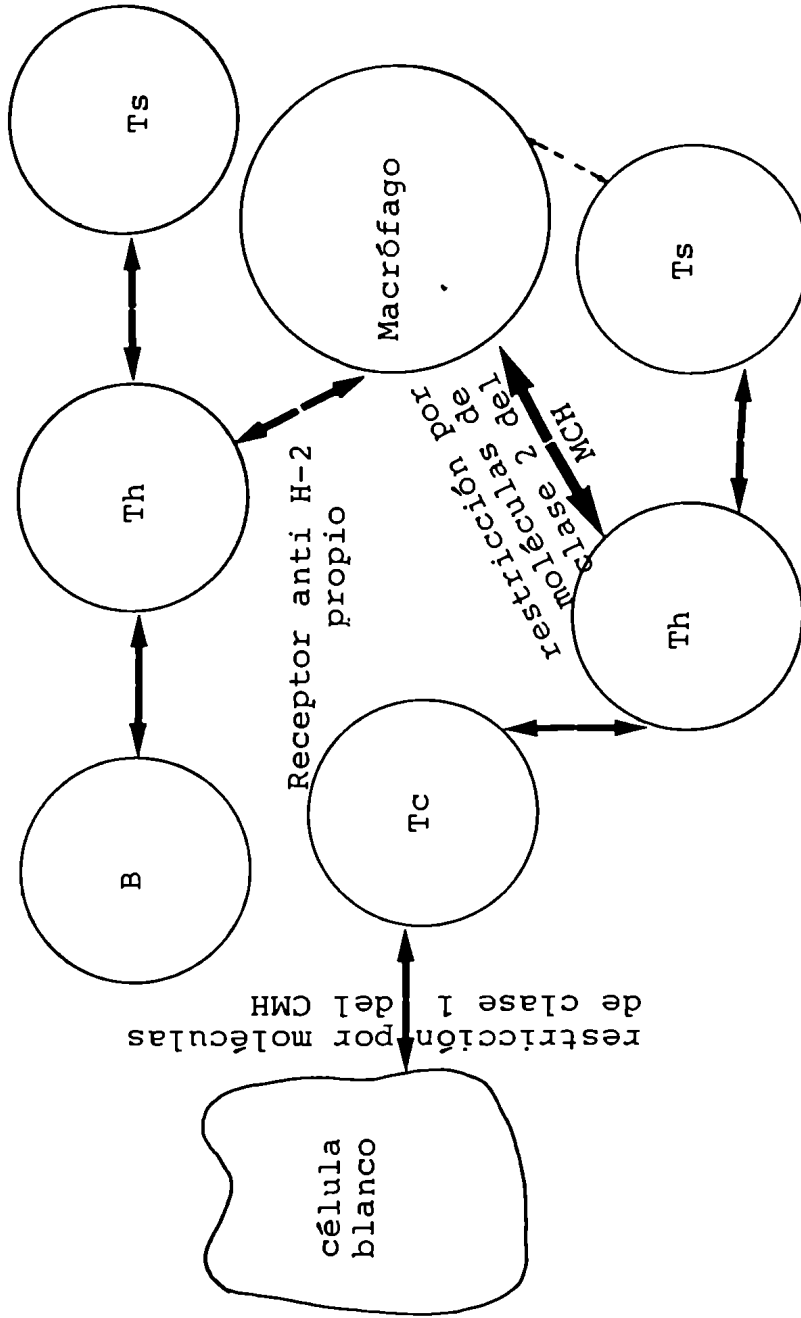
ría de los antígenos resulta necesario que las células T colaboradoras (Th) interactúen con las células B de modo que éstas puedan cumplir adecuadamente sus funciones. También es necesario que linfocitos Th interactúen con los T citotóxicos para lograr un nivel de citotoxicidad adecuado. En la mayoría de los casos, inicialmente, los macrófagos procesan al antígeno y resulta necesario que las células T colaboradoras "vean" al antígeno presentado por los macrófagos para "enterarse" de su presencia en el organismo (78). El nivel de la respuesta inmune se regula también por poblaciones T supresoras. Los linfocitos T supresores actúan por lo general a través de interacciones con los linfocitos T colaboradores.

Para que todas estas interacciones celulares se cumplan eficientemente es necesario que las células en juego compartan los mismos antígenos mayores de histocompatibilidad (188). En la Figura 13 se esquematizan las interacciones celulares citadas. Este es el concepto de lo que se denomina restricción de las funciones T por el CMH.

Así, los linfocitos T colaboradores que interactúan con los macrófagos para la presentación antigénica, poseen una doble especificidad: uno de los niveles de especificidad está dado a través de la especificidad que posee ese linfocito hacia un antígeno convencional -en este caso, los determinantes antigénicos de origen viral presentados en la superficie del macrófago- y el otro nivel de especificidad está dado por los antígenos codificados por la región I del CMH (moléculas clase 2). Esto significa que el



Figura 13

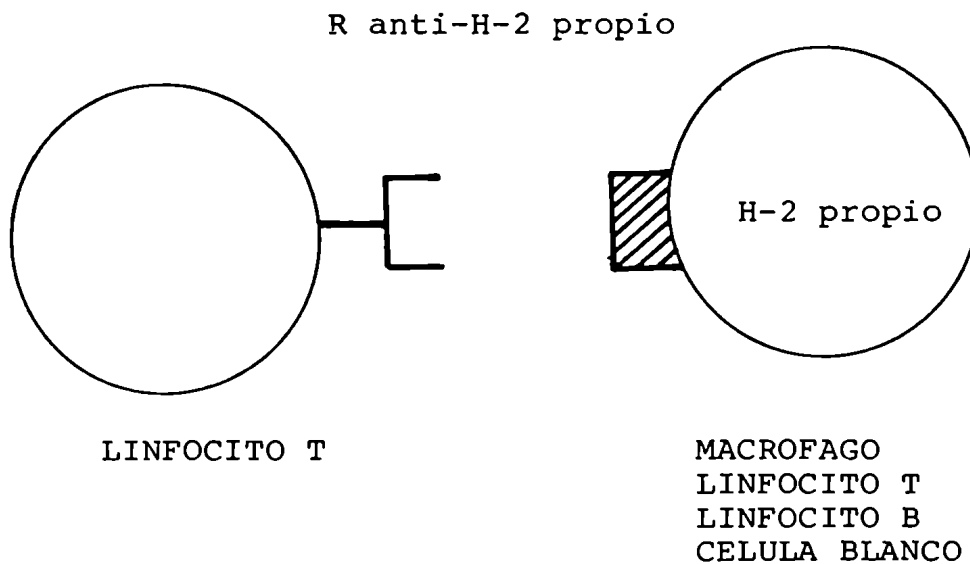


En la figura se esquematizan las interacciones celulares que ocurren en la respuesta inmune desencadenada por la infección por un virus: los macrófagos interactúan con los linfocitos Th presentándoles el antígeno viral; los linfocitos Th colaboran con los B y con los T citotóxicos (Tc). Estos últimos interactúan con la célula infectada por el virus, a la cual lisarán. Se muestra también la interacción entre linfocitos T supresores (Ts) y Th. Para que estas interacciones puedan cumplirse adecuadamente, las células T deben reconocer en la superficie de las células con las que interactúan, a antígenos mayores de histocompatibilidad propios.

linfocito T colaborador podrá "enterarse" de la presencia del antígeno sólo si éste le es presentado por un macrófago que exprese en su superficie, además de dicho antígeno viral, las mismas moléculas Ia que dicho linfocito T posee. Este doble nivel de especificidad existe también en la interacción linfocito T colaborador-linfocito B. El linfocito T colaborador específico para el carrier del antígeno solamente va a colaborar con linfocitos B que expresen su mismo antígeno Ia. El mismo tipo de restricción por moléculas Ia existe en la interacción linfocito T colaborador-linfocito T citotóxico. La interacción de los linfocitos T supresores parecería estar restringida por moléculas de la región I-J del CMH, si bien esto último es discutido por algunos autores. La interacción de los linfocitos T citotóxicos con la célula infectada -célula blanco del ataque citotóxico- se encuentra restringida por moléculas de las regiones K o D del H-2 (moléculas de clase 1). Es decir, cuando se inmuniza con un virus determinado, el individuo genera células T citotóxicas específicas para ese virus y a la vez específicas para células que expresen su mismo antígeno de histocompatibilidad K o D en su superficie. Estos linfocitos T no serán citotóxicos ni para sus mismas células infectadas con otro virus ni lo serán para células infectadas con el virus inmunizante pero que expresen moléculas K y D de otra especificidad. Las Figuras 13 y 14 esquematizan el fenómeno de restricción de las funciones T por el CMH.

El fenómeno de la restricción de las funciones T por el CMH se documentó para varias especies in vitro: ratones, ratas, humanos y pollos (22, 23, 60, 61, 91, 157,

Figura 14: RESTRICCIÓN DE LAS FUNCIONES T POR EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD.



Puesto que el linfocito T sólo interacciona eficazmente con células que posean su mismo H-2, se postula la existencia de un receptor que reconoce los antígenos mayores de histocompatibilidad propios: R anti-H-2 propio.

158, 159, 160, 206, 207). También para una variedad de situaciones in vivo: hipersensibilidad retardada (163) activación de macrófagos por células T y para células T mediando varios tipos de supresión (254). En consecuencia, la restricción de las funciones T parece ser general para las funciones efectoras testeadas en ratones y probablemente lo sea para los vertebrados superiores.

#### IV. 1. a. Restricción de la citotoxicidad mediada por linfocitos T.

En el año 1974, existían ya una serie de experimentos que evidenciaban que los antígenos de histocompatibilidad propios se encontraban involucrados en la inmunidad mediada por células (119, 123, 124, 209). En 1974, se producen una serie de experimentos que confirman plenamente dichos indicios (63, 64, 248, 258). Estos experimentos, realizados en ratones, mostraban que la actividad citotóxica de las células T contra células infectadas por el virus de la coriomeningitis estaba restringida por moléculas de clase I (K o D) del H-2. Se encontró también que las células T citotóxicas dirigidas contra células modificadas químicamente, estaban también restringidas por el H-2 (60, 208).

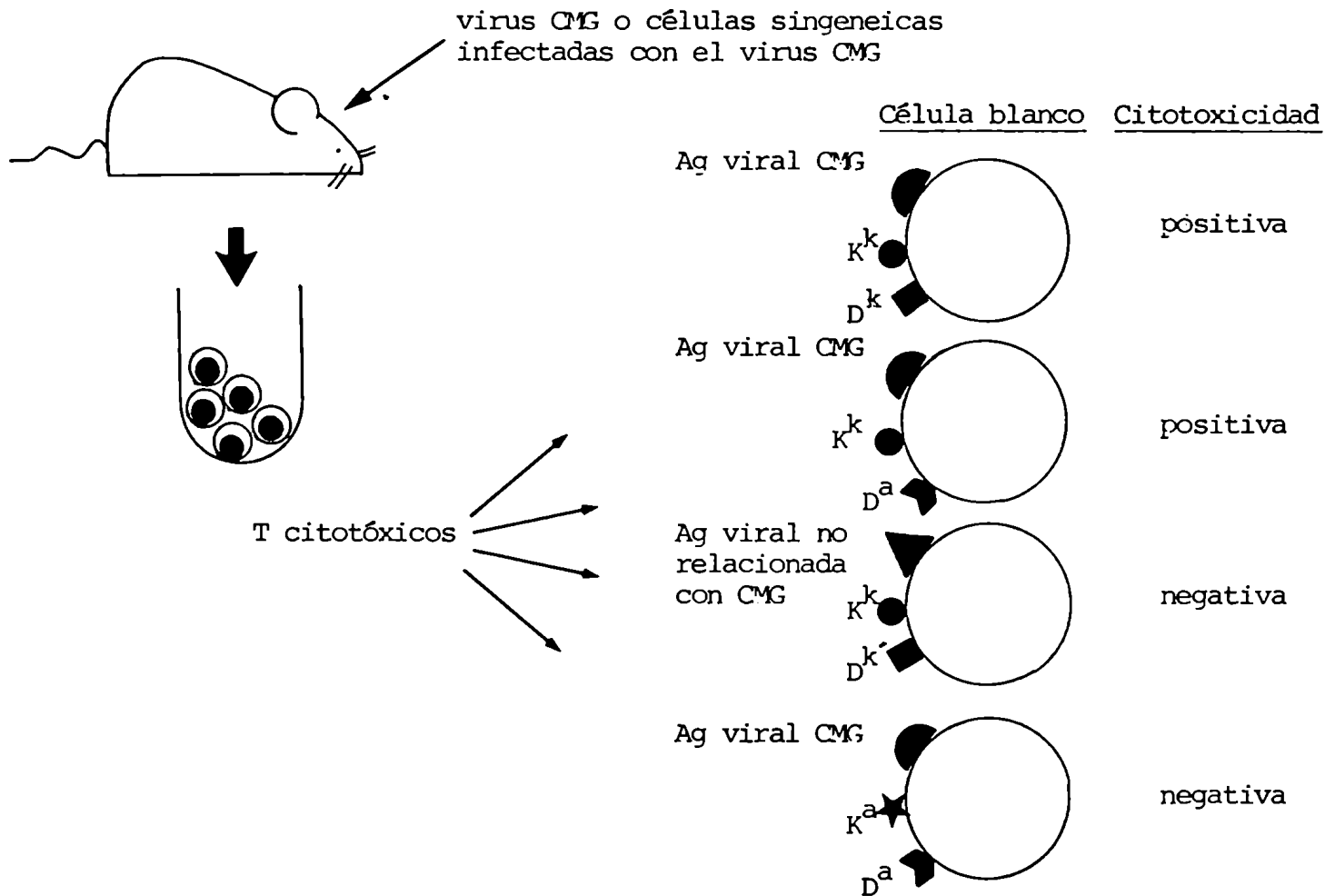
Los experimentos realizados por Doherty y Zinkernagel consistían en la inoculación de ratones de distintos haplotipos con el virus de la coriomeningitis por vía intracerebral. Algunos de ellos se sacrificaron y se testeó la actividad citotóxica de sus esplenocitos sobre células de

una línea de fibroblastos infectados con dicho virus. La línea de fibroblastos utilizada provenía de ratones de la cepa C3H (H-2<sup>k</sup>). Sorprendentemente para los autores, solamente aquellos linfocitos provenientes de ratones con haplotipo H-2<sup>k</sup> eran capaces de lisar específicamente la línea de cultivo infectada (Figura 15). Se encontró luego que el fenómeno de la restricción existía también para el virus de la ectromelia, para el Vaccinia, el Sendai, Influenza, Herpes, SV40, estomatitis vesicular y para otros virus (35, 61, 185, 254). El fenómeno se confirmó también para células modificadas por haptenes (189) y para células que diferían en antígenos menores de histocompatibilidad y contra el antígeno H-Y del macho (89, 91). Esto significa que algunas células T reconocerían al virus y a sus moléculas K propias, mientras que otras reconocerían al virus y a sus moléculas D propias. Una misma célula T no reconocería a ambas moléculas K y D propias. Este hecho se demostró también para células modificadas químicamente y para antígenos menores de histocompatibilidad (260).

#### IV. 1. b. Restricción de otras respuestas inmunes.

Posteriormente se encontró que la citotoxicidad no era la única función T restringida por el CMH (192,260). La interacción entre las células B y los linfocitos T colaboradores se encuentra restringida por moléculas de la clase 2 del CMH -antígenos Ia- (57, 119, 120). El linfocito Th "ve" al carrier en asociación o en el contexto de las moléculas de clase 2 propias. Lo que significa que una cé

Figura 15: RESTRICCIÓN DE LA CITOTOXICIDAD MEDIADA POR LINFOCITOS T



La figura muestra el tipo de experimentos que permitió establecer la existencia del fenómeno de la restricción de la citotoxicidad por el CMH: Las células Tc de un ratón H-2<sup>k</sup> inmune al virus de la coriomeningitis (CMG) son eficazmente citotóxicas sólo para células blanco infectadas con dicho virus y que pasean moléculas K o D iguales a las del ratón infectado (K<sup>k</sup> o D<sup>k</sup>).

lula Th generada en un animal dado sólo podrá colaborar eficientemente con linfocitos B que representen en su superficie antígenos de clase 2 de su mismo tipo.

La presentación antigénica por parte de los macrófagos a los linfocitos T, se encuentra también restringida por moléculas de clase 2 del CMH (57, 147, 182, 196, 209, 239). O sea que el linfocito Th que interactúa con los macrófagos que le presentan al antígeno, debe reconocer en la superficie de éste sus moléculas Ia propias.

Las interacciones entre las células Th y las células Tc, las funciones de hipersensibilidad retardada(163) y muy probablemente las interacciones entre los Th y las células T supresoras, están también restringidas por moléculas de clase 2 del CMH -subregión I-J para la supresión-(162, 224). Tal vez la función T supresora sea la única función T en la que algunos autores discuten la restricción por el CMH (165). En las Figuras 16 y 17 se esquematizan los tipos de restricción nombrados.

Las moléculas de clase 2 del CMH están codificadas por los genes denominados genes de resupuesta inmune (genes Ir) (15, 16, 18, 155, 199). Como ya hemos señalado, estos genes se encuentran ubicados en la región I del CMH.

Los genes de respuesta inmune se descubrieron aún antes de

Figura 16: RESTRICCION DE OTRAS RESPUESTAS INMUNES:  
RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS T A AGS  
PRESENTADOS EN LA SUPERIFICIE DE MACROFAGOS

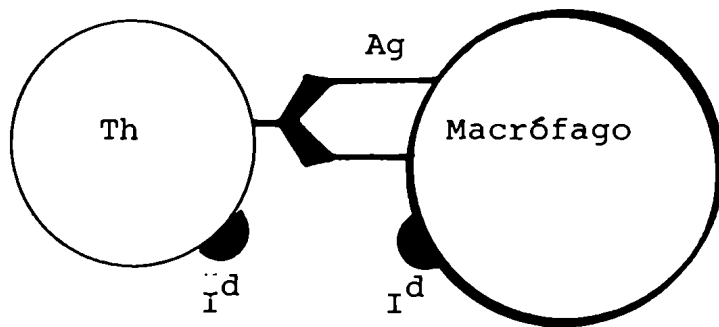
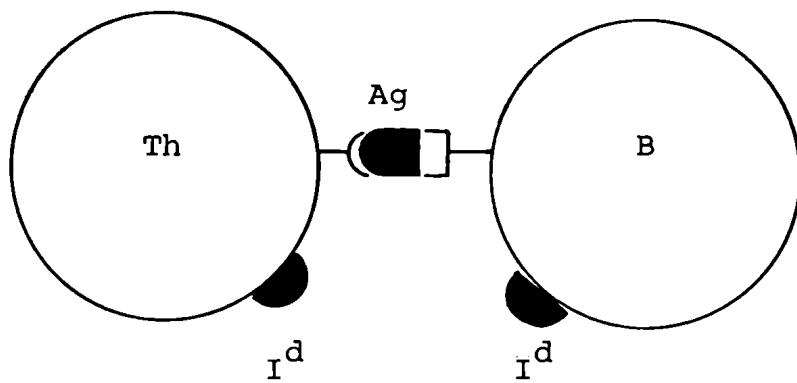




Figura 17: RESTRICCION DE OTRAS RESPUESTAS INMUNES:  
COOPERACION T-B



ser conocida su ubicación dentro del CMH.

Ciertos individuos eran malos respondedores a ciertos antígenos, otros tenían una buena respuesta al mismo. Cuando se pudo trabajar con polipéptidos sintéticos el problema pudo verse más claro ya que se evitaba la enorme complejidad de antígenos cuyos determinantes antigénicos eran demasiado numerosos y no bien conocidos. Se determinó entonces que la respuesta a la inmunización de cobayos con DNP-PLL (siendo en este caso DNP el haptene y PLL el carrier) se encontraba bajo el control de un gen autosómico simple dominante al que se denominó gen de respuesta inmune (15, 18). Aquel cobayo que poseía dicho gen -un determinado alelo de dicho gen- era buen respondedor, los que no lo poseían eran no respondedores. Posteriormente se desarrollaron dos cepas endocriadas de cobayos denominadas 2 y 13. La cepa 2 era buena respondedora al DNP-PLL y la 13 era no respondedora a dicho antígeno; el híbrido F1(2 x 13) era respondedor. Se probaron otros antígenos polipeptídicos con resultados similares.

McDevitt (155) trabajando en ratones, determinó que los genes de respuesta inmune estaban ligados al H-2, ya que segregaban siempre juntos el fenotipo respondedor y un determinado H-2. La existencia de ratones congénicos -ratones recombinantes dentro del H-2- permitió mapear los genes de respuesta inmune dentro de una nueva región del H-2 a la que se denominó región I. Mediante la utilización de estos mismos ratones congénicos, o sea ratones que diferían sólo en la región I, se prepararon antisueros inmunizándolos recíprocamente con las células linfoides de cada uno de ellos. Los antisueros así obtenidos, permitieron detectar una nueva clase de antígenos expresados en la superficie de las células B,

en la de un gran porcentaje de los macrófagos y también en un pequeño porcentaje de células T (52). Se denominó a estos antígenos, antígenos Ia. Este descubrimiento planteó el interrogante de si estas moléculas Ia son el producto de los genes Ir o sólo se encuentran asociadas a dicho gen. Numerosos experimentos realizados sugieren fuertemente que las especificidades Ia serían realmente producto de los genes de respuesta inmune.

En cuanto a la determinación de las funciones de los genes de respuesta inmune, se observó que los animales respondedores a DNP-PLL también eran respondedores a BPO-PLL -o sea, a otros haptenes unidos al mismo carrier- y que aquellos no respondedores a DNP-PLL eran capaces de fabricar anticuerpos contra el haptene DNP cuando éste se conjugaba a otro carrier. Esto permitió establecer que los genes Ir controlan la respuesta T ya que los linfocitos T colaboradores son aquellos que reconocen al carrier. Esto se vio confirmado por el hallazgo, en animales no respondedores, de células B esplénicas con receptores para el haptene y por el hecho de que los genes Ir controlan sólo la respuesta inmune a antígenos timo-dependientes.

En cuanto a cómo actuaban los genes Ir en el control de la respuesta inmune a través de los linfocitos T colaboradores, las alternativas eran fundamentalmente dos: o los genes Ir codificaban para el receptor de las células T o participaban mediante la expresión de sus productos en la superficie de macrófagos y células B. Se realizaron entonces una serie de experimentos: se tomaban células T provenientes de cobayos F1 (2 x 13) inmunizados con dos antígenos, uno de ellos, inductor de buena respuesta sólo en la cepa 2 y el otro inductor de buena respuesta sólo en la cepa 13. Se las ponía en contacto con cada uno de estos antígenos presentados o por macró-

fagos provenientes de la cepa 2 ó por macrófagos provenientes de la cepa 13, o por macrófagos provenientes de los Fl. Se vio que sólo existía respuesta cuando el antígeno se presentaba sobre macrófagos provenientes de la cepa respondedora para el mismo y por supuesto, cuando ambos antígenos se presentaban sobre macrófagos Fl. Cuando se tomaban los linfocitos T de los Fl inmunes a ambos antígenos y se los ponía a reaccionar con macrófagos Fl en presencia de ambos antígenos, la presencia de anticuerpos anti-Ia 2 bloqueaba la respuesta al antígeno al cual respondía la cepa 2 y la presencia de anti-Ia 13 bloqueaba la respuesta al antígeno al que respondían los animales de la cepa 13.

Mediante estos y otros experimentos se concluyó que:

1. Los genes Ir expresan productos -antígenos Ia- en células presentadoras de antígeno (células con morfología de macrófagos), y

2. Que las células T detectan al antígeno inmunizante en la superficie de los macrófagos y son específicas para dicho antígeno percibido en el contexto de moléculas Ia autólogas. Es decir, las células T seleccionan la respuesta inmune percibiendo al antígeno en asociación con las moléculas Ia propias.

Posteriormente, se realizaron otros experimentos tanto in vitro como in vivo que demostraron que el resto de las interacciones celulares de las células T -salvo las

de los Tc con la célula blanco- se realizaban también percibiendo al antígeno en el contexto de moléculas Ia (163).

## 2. LA HIPOTESIS DEL RECONOCIMIENTO DUAL Y LA HIPOTESIS DE LA MODIFICACION DE LO PROPIO.

A partir de los hallazgos del fenómeno de la restricción T por el CMH (193), se generaron diversas hipótesis acerca del reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T. Se postuló que los linfocitos T debían reconocer a los antígenos mayores de histocompatibilidad propios. Esto es, que debían poseer estructuras de reconocimiento -receptores- para los antígenos mayores de histocompatibilidad propios.

Las dos hipótesis más importantes conceptualmente son (260) la llamada hipótesis del reconocimiento dual y la del reconocimiento de la modificación de lo propio.

La primera de ellas establece que el linfocito T reconoce con un receptor al antígeno convencional y con otro receptor al antígeno mayor de histocompatibilidad propio. En el caso de los linfocitos citotóxicos, reconocerían por un lado al antígeno convencional (por ejemplo: un antígeno viral) y a través de un segundo receptor a las moléculas K o D propias expresadas en la célula blanco. En el caso de los linfocitos Th para la producción de anticuerpos, mediante el receptor anti-X reconocerían al carrier del antígeno cuyo haptene se une al receptor del linfocito B y mediante

el receptor anti-H-2 propio, al antígeno Ia expresado en la superficie del linfocito B.

La hipótesis del reconocimiento de la modificación de lo propio establece que el antígeno X se asocia con los antígenos de histocompatibilidad propios y forma en la superficie celular lo que se denomina un neoantígeno o neodeterminante antigénico. El linfocito T reconocería, mediante un único receptor, a este neodeterminante antigénico.

En ambas hipótesis se refleja el fenómeno de la restricción por el H-2. En la Figura 18 se esquematizan las dos hipótesis citadas.

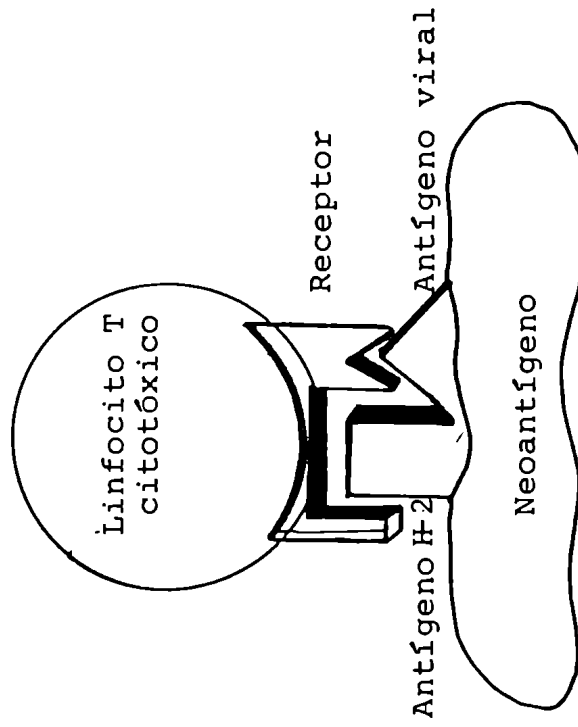
### 3. ROL DEL TIMO.

Una vez demostrado que los linfocitos T reconocen el H-2 propio en la superficie de las células con las que interactúan, se demostró que estas células T "aprenden" a reconocer como propio el H-2 expresado (146) en el epitelio tímico (131, 260). Es decir, que durante su pasaje por el timo, los precursores de los linfocitos T diferenciarían estructuras de reconocimiento para los antígenos de histocompatibilidad K, D o I expresados por el epitelio del timo (255). En otras palabras, es el H-2 del epitelio tímico el que impone la restricción.

Este hecho ha sido demostrado mediante el uso de modelos experimentales denominados quimeras (61, 253). Una

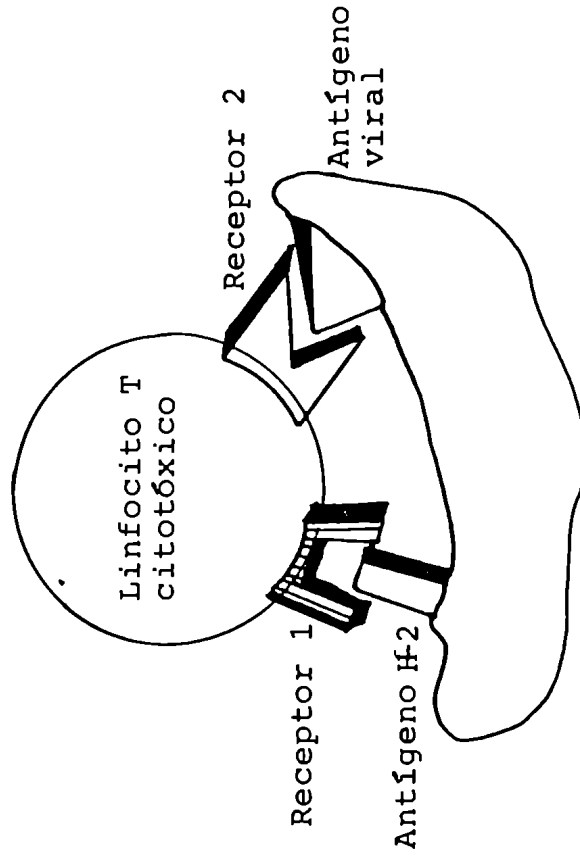
Figura 18

HIPOTESIS DEL RECONOCIMIENTO  
DE LA MODIFICACION DE LO PROPIO



AgX+H-2 propio: neoantígeno  
Receptor: codificado por genes  
Ig(V) en la mayoría  
de los modelos.

HIPOTESIS DEL RECONOCIMIENTO  
DUAL



R1: anti H-2 propio: codificado por el CMH  
R2: anti-AgX: codificado por genes Ig(V)

quimera, o un animal quimérico, es un individuo en el cual coexisten células de orígenes diferentes. Citaremos ahora algunas de las quimeras más frecuentemente utilizadas para la demostración del rol del epitelio tímico en la imposición del tipo de restricción que operará en el animal:

Si se irradia a un animal A y se lo reconstituye con médula ósea proveniente de un híbrido F1 (A x B), esta quimera poseerá células somáticas y epitelio tímico A y células linfoides F1 (A x B). Los linfocitos de dicha quimera madurarán en el contexto de un epitelio tímico A -esto es, que expresa antígenos mayores de histocompatibilidad A y reconocerán como propios los antígenos de histocompatibilidad A. Cuando estos animales son inmunizados con algún virus, por ejemplo- generarán linfocitos T citotóxicos específicos para el virus inmunizante presente en células A y no serán citotóxicos para células infectadas con el virus pero que expresen el tipo B de H-2. Si bien los precursores T provienen de un individuo genotípicamente A y B, al madurar en un timo que expresa sólo el H-2 A, aprenderán a reconocer como propio sólo el H-2 A que "vieron" en su pasaje por el timo.

Cuando se irradia un híbrido F1 (A x B) y se lo reconstituye con médula ósea de un animal A, los linfocitos -sus precursores- si bien genotípicamente A, al madurar en un timo F1 (A x B) -es decir, que expresa tanto el H-2 A como el H-2 B- adquieren la capacidad potencial de "ver" al antígeno en contexto H-2 A y también en contexto H-2 B.



Las quimeras descritas se denominan quimeras de irradiación. Existen también modelos en los que se utilizan quimeras en las que se irradia e injertan timos de diferente origen. Estos modelos son los que han permitido demostrar el rol crucial que juega el timo en la maduración del sistema inmune en cuanto a la imposición del tipo de restricción actuante. En la Tabla 3 se muestran los tipos más frecuentes de quimeras utilizadas (257).

Tal vez uno de los aspectos de mayor importancia que posee este tipo de experimentos sea que se haya visto que el reconocimiento del H-2 propio se diferencia independientemente del tipo de H-2 de las células T e independientemente del reconocimiento del antígeno -antígeno convencional- no propio. Este hecho resulta compatible con la hipótesis del reconocimiento dual, pero no excluye formalmente el modelo de reconocimiento único.

Como puede observarse en la Tabla 3, ratones A irradiados, reconstituídos con médula ósea F1 (A x B), generan células citotóxicas virus-específicas sólo para células blanco A infectadas. Pero si el animal irradiado se reconstituye con células F1(A x B) provenientes de bazo de ratones adultos, las células T citotóxicas lo serán tanto para el H-2A que vieron en el timo de la quimera, como para el H-2B que no estaba presente en dicha quimera, lo cual sugiere que las células T maduras no cambian rápidamente su especificidad para lo propio, ya que en este tipo de experimentos mantienen la restricción impuesta al pasar por el timo F1 (A x B) en el que han madurado.

Tabla 3: CUADRO DE DIFERENTES QUIMERAS (257)

Células dadoras	Receptor	Timo de la quimera	Lisis de células blanco A,B,C infectadas por virus
A x B (MO)	A	A	A
A x B (MO)	B	B	B
A x B (adultos)	A	A	A,B
A x B (adultos)	B	B	A,B
A x C (MO)	AxB	AxB	A
$K^A I^A / D^C$ (MO)	$K^A I^A / D^B$	$K^A I^A / D^B$	A
$K^C I^C / D^B$ (MO)	$K^A I^A / D^B$	$K^A I^A / D^B$	ninguna
B(MO)	A	A	ninguna
A x B (HF)	AxB	A	A
A x B (HF)	AxB	B	B

MO: células de médula ósea tratadas con suero anti- $\theta$  más complemento  
 adultos: células de bazo de animal adulto  
 HF: hígado fetal de ratones (fetos de 14-17 días)

En el timo, los precursores de las células T diferencian estructuras de reconocimiento para lo propio, específicas para los marcadores H-2K, D e I expresados por el epitelio tímico. Así, el reconocimiento del H-2 propio se diferencia independientemente del tipo de H-2 de las células T e independientemente del reconocimiento del antígeno X convencional no propio.

Puede observarse también en la Tabla 3 que quimeras de irradiación del tipo A x C en A x B, responden contra células infectadas A y no contra células infectadas B ni C. El hecho de que no se generen células citotóxicas capaces de lisar células infectadas C, no llama la atención puesto que el epitelio tímico no expresa el H-2 C. Sin embargo, sí expresa el H-2 B. A este efecto se lo denominó efecto del sistema linforreticular y se explica de la siguiente manera: las células aprenden a reconocer ambos haplotipos (A y B) expresados en el timo, como propios; sin embargo, la expresión de la citotoxicidad depende de un factor adicional. Este tipo de quimeras expresa sobre todas sus células somáticas, los haplotipos H-2 A y B, pero sus células linfoides expresan en la superficie los haplotipos H-2 A y C -y no el haplotipo B-. Cuando los esplenocitos de estas quimeras se transfieren a un F1 (A x B) infectado e irradiado, sí generan citotoxicidad para el otro tipo parental (células H-2 B)(257). Células de médula ósea F1 (A x B) que maduran en un timo A, no generan células citotóxicas específicas para targets B aunque se transfieran a F1 infectados e irradiados. Del mismo modo las células esplénicas de las quimeras F1 (A x C) en receptores F1 (A x B) no generan citotoxicidad específica contra células H-2 C aunque se transfieran a F1 (A x C).

Los estudios nombrados han permitido discutir acerca de las hipótesis de reconocimiento. Si bien los resultados obtenidos con quimeras parecerían apoyar más la hipótesis del reconocimiento dual, no es posible descartar aún la hipótesis del sitio único de reconocimiento. Los resultados podrían también interpretarse según el modelo de un único receptor: las células precursoras madurarían diferenciando receptores para los neodetermi

nantes antigénicos durante su paso por el timo, según lo propone Jerne. Por ejemplo, las células de un ratón H-2 A madurarían en contacto con el H-2 A de su timo. Las células poseerían receptores para el H-2 A propio y algunos linfocitos mutarían de modo de expresar un receptor ya no específico para A, sino específico para un determinante antigénico "levemente diferente" a A (neodeterminante antigénico). Las células T que no mutaran no serían capaces de dejar el timo -es decir, serían retenidas en él y, o bien seguirían proliferando o bien, se inactivarían-. Sólo aquellas células que hubieran mutado de modo que su especificidad de reconocimiento fuera "diferente de A" podrían dejar el timo. Hemos dicho que las quimeras de irradiación F1 (A x B) en un animal A no poseen células T capaces de reaccionar hacia células B "alteradas" -infectadas con el virus por ejemplo-. Y por esto, algunos autores sostienen que se debe introducir entonces la regla de que el espectro de especificidades anti-antígenos X generados en un timo A, no puede superponerse al generado en un timo B. Y esto parecería difícil de cumplirse en el modelo de la modificación de lo propio, por lo cual algunos autores apoyan el modelo de reconocimiento dual (256).

#### V. MODELOS DE RECEPTORES T.

Una vez establecido que los linfocitos T al pasar por el timo maduran diferenciando receptores para reconocer al antígeno (y en este caso, nos referimos al an

tígeno en su sentido más amplio, involucrando tanto a los convencionales como a los antígenos de histocompatibilidad propios y extraños) veremos cuáles son las hipótesis que existen acerca de cómo se realizaría la diferenciación de las estructuras de reconocimiento (o sea, los receptores para el antígeno) y cómo se realizaría el reconocimiento antigénico.

Existen varios modelos que intentan explicar la forma de reconocimiento que utilizan los linfocitos T. Tanto la hipótesis de reconocimiento dual como la del reconocimiento único enfatizan el hecho de que los linfocitos T deben reconocer a los determinantes antigénicos de manera diferente a la de las células B. Todos los modelos enunciados destacan el fenómeno de la restricción por el CMH. Sin embargo, como se verá, los modelos propuestos suelen contradecirse en varios aspectos.

El panorama permanece aún confuso. Nombraremos los principales modelos que se han propuesto. La mayoría de éstos han sido elaborados durante el transcurso de nuestro trabajo. Se señalará en cada uno de ellos, si plantean superposición o no de las poblaciones T alorreactivas y las reactivas a antígenos convencionales, por ser ésta una de las preguntas centrales que nos hemos planteado a lo largo de este trabajo.

#### V. 1. MODELO DE JERNE.

El modelo propuesto por Jerne (114) posee la vir

tud de haber predicho el papel del timo en la selección de las especificidades de las células T. Su hipótesis influyó fuertemente en la realización de los experimentos que demostraron el rol que juega el timo en la maduración del sistema inmune.

Para elaborar su hipótesis, Jerne parte del postulado fundamental de la teoría de la selección clonal. Esta teoría postula que los linfocitos están precomisionados y restringidos a la síntesis de moléculas de "anticuerpos" de una única especificidad. Esto significa que un antígeno dado puede estimular solamente a aquellos linfocitos que hayan sido precomisionados para interactuar con dicho antígeno o sea, con células que expresen receptores específicos para él. Asume que la diferenciación de las células germinales, que darán lugar a linfocitos T maduros, involucraría:

1. la modificación de genes de la línea germinal por mutaciones somáticas y
2. la selección de aquellas células que sufrieron los procesos mutacionales. Sostiene que este proceso ocurre principalmente en el timo:

"Como en la teoría de la selección clonal, la presión de selección se supone provista por los antígenos pero, puesto que las células sensibles a los antígenos extraños deben surgir antes de que dichos antígenos extraños aparezcan, la presión de selección para generar el sistema debe ser ejercida por los antígenos del mismo

animal" (114).

El modelo propuesto por este autor toma como punto de partida un conjunto de receptores T heredado, cada uno de ellos específico para una forma alélica de uno de los antígenos mayores de histocompatibilidad de la especie. El repertorio total de receptores reflejaría el grado de polimorfismo de los antígenos mayores de histocompatibilidad de la especie. Las células que posean receptores para aloantígenos del CMH no propios no serían ni eliminadas ni retenidas en el timo y emergerían de él en las altas proporciones esperadas para los productos de genes estructurales de la línea germinal. Estos clones de células explicarían la alta frecuencia de las células T alorreactivas. Las células que expresaran receptores anti-antígenos mayores de histocompatibilidad propios, serían eliminadas en el timo a menos que sufrieran mutaciones. De esta manera, postula que rápidas mutaciones somáticas generarían el repertorio total de receptores para todos los antígenos extraños convencionales a partir de los genes heredados para los receptores anti-antígenos mayores de histocompatibilidad propios.

Más tarde -una vez probado el rol del timo y la restricción de las funciones T por el CMH- Jerne y sus colaboradores modifican su teoría (240). Esta modificación involucra a dos receptores anti-antígenos mayores de histocompatibilidad propios idénticos. Los pro

cesos mutacionales y de selección actuarían sólo sobre uno de ellos.

Como puede verse este modelo implica que las poblaciones T alorreactivas y aquellas reactivas a antígenos convencionales serían poblaciones separadas. La alta frecuencia de las células T alorreactivas es explicada por provenir de genes estructurales presentes en la línea germinal.

## V. 2. MODELO DE BINZ, WIGZELL Y JANEWAY.

En este modelo (112, 113, 241) se plantea que las poblaciones T alorreactivas y las reactivas a antígenos convencionales se encuentran superpuestas.

El reconocimiento de los antígenos x (convencionales) y el de los antígenos mayores de histocompatibilidad propios, reflejaría la presencia de dos receptores diferentes sobre cada célula T. Al sitio receptor dirigido contra antígenos convencionales x lo denominan receptor 1 (R1) y al sitio receptor dirigido contra los antígenos mayores de histocompatibilidad propios, receptor 2 (R2). Las reacciones T hacia antígenos convencionales en el medio ambiente propio, requeriría la unión de dicho antígeno x al R1 y la unión del antígeno mayor de histocompatibilidad propio al R2. Cada una de estas dos interacciones por sí solas, no produciría activación celular; para que ésta se produjera se necesitarían ambas interacciones.



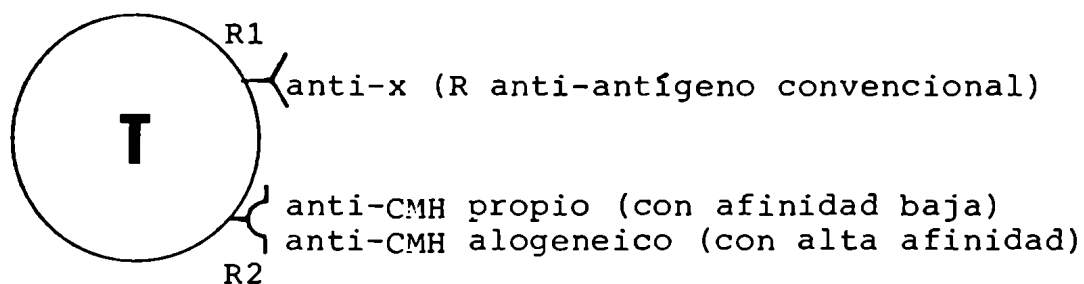
Esta hipótesis plantea que el R2 (al igual que el R1) estaría codificado por los genes VH. Así, las células T tendrían productos de dos genes VH diferentes sobre su superficie y no expresarían la exclusión alélica de los genes VH que se observa en las células B.

El hecho de que el R2 reconozca y se una a los antígenos mayores de histocompatibilidad propios con una afinidad demasiado baja como para llevar a la activación celular, resulta una postulación necesaria para evitar la estimulación T perpetua y reacciones T autoinmunes patológicas. Se postula que este R2 se une sin embargo, con una alta afinidad a ciertos antígenos mayores de histocompatibilidad de animales relacionados, especialmente dentro de la especie.

En este modelo, entonces, lo que se propone es que el reconocimiento de los antígenos mayores de histocompatibilidad extraños estaría mediado por el mismo R2. Y, entonces, este R2 sería el responsable de las reacciones hacia los antígenos CMH extraños; por ejemplo, cultivo mixto de linfocitos, reacciones de injerto contra huésped, etc.

En la Figura 19 se esquematiza cómo sería la célula T según el modelo descrito. La función normal del R2 -en su medio natural- es unirse con baja afinidad a los antígenos mayores de histocompatibilidad propios. El hecho de que el mismo receptor sea capaz de unirse con alta afinidad a algún antígeno mayor de histocompatibilidad ex

Figura 19: MODELO DE JANEWAY Y COLABORADORES



La figura esquematiza cómo sería una célula T periférica madura según el modelo de Janeway y colaboradores

Ambos receptores estarían codificados por genes VH, presumiblemente de ambos cromosomas. El receptor 1 (R1) reconocería antígenos x convencionales. El receptor 2 (R2) reconocería un antígeno CMH propio con baja afinidad, pero sería capaz de reconocer algún antígeno CMH extraño con afinidad alta.

Como puede observarse, según este modelo, las poblaciones T alorreactivas y aquellas reactivas a antígenos convencionales en contexto de los antígenos CMH propios, estarían superpuestas.

traño, se apoya en la similitud bioquímica de los diferentes alelos de los antígenos CMH de la especie.

Considerando que cada célula T poseería dos receptores sobre su superficie, cada uno de ellos codificado por genes VH y asumiendo que la expresión de estos genes VH sea al azar en los timocitos, se postula lo siguiente: las células T expresarían sus receptores de superficie durante su pasaje por el timo; si en ese momento, encuentra y se une con alta afinidad al antígeno (con afinidad suficientemente alta como para que, normalmente, se activara) se inactiva. Puesto que pocos antígenos extraños penetran en el timo, esta postulación significa que sólo las células que posean receptores de alta afinidad para sus propios antígenos de histocompatibilidad se inactivarían.

Este tipo de situación -dicen los autores- ha sido demostrada para células B y fue sugerida para células T por Jerne.

Durante el desarrollo de las células T dos tipos de selección actuarían entonces sobre la reactividad hacia los antígenos mayores de histocompatibilidad propios (114):

1. una selección negativa contra cualquier célula T que pudiera ser estimulada directamente por los antígenos propios ya sea por tener un sitio receptor de alta afinidad para éstos o por tener dos sitios receptores de afinidad baja, para los mismos.

2. una selección positiva para cualquier célula T que tuviera una afinidad baja para sus antígenos CMH propios sólo en uno de sus sitios receptores.

Según el modelo que estamos desarrollando, al menos cuatro tipos de células T antígeno-específicas resultan genéticamente posibles pero sólo uno de ellos sería funcional en circunstancias normales. Células con uno (o dos) receptores de alta afinidad para los antígenos CMH propios podrían surgir, pero serían rápidamente inactivadas al encontrar en el epitelio tímico sus propios antígenos CMH. Un segundo tipo celular, poseedor de dos receptores de baja afinidad para los antígenos CMH propios -dos R2- sería también inactivado al encontrar los antígenos CMH propios en el epitelio tímico. Un tercer tipo de células poseería dos R1, cada uno de ellos, dirigido hacia diferentes antígenos x: los autores del modelo afirman que este tipo celular no sería activado ya que muy difícilmente encontraría ambos antígenos en unión estable. El cuarto tipo celular citado sería aquel que llevara un R1 dirigido contra un antígeno x y un R2 dirigido contra los antígenos CMH propios -ambos de baja afinidad: estas células emergerían del timo y pasarían a ser las células T funcionales.

Uno de los problemas que presenta esta hipótesis consiste en lo siguiente: si las moléculas de R2 poseen una alta afinidad para un antígeno CMH extraño particular y una afinidad baja para los antígenos CMH propios, por qué no poseen también una baja afinidad para otros antígenos CMH no propios?. Los autores dan dos respuestas a esta pregunta: la primera, es que en realidad, algunas moléculas de R2 sí se unirían a antígenos CMH no propios con baja afinidad

como parecerían indicar algunos resultados. Agregan que en la mayoría de los sistemas experimentales, esta reactividad cruzada podría estar enmascarada por fuertes reacciones alogeneicas. Como segunda respuesta, sugieren que sólo unos pocos genes VH poseerían la afinidad correcta para fabricar moléculas de R2. Esto es, sólo unos pocos genes VH codificarían para R2 con características correctas de afinidad para el antígeno CMH propio. Así, la mayoría de las células que emergerían del timo, serían células que llevarían dos moléculas de R1. Entre estas células existirían algunas que podrían poseer moléculas efectivas de R2 para antígenos CMH no propios, aunque nuevamente, este evento resultaría poco frecuente. La propuesta es que existiría una selección post-tímica para las células que expresen esos pocos productos de los genes VH que puedan constituir moléculas efectivas de R2 en ese animal. Este evento estaría dado por el antígeno en presencia del antígeno CMH propio. Es así como durante el desarrollo post-tímico, el pool de células T emergentes se vería "empujado" a dejar el tipo de células T que se observan en la experimentación.

La razón de la alta frecuencia de células T alorreactivas idiотipo-positivas sería que el R2 está seleccionado para unirse a un rango muy limitado de moléculas de antígeno con una afinidad precisamente definida. La baja frecuencia de los genes VH seleccionados post-tímicamente y la selección misma para productos efectivos de R2 estaría ilustrado por la ausencia de timocitos con idiотipo Lewis anti-DA que estos mismos autores, encuentran en ratas de la cepa Lewis.

En cuanto al R1, sus idiotipos estarían en baja frecuencia sobre las células T. El receptor detectado por Eichmann y Rajew

sky, sería un ejemplo de esta afirmación.

Los autores consideran que este modelo parece explicar los datos que se conocen acerca del reconocimiento T. Por ejemplo, se ha demostrado que los híbridos F1 poseen dos poblaciones diferentes de linfocitos T que responden a antígenos no CMH. Una de estas poblaciones reconoce al antígeno en presencia de los antígenos CMH de uno de los padres y la otra, lo reconoce en presencia de los antígenos CMH del otro padre.

von Bohemer y cols. han mostrado que células T que se han diferenciado a partir de células germinales de la médula ósea en presencia de antígenos CMH extraños, son capaces de cooperar con células B que poseen esos mismos antígenos CMH no-propios. De acuerdo a estos autores, esto se debería a la diferenciación selectiva de células T con moléculas de R2 de baja afinidad para los antígenos CMH apropiados. Similares experimentos con quimeras llevados a cabo por varios grupos, han mostrado que el mismo proceso de adaptación se aplica a la generación de células T citotóxicas específicas para targets propias o no propias modificadas por antígeno.

El hecho de que células T activadas por antígenos CMH extraños sean capaces de matar células propias modificadas, se explicaría también según la presente hipótesis: El R1 presente sobre células T alorreactivas puede poseer virtualmente cualquier especificidad incluyendo aquella para la modificación específica sobre las células targets mientras que las moléculas del R2 de estas células tendrían alta afinidad para los antígenos CMH estimulantes extraños y baja afinidad para los antígenos CMH propios. El hallazgo posterior de que estas células citotóxicas pueden bloquearse sólo

con las células estimuladoras originales no modificadas o por las células propias específicamente modificadas, otorgaría mayor peso a este argumento.

En cuanto al papel de los genes de respuesta inmune (Ir)(17), los autores sugieren que el producto del gen Ir funcionaría como un segundo sistema de reconocimiento, con algún grado de especificidad, primariamente en los macrófagos. La mayoría de los animales no respondedores para un antígeno particular poseerían productos del Ir incapaces de asociarse efectivamente con dicho antígeno. Al no existir una asociación estable con el producto del Ir, no ocurriría unión estable del antígeno al R1 y del producto del Ir al R2 y las células T no podrían entonces, responder. Así lo que sería un defecto en el sistema de reconocimiento por los macrófagos aparecería como un defecto en la reactividad de las células T.

De esta manera, los autores sostienen que el reconocimiento del antígeno por parte de la célula T, con excepción de las reacciones a antígenos CMH no propios, se realizaría mediante la unión del antígeno, con baja afinidad, a uno de los receptores de la célula T -el R1- y la unión de los antígenos CMH propios a un segundo receptor presente en la superficie de la célula T -el R2- también con una afinidad relativamente baja. Uno de los puntos cruciales de esta hipótesis es que las células T alorreactivas se unen con alta afinidad a los aloantígenos CMH mediante el R2, el que poseería además, una afinidad significativa hacia los antígenos CMH propios.

Las especificidades predichas por esta hipótesis podrían representarse a modo de ejemplo, por matrices del tipo de la Figura 20 (113).

Esta hipótesis predice que las células seleccionadas por la posesión de un idiotipo del R1, serán alorreactivas.

### V. 3. MODELO DE WILLIAMSON.

En este modelo (245) no se requiere la invocación de mutaciones somáticas -como ocurre en el propuesto por Jerne- sino que se enfatizan los mecanismos de expansión clonal. Intenta explicar las bases para el aprendizaje del reconocimiento de lo propio desde el fenotipo tímico más que desde el genotipo de la célula pre-T. Se propone que el genotipo de la célula pre-T contiene la información para la aparición de un receptor que pueda reconocer aloantígenos CMH como propios. Este receptor no es una molécula de anticuerpo.

El modelo toma como punto de partida, la hipótesis del reconocimiento dual y establece que dicho reconocimiento dual es efectuado por dos repertorios de receptores diferentes, codificados por grupos separados de genes. Uno de estos receptores estaría codificado por la región variable de las inmunoglobulinas y abarcaría el mismo repertorio y reglas de expresión similares a las de los receptores de las células B. El segundo grupo de receptores estaría co-



Figura 20: MATRIZ DE ESPECIFICIDADES T SEGUN EL MODELO DE JANEWAY Y COLABORADORES

Especificidades R-2 para células T periféricas maduras H-2 <sup>b</sup>		Especificidades del R1: baja afinidad para el antígeno convencional					
anti-CMH propio (baja afinidad)	anti-CMH Alo (alta afinidad)	TNP	Flu	NIP	GRC	H-Y	DNP
K <sup>b</sup>	K <sup>x</sup>	+	+	+	+	+	+ ...
A <sup>b</sup>	A <sup>f</sup>	+	+	+	+	+	+ ...
A <sup>b</sup>	A <sup>d</sup>	+	+	+	+	+	+ ...
D <sup>b</sup>	D <sup>d</sup>	+	+	+	+	+	+ ...
K <sup>b</sup>	K <sup>s</sup>	+	+	+	+	+	+ ...
A <sup>b</sup>	A <sup>y</sup>	+	+	+	+	+	+ ...
A <sup>b</sup>	A <sup>q</sup>	+	+	+	+	+	+ ...
A <sup>b</sup>	A <sup>z</sup>	+	+	+	+	+	+ ...
K <sup>b</sup>	K <sup>k</sup>	+	+	+	+	+	+ ...
D <sup>b</sup>	A <sup>k</sup>	+	+	+	+	+	+ ...
D <sup>b</sup>	K <sup>q</sup>	+	+	+	+	+	+ ...
A <sup>b</sup>	A <sup>x</sup>	+	+	+	+	+	+ ...
K <sup>b</sup>	K <sup>p</sup>	+	+	+	+	+	+ ...
		⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

La matriz representa un ejemplo de especificidades potencialmente presentes en células T maduras de un ratón H-2<sup>b</sup>. Cada célula T estaría representada por una cruz en la matriz. Los autores aclaran que no todas las especificidades señaladas podrían ser activadas ya que las asociaciones entre el antígeno convencional con el antígeno CMH propio podrían estar, a su vez, restringidas. (112).

dificado en otro lugar del genoma: cada animal poseería genes capaces de reconocer el repertorio de aloespecificidades antigénicas del CMH de la especie. Así, receptores  $R_1; R_2; R_3 \dots R_n$  reconocerían respectivamente los antígenos CMH  $H_1; H_2; H_3 \dots H_n$ . Se supone que estos genes que codifican para estos receptores, a los que denominaremos R anti-H constituyen una familia multigénica presente en todos los miembros de la especie. Se postula que la expresión de estos genes se limita a un solo gen por haplotipo en cada célula y no se requiere exclusión alélica. Así, en las células pre-T se expresarían dos receptores R anti-H seleccionados al azar del repertorio heredado. En la Figura 21, se muestra una matriz simplificada de especificidades.

La combinación de los receptores R anti-H sobre la célula pre-T sería en orden de frecuencia:

1. ambos específicos para aloantígenos CMH (R anti-aloH);
2. uno específico para un antígeno CMH propio (R anti-H propio) y el otro específico para un aloantígeno CMH, y
3. ambos específicos para antígenos CMH propios.

Estas células pre-T interactuarían con los antígenos CMH del epitelio tímico. La presencia de al menos un receptor R anti-H propio en estas células permite la interacción con los antígenos CMH propios. Esta interacción daría lugar a un estímulo proliferativo (ver Figura 22).

Figura 21: MODELO WILLIAMSON: MATRIZ DE ESPECIFICIDADES

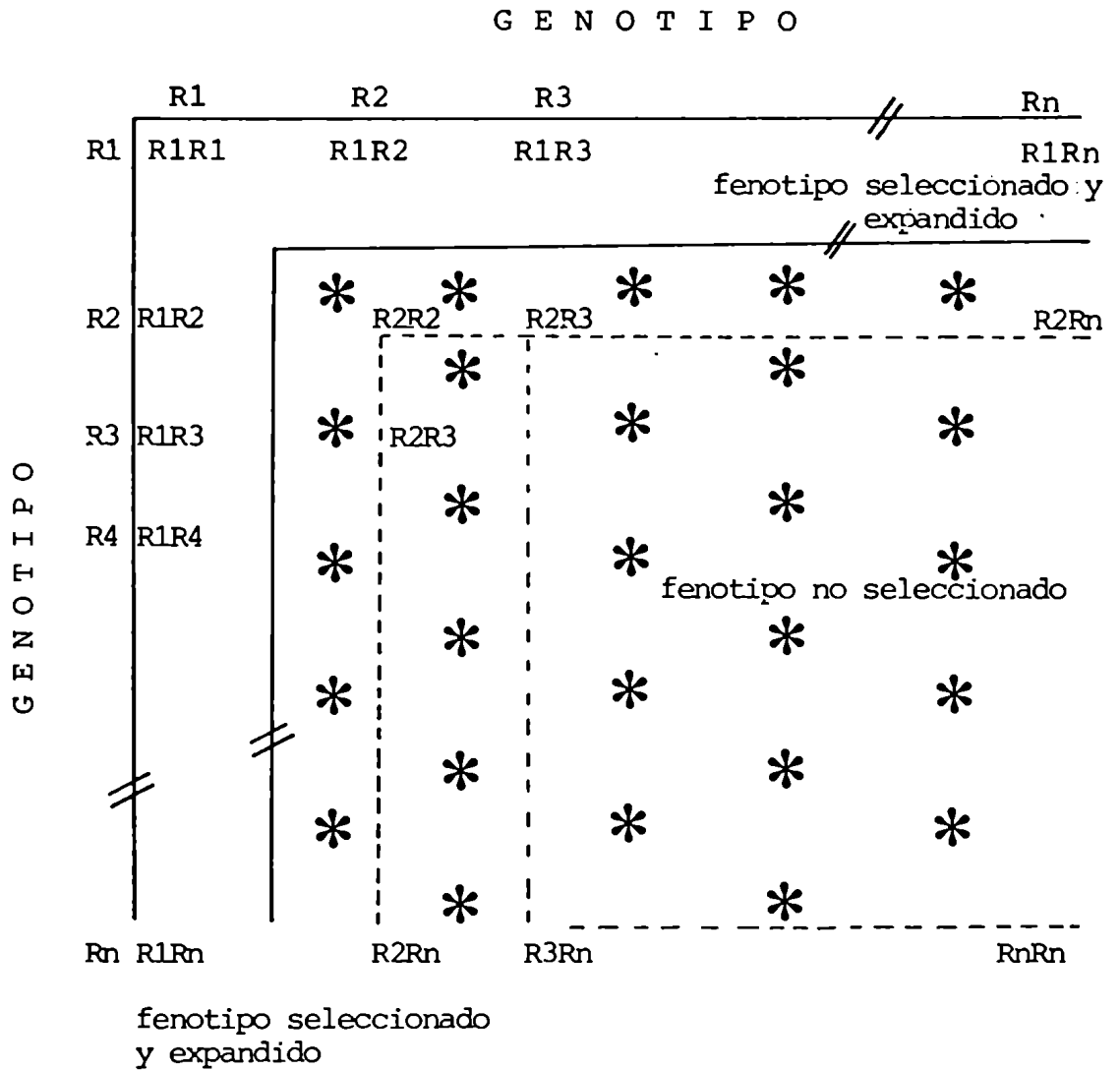
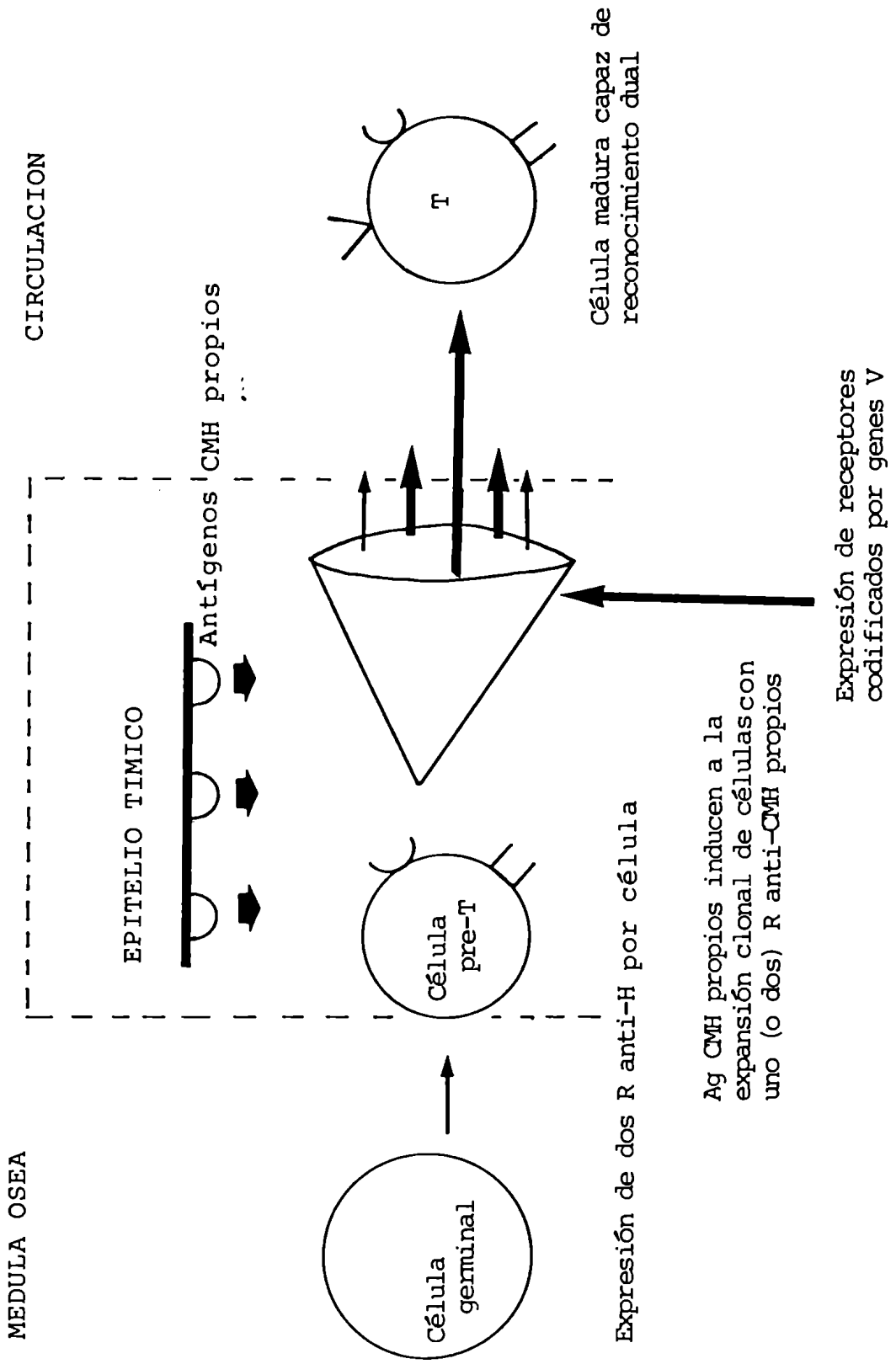


Figura 22



La expansión clonal de las células generaría células T maduras todas las cuales, llevarían un R anti-H propio. A causa de la expresión diploide al azar de las moléculas R anti-H, la población de células T expandida estará subdividida en aproximadamente n proporciones iguales, en n clones que llevarán o un segundo R anti-H propio o un R anti-aloH. Las células pre-T que no expresen al menos un R anti-H propio no recibirían el estímulo proliferativo dado por el epitelio tímico y o bien, serían eliminadas o se diluirían.

Durante la expansión clonal dada por la interacción de R anti-H propio con un antígeno CMH propio, cada célula se comisionaría para la expresión de un receptor particular anti-antígeno x (receptor V anti-x) usando el mismo repertorio de genes V que codifican para los receptores de la célula B (Figura 22). En este modelo no se discute si sólo los VH o también los VL contribuyen a la formación de este receptor. Cuando las células T expresan este receptor anti-x codificado por los genes V, dejarían de ser sensibles al estímulo proliferativo del timo que provoca la expansión clonal vía el receptor R anti-H propio. Esto se explica postulando una interacción entre ambos tipos de receptores: R anti-H y V anti-x. El acoplamiento de ambos tipos de receptores aseguraría que a partir de ese momento se necesiten dos señales para estimular a la célula a proliferar.

Cada célula T madura que entra a la periferia

poseería tres receptores: 1. R anti-H propio; 2. R anti-aloH- un porcentaje de estas células (número de especificidades CMH de la especie/n%) llevaría un segundo R anti-H propio y, 3. un receptor V anti-x.

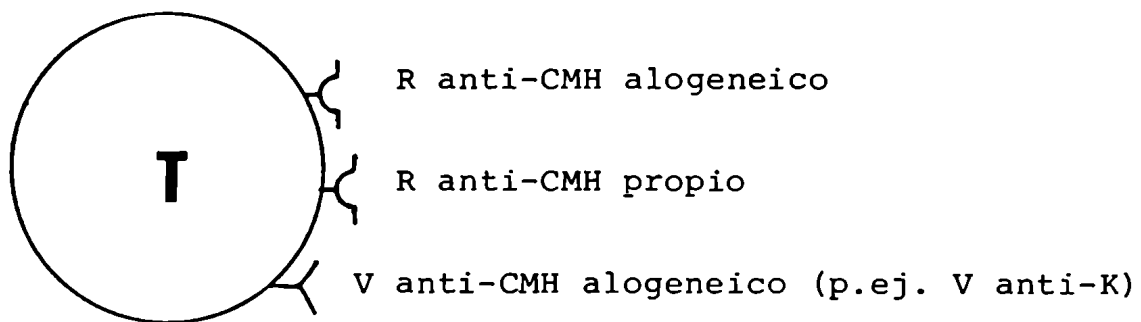
La familia de multigenes que codificaría para los receptores R anti-H no estaría codificada por el CMH pero la expresión de estos genes estaría controlada por los antígenos CMH de manera que parecerían estar codificados por el CMH. Esto es, puesto que la expresión de los receptores para los antígenos CMH propios estará seleccionada por los antígenos CMH del epitelio tímico, parecerá que el CMH codifica para este receptor T.

En este modelo, las células reactivas a antígenos convencionales si bien poseerían receptores R anti-aloH, no serían alorreactivas. Las células alorreactivas necesitarían poseer un receptor R anti-aloH (K, D o I) junto con receptores V específicos para diferencias en aloantígenos (Figura 23). En el caso de respuestas limitadas a diferencias en los loci K o D, la frecuencia de las células reactivas no debería ser mayor que las frecuencias de las células reactivas a x.

El autor sostiene que muchas medidas de alorreactividad han sido realizadas utilizando cepas de animales que difieren en múltiples loci de histocompatibilidad -mayores y menores- y en estos casos, se activarían proporciones mucho mayores de células T portadoras de moléculas R anti-aloH a causa de que el repertorio de receptores V específicos para

Figura 23: MODELO DE WILLIAMSON

Célula T alorreactiva según el modelo de Williamson



La figura esquematiza cómo sería una célula T alorreactiva según el modelo planteado por Williamson en 1980. En este modelo, las células T alorreactivas necesitarían poseer un receptor R anti-CMH alogeneico (K, D o I) junto con receptores V específicos para antígenos CMH alogeneicos. Las células reactivas a antígenos convencionales poseerían el receptor R anti-CMH alogeneico, pero un receptor V anti-X, y no serían alorreactivas.

otras diferencias antigénicas serían susceptibles a la estimulación de una manera similar a la del reconocimiento dual. Esto es, se estimularían también células poseedoras del R anti-H extraño más el receptor V anti-antígenos de histocompatibilidad menores y esto, haría parecer que la frecuencia de reactividad hacia diferencias en antígenos K o D fuera mayor que la que en realidad existe.

#### V. 4. MODELO DE BEVAN.

Este modelo (20, 154) de receptores T se basa en la hipótesis de la modificación de lo propio y fue propuesto para explicar la alta frecuencia de las células T alorreactivas.

Así como en la hipótesis de la modificación de lo propio, el CMH propio influenciaría la inmunogenicidad del antígeno x -formando el neodeterminante antigénico- las células T alorreactivas no verían aisladamente al antígeno CMH extraño, sino que lo verían en combinación con muchos otros componentes de la superficie celular. La gran frecuencia de linfocitos T que responden a células alogeneicas sería entonces, función del número de antígenos que están reconociendo en las células extrañas. Los autores sostienen que, si las células T citotóxicas específicas para productos no codificados por el complejo mayor de histocompatibilidad -por ejemplo, para antígenos menores de histocompatibilidad- reconocen no sólo el componente no CMH sino también el antígeno CMH, entonces, y como corolario, la



célula citotóxica específica para un antígeno CMH podría estar reconociendo antígenos "de interacción" creados por la interacción del antígeno CMH extraño con otros componentes de la superficie celular. Esto es, las moléculas de antígeno CMH extrañas serían vistas en combinación con otros componentes de la superficie celular formándose miles de antígenos "de interacción" que estimularían entonces a un gran número de linfocitos.

Las células poseerían un único receptor y el sitio de combinación que une, por ejemplo, al neoantígeno CMH propio más antígeno menor de histocompatibilidad extraño sería el mismo que se uniría a un neoantígeno CMH extraño más antígenos menores de histocompatibilidad propios.

El modelo implica entonces que las células T alorreactivas pertenecen a la misma población que aquellas que responden a los antígenos CMH propios más x, y que se utilizan receptores similares en ambas reacciones.

#### V. 5. MODELO DE BENACERRAF.

Benacerraf y colaboradores modificaron la hipótesis originalmente enunciada por Jerne: los precursores de las células T en el timo con receptores para antígenos CMH propios son selectivamente estimulados para proliferar y mutar sus receptores de modo que no reaccionen ya

con alta afinidad con los productos CMH propios, sino que ahora reaccionan con alta afinidad con antígenos CMH propios modificados los cuales coincidirían con los antígenos CMH alogeneicos. Estas células son las que dejarían el timo como células T maduras.

Esta hipótesis (15, 16) postula superposición de las poblaciones T alorreactivas y las reactivas a antígenos convencionales y en ella, no se intenta explicar la reactividad de las células T para antígenos convencionales en conjunción con los antígenos CMH.

En este modelo, entonces, el reconocimiento de los antígenos CMH propios estaría mediado por la misma estructura de reconocimiento que la que reconoce a los antígenos CMH no propios.

Las células T que hubieran mutado de modo de poseer receptores con baja afinidad para los antígenos CMH propios, madurarían en el timo y saldrían de él como células funcionales. Estos mismos receptores poseerían alta afinidad para variantes de los antígenos CMH propios. Estas variantes serían semejantes a los antígenos CMH alogeneicos expresados por la especie. Simultánea e independientemente, estas células T desarrollarían receptores para determinantes expresados en antígenos convencionales timo-dependientes.

El alto grado de reactividad hacia los antígenos CMH alogeneicos y la reactividad más baja que se en

cuentra hacia los antígenos CMH xenogéneos -o sea de otra especie- se explicaría por el hecho de que debería esperarse que receptores con baja afinidad para los antígenos CMH propios reaccionen óptimamente con antígenos CMH alogéneos, pero mucho menos con los CMH xenogéneos. Según Benacerraf, esto explicaría la paradoja de que las respuestas T más fuertes no estén desencadenadas por antígenos más alejados filogenéticamente del respondedor.

El autor afirma que se pueden hacer dos predicciones en base a esta teoría: a) que los clones de células T inducidas por antígenos CMH xenogéneos deberían poseer una alta reacción cruzada con antígenos CMH alogéneos, aún al extremo de que puedan desencadenar una respuesta heteróclita. El autor sostiene que este hecho ha sido demostrado (43) ya que linfocitos de ratón estimulados por células de rata mostrarían especificidad para aloantígenos H-2 y b) que las células T alorreactivas deberían poseer una alta reacción cruzada con células singéneas modificadas. Este segundo punto recibiría apoyo de algunos experimentos realizados por el autor (148). El postulado de que las células T alorreactivas son generadas a partir de células T que se diferencian en el timo siendo fuertemente reactivas para variantes de antígenos CMH propios, lleva a esperar, también, que la inmunización con células singéneas infectadas con virus deberían estimular clones de células T reactivas no sólo a células singéneas infectadas con el virus, sino también reactivas hacia células alogéneas no infectadas.

## V. 6. OTROS MODELOS.

Los modelos propuestos son varios. El conjunto de ellos presentan alternativas sumamente contradictorias. No hemos citado todos los propuestos hasta el momento, sino aquellos que consideramos más representativos de las preguntas que, actualmente, se plantean en el campo de la inmunología. Existen también postulaciones teóricas que, a nuestro entender, se contradicen con hechos que poseen una base experimental que aparece hasta ahora, sólida(47). Algunos de los modelos no descritos proponen una alternativa que no quisiéramos dejar de citar: el receptor T estaría en ellos codificado por genes denominados VT, diferentes de los loci VL y VH que codifican para el receptor de las células B. Para algunos de estos autores, que postulan genes VT diferentes a los que codifican para las regiones variables de las inmunoglobulinas, la teoría de la red de idiotipos -anti-idiotipos no operaría (47).

El panorama, en lo que respecta a los receptores de las células T (239), está aún bastante confuso. Las críticas a uno u otro modelo suelen basarse en consideraciones teóricas. En el campo experimental, si bien últimamente se han realizado algunos trabajos que apoyan a uno u otro modelo (ver Discusión), el problema no está todavía resuelto.

De todos modos, tal vez lo fundamental a rescatar de la lectura de los modelos propuestos, es la importancia que posee obtener una respuesta a la pregunta que

nos planteamos al realizar este trabajo. El problema abarca, como lo hemos señalado, no solamente la necesidad de una mejor comprensión del funcionamiento de las poblaciones T alorreactivas, sino la de adquirir una visión más integral de los mecanismos de inmunorregulación operantes en los vertebrados superiores. Se involucran interrogantes que abarcan serios problemas clínicos. Conocer los mecanismos de regulación que intervienen en la discriminación propio-no propio, ayudará sin duda alguna, a comprender mejor la enorme gama de patologías autoinmunes; la inmunidad tumoral parece, por momentos, haber llegado a terrenos de difícil salida. La integración conceptual del significado de la existencia de grandes poblaciones de células T reactivas a antígenos que se mantienen a lo largo del espectro filogenético con tanta constancia como son los antígenos mayores de histocompatibilidad, nos parece una necesidad urgente, para adquirir un conocimiento más acabado de los mecanismos que intervienen en el desarrollo y regulación del sistema inmune.

O B J E T I V O S

Los linfocitos T poseen un rol de gran importancia en la regulación de la respuesta inmune. Conocer la forma de reconocimiento antigénico que estas células utilizan, ayudaría a comprender mejor los mecanismos inmunorregulatorios y los eventos que se suceden en la maduración del sistema inmune.

El descubrimiento de que el sistema inmune no sólo reconoce aquello que le resulta extraño sino que para poder llevar a cabo estas funciones debe ser capaz de reconocer antígenos propios, permitió tener un conocimiento más acabado de su funcionamiento. Es sabido que el reconocimiento de los antígenos mayores de histocompatibilidad propios por parte de las células T resulta esencial para que ellas puedan reaccionar eficazmente frente a los antígenos convencionales. Por otra parte, también se ha establecido que un enorme porcentaje de los linfocitos T del organismo reconocería antígenos mayores de histocompatibilidad no propios (células T alorreactivas).

La relación existente entre estas poblaciones de células T alorreactivas y las células T que reconocen antígenos extrínsecos convencionales de manera restringida por el CMH propio no es clara. El objeto central de nuestro trabajo consistió en aportar datos acerca de la relación existente entre estos dos tipos de poblaciones T.

La hipótesis de trabajo utilizada postula que existe superposición entre las poblaciones T alorreactivas y aquellas reactivas a antígenos convencionales. Esta superpo-

sición jugaría un papel importante en los mecanismos de regulación de la respuesta inmune, entre éstos, la existencia de mecanismos de discriminación propio-no propio, los cuales posibilitarían el desarrollo de la preñez normal y evitarían el desencadenamiento de patologías autoinmunes.

Comentaremos cómo se fueron desarrollando los trabajos realizados. Algunos hacen al punto central de nuestra pregunta y estaban previamente planificados; otros, como suele suceder en el desarrollo de trabajos de investigación, surgieron a medida que realizábamos los diferentes experimentos.

El primero de los objetivos que nos planteamos fue observar cuál era el efecto de la inmunización con un antígeno de tipo convencional, sobre las poblaciones T alorreactivas. La inmunización in vivo con aloantígenos no aumenta la frecuencia de las células T alorreactivas. La inoculación de antígenos convencionales produce, por el contrario, aumentos en la frecuencia de las células reactivas a ellos. Si las dos poblaciones están superpuestas, el aumento en la frecuencia de una de ellas, debe producir aumentos en la frecuencia de la otra. Se utilizaron dos antígenos convencionales: glóbulos rojos de carnero (GRC) y glóbulos rojos de conejo (GRCo). Se emplearon diferentes dosis y vías de inoculación, investigándose los niveles alorreactivos en distintos compartimientos linfoides y el tráfico materno-fetal de estas



poblaciones. Una de las vías de inmunización usada fue la intrauterina puesto que es por esta vía, que la madre se ve naturalmente enfrentada a numerosos antígenos convencionales de origen fetal desde la concepción.

Una vez observado que durante el curso de inmunizaciones con los antígenos convencionales usados se producían modificaciones en los niveles T alorreactivos, se investigó la presencia de receptores para uno de estos antígenos (GRCo) en linfocitos T alorreactivos mediante el uso de anticuerpos anti-idiotípicos. Se empleó un suero con actividad anti-idiotípica anti-GRCo. Se observó si la acción de los anticuerpos anti-idiotípicos sobre el receptor T anti-GRCo afectaba la función T alorreactiva.

Se realizaron experimentos tendientes a investigar la existencia de algún mecanismo de regulación inmune que actuara sobre los desniveles alorreactivos que se producían a consecuencia de la inmunización con el antígeno convencional.

Se investigó además, la presencia de desórdenes en la regulación del sistema inmune cuando la inmunización con el antígeno convencional se hacía prácticamente crónica: los datos obtenidos sugerían ya la presencia de patologías autoinmunes. Se realizaron entonces, experimentos con el objeto de confirmar estas observaciones.

Finalmente, un grupo de animales se mantuvo en observación para estudiar la incidencia de neoplasias espontáneas del sistema inmunológico.

ESQUEMAS EXPERIMENTALES

## INMUNIZACION CON GRCo

### 1. Inmunización por vía intraperitoneal con GRCo.

Ratones de la cepa BALB/c fueron inoculados por vía i.p. con diferentes dosis de GRCo.

### 2. Efecto de la inmunización con GRCo i.p. sobre los niveles de alorreactividad T esplénicos.

Se midieron los niveles de alorreactividad T esplénicos. Esto se llevó a cabo utilizando esplenocitos de los ratones inmunizados con GRCo por vía ip para desencadenar reacciones de GVH locales y sistémicas, en ratones de diferentes cepas. Las reacciones locales se realizaron en híbridos F1 (BALB/c x AKR); F1 (BALB/c x DBA/2) y F1 (BALB/c x C57Bl/Ks). Las sistémicas en ratones recién nacidos de las cepas Swiss y DBA/2. En las Figuras 24, 25 y 26 se esquematiza este punto.

### 3. Citotoxicidad complemento-dependiente sobre ganglios poplíteos de ratones BALB/c que sufren GVHR locales

Este ensayo se realizó con el fin de confirmar que el aumento del peso de los ganglios poplíteos de los F1 (BALB/c x AKR) que sufrían reacciones locales de GVH, se debía a la proliferación de las células del injerto -en este caso, BALB/c-.

Se trataron suspensiones de células de ganglios

Figura 24: EFECTO DE LA INMUNIZACION CON GRCo POR VIA ip SOBRE LOS NIVELES DE ALORREACTIVIDAD T ESPLENICOS

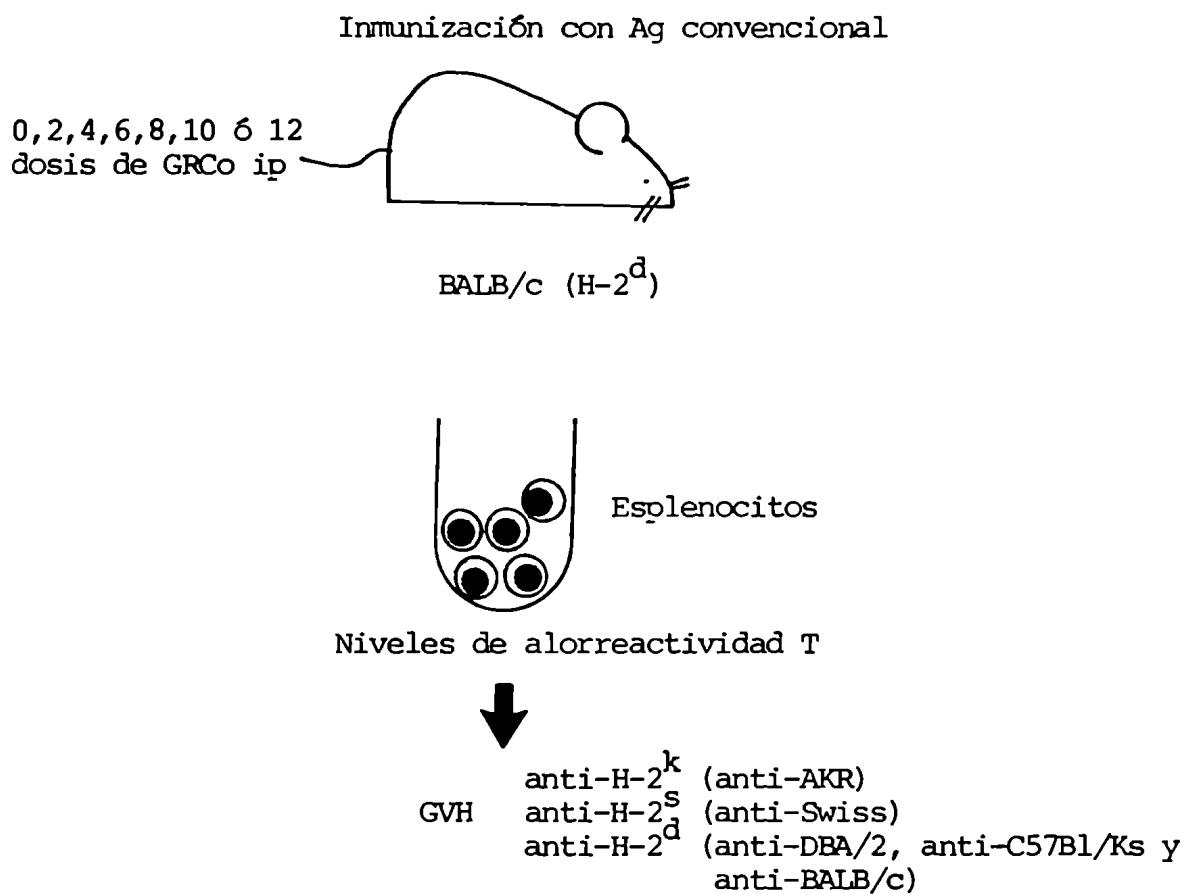
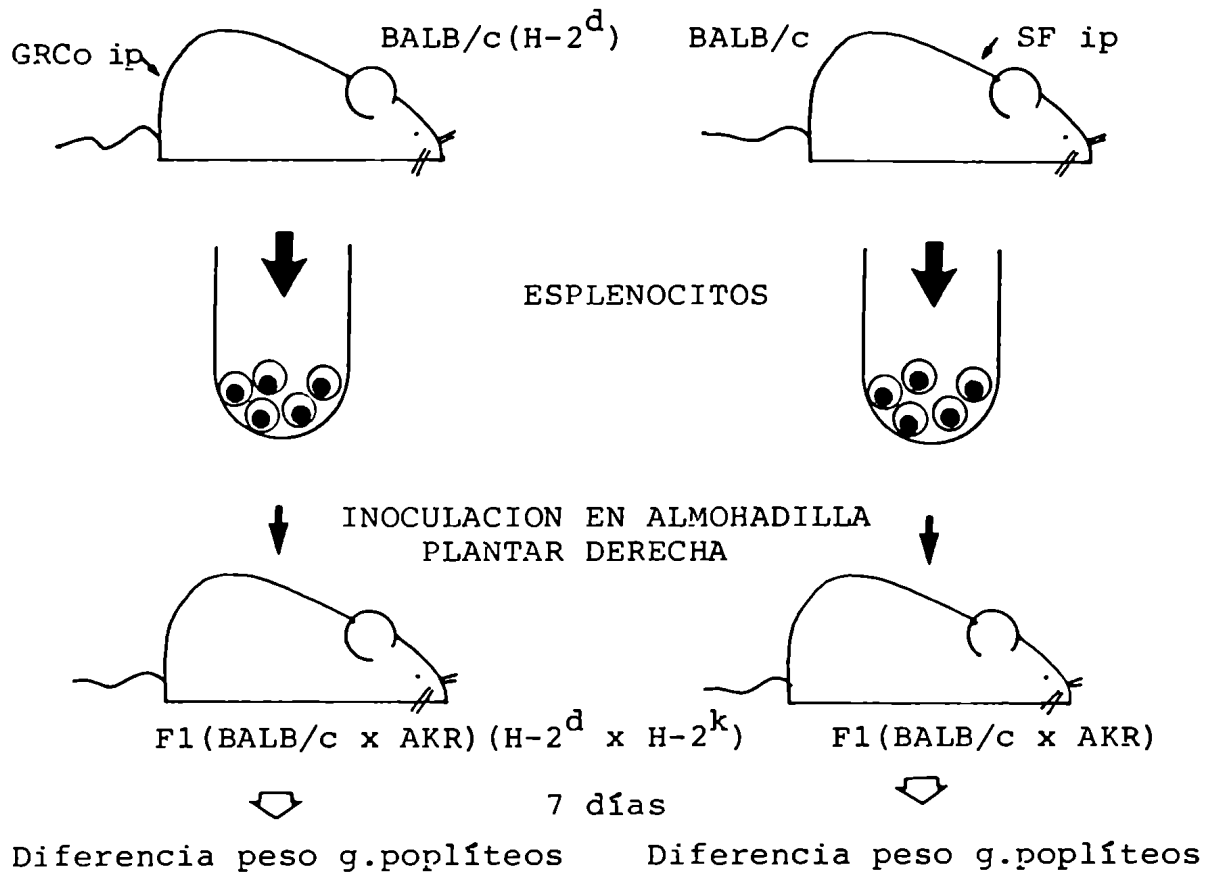


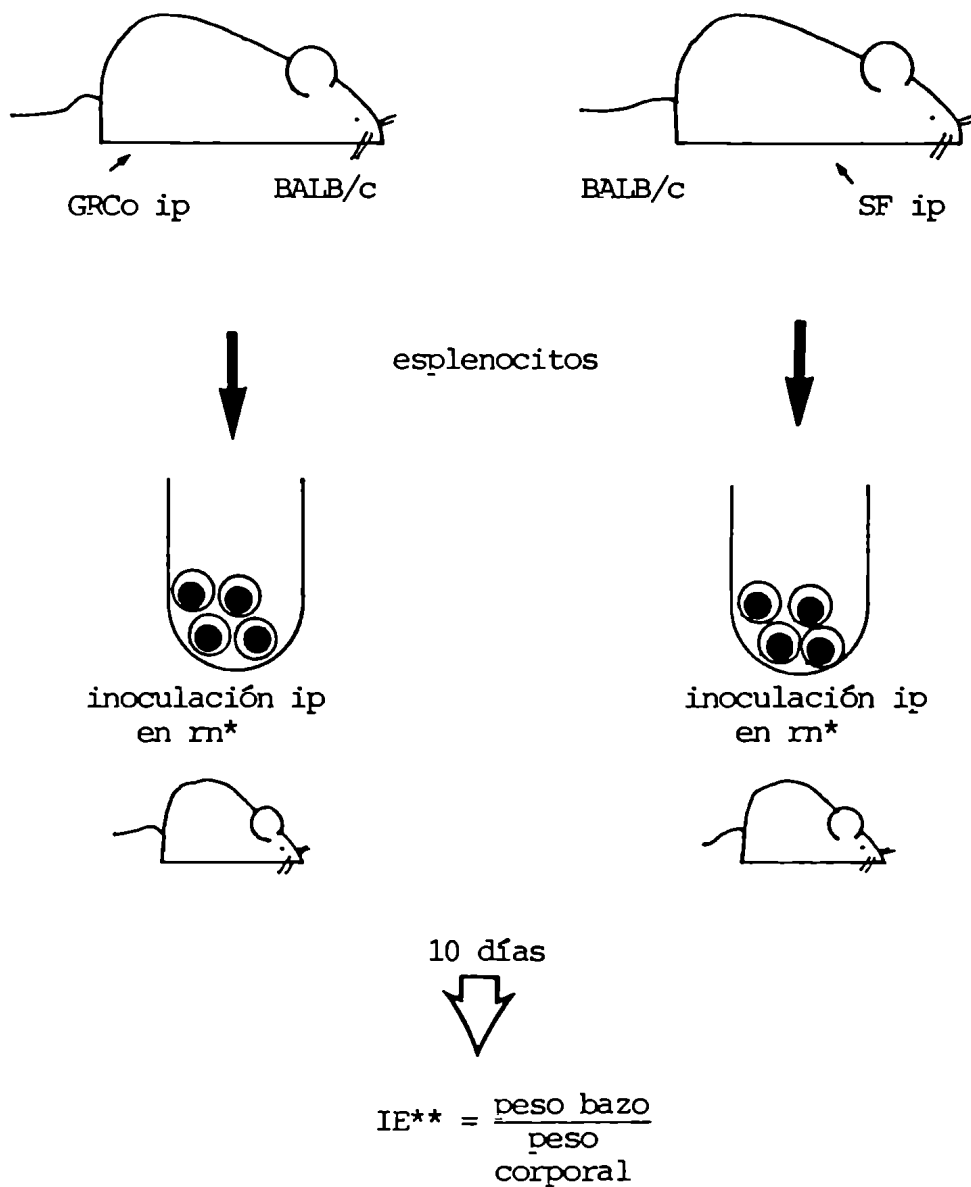
Figura 25: EFFECTO DE LA INMUNIZACION CON GRCo POR VIA i.p.  
SOBRE LOS NIVELES DE ALORREACTIVIDAD ESPLENICA

Reacciones de GVH locales:



La figura ejemplifica el uso de F1(BALB/c x AKR) para medir los niveles de alorreactividad T BALB/c anti-AKR. Se utilizaron además, F1(BALB/c x C57Bl/Ks) y F1(BALB/c x DBA/2J).

Figura 26: EFFECTO DE LA INMUNIZACION CON GRCo POR VIA i.p. SOBRE LOS NIVELES DE ALORREACTIVIDAD T ESPLENICOS. NIVELES DE ALORREACTIVIDAD T ESPLENICOS MEDIANTE REACCIONES DE GVH SISTEMICAS



\* : Se utilizaron m de las cepas Swiss y DBA/2

\*\* : Medida de la reacción de GVH

poplíteos con suero BALB anti-AKR en presencia de complemento. El suero es citotóxico para las células del huésped F1 (BALB/c x AKR) y no lo es para las células BALB/c del injerto.

4. Efecto de un suero con actividad anti-idiotípica BALB/c anti-GRCo sobre la alorreactividad T BALB/c anti-AKR.

4.1. Obtención de suero BALB/c anti-GRCo.

4.2. Purificación de anticuerpos BALB/c anti-GRCo.

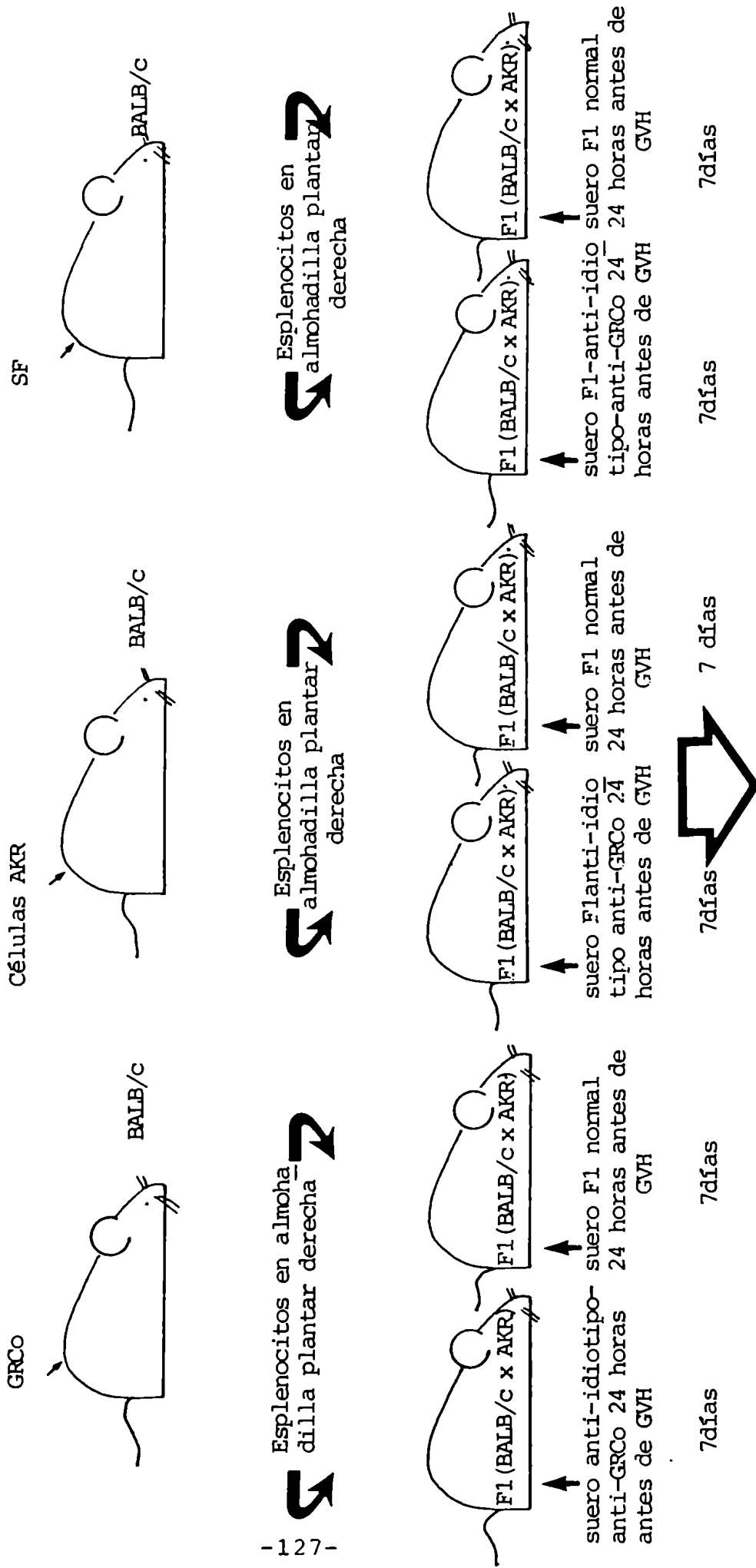
4.3. Obtención del suero con actividad anti-idiotípica BALB/c anti-GRCo.

4.4. Detección de actividad anti-idiotípica BALB/c anti-GRCo. Esto se realizó mediante ensayos de inhibición de la hemoaglutinación de GRCo, por suero BALB/c anti-GRCo de título hemoaglutinante conocido. Como control se utilizó suero Swiss anti-GRCo también titulado.

4.5. Una vez obtenido el suero con actividad anti-idiotípica BALB/c anti-GRCo detectable, se midió el efecto de ese suero sobre la alorreactividad BALB/c anti-AKR. Para esto, se realizaron los experimentos esquematizados en la Figura 27. El suero anti-idiotípico se inoculó en los F1 (BALB/c x AKR) en los que se desencadenarían luego reacciones de GVH con: esplenocitos BALB/c normales no inmunes; esplenocitos BALB/c con 6 dosis de GRCo y esplenocitos BALB/c inmunes a AKR. Como control se inoculó suero F1 (BALB/c x AKR) normal.

5. Detección de anticuerpos anti-idiotípicos BALB/c anti-AKR en ratones BALB/c inoculados con 10 a 12 dosis de GRCo ip

Figura 27: EFECTO DE UN SUERO CON ACTIVIDAD ANTI-IDIOTÍPICA BALB/c ANTI-GRCo SOBRE LA ALORREACTIVIDAD T BALB/c ANTI-AKR.



Diferencia de peso entre los ganglios poplíteos derecho e izquierdo



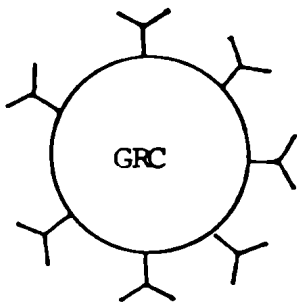
- 5.1. Obtención de suero BALB/c anti-AKR.
- 5.2. Obtención de suero C57Bl/6J anti-AKR.
- 5.3. Obtención de suero BALB/c normal.
- 5.4. Obtención de IgG BALB/c anti-AKR; IgG C57Bl/6J anti-AKR y de IgG BALB/c normal.
- 5.5. Se realizaron experimentos con el objeto de detectar anticuerpos con actividad anti-idiotípica BALB/c anti-AKR en el suero de ratones de la cepa BALB/c inmunizados con más de 10 dosis de GRCo. Para esto, se empleó la técnica de hemoaglutinación indirecta (Figura 28). Como se observa en la figura, una vez obtenidas las IgG BALB/c anti-AKR; C57Bl/6J anti-AKR y BALB/c normal, se enfrentaron con el suero de ratones BALB/c inoculados con 10-12 dosis de GRCo.

6. Reacciones autoinmunes en ratones BALB/c inoculados con 10-12 dosis de GRCo.

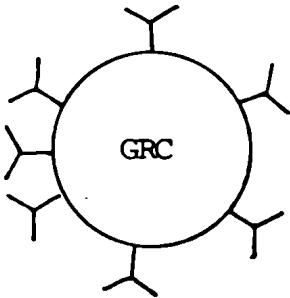
Los resultados obtenidos en el punto 5.5 nos llevaron a investigar la presencia de reacciones autoinmunes en los ratones BALB/c inoculados con 10 ó más dosis del antígeno convencional.

- 6.1. Ensayo local de GVH en ratones singeneicos adultos. Se inocularon esplenocitos de ratones BALB/c: normales no inmunes, inoculados con 5 dosis de GRCo ip o con 11 dosis del antígeno convencional en la almohadilla plantar de ratones BALB/c adultos del mismo sexo. En la Figura 29 se esquematizan los experimentos realizados.
- 6.2. Ensayo sistémico de GVH en ratones singeneicos recién

Figura 28: TECNICA DE HEMOAGLUTINACION INDIRECTA PARA DETECTAR ANTI-CUERPOS ANTIIDIOTIPIICOS BALB/c ANTI-AKR

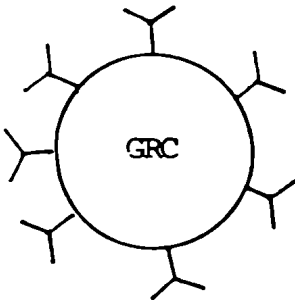


IgG BALB/c anti-AKR



IgG BALB/c normal

+ Suero BALB/c 10-12 dosis GRCo



IgG C57Bl/6 anti-AKR

Figura 29: REACCIÓNES AUTOINMUNES EN RATONES BALB/c INOCULADOS A REPETICIÓN CON EL ANTIGENO CONVENCIONAL. ENSAYO DE GVH LOCAL DE FORD Y SIMONSEN EN RATONES SINGENEICOS ADULTOS

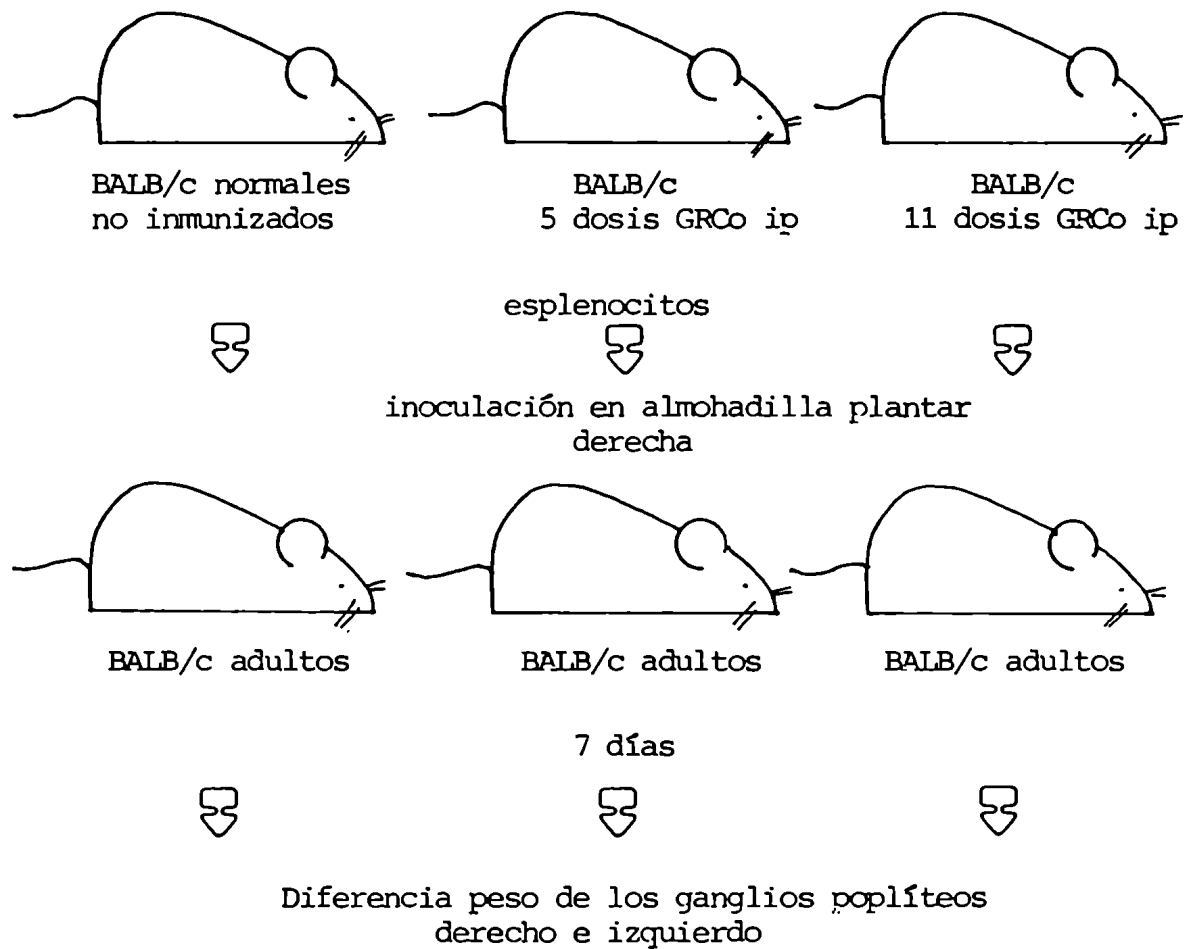
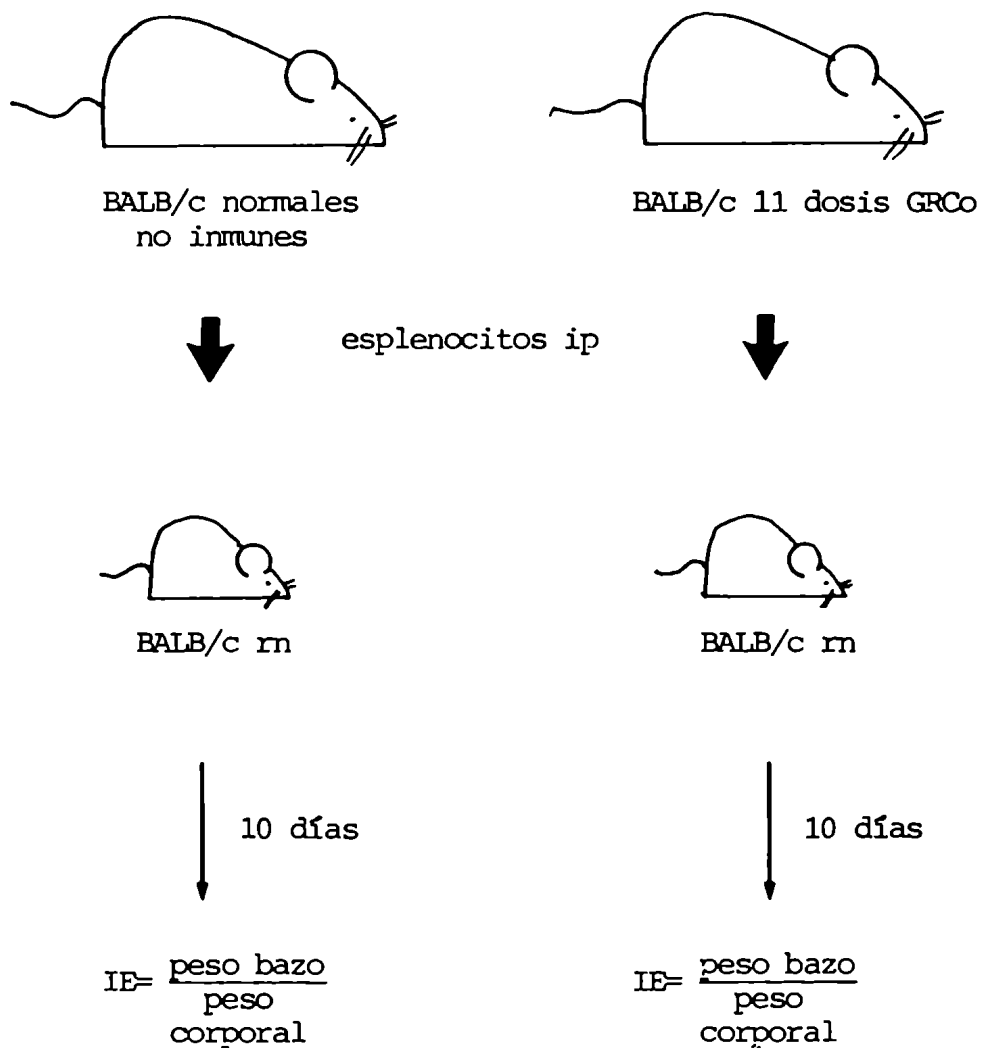


Figura 30: REACCIONES AUTOINMUNES EN RATONES BALB/c INOCULADOS A REPETICION CON EL ANTIGENO CONVENCIONAL: ENSAYO DE GVH SISTEMICO DE SIMONSEN EN RATONES SINGENEICOS RECIEN NACIDOS



nacidos. Se realizaron ensayos de Simonsen para recién nacidos inoculando células esplénicas BALB/c normales no inmunes o células esplénicas de ratones BALB/c inmunizados con 11 dosis de GRCo ip, en recién nacidos de la cepa BALB/c. En la Figura 30 se esquematiza este punto.

7. Incidencia de leucemias en ratones inoculados con 10-12 dosis de GRCo ip.

- 7.1. Ratones BALB/c que habían recibido 10-12 dosis de GRCo por vía ip se mantuvieron en observación para determinar la incidencia de leucemias espontáneas.
- 7.2. Algunas de las leucemias aparecidas, se pasaron celular y acelularmente en ratones singeneicos.

INMUNIZACION CON GRC.

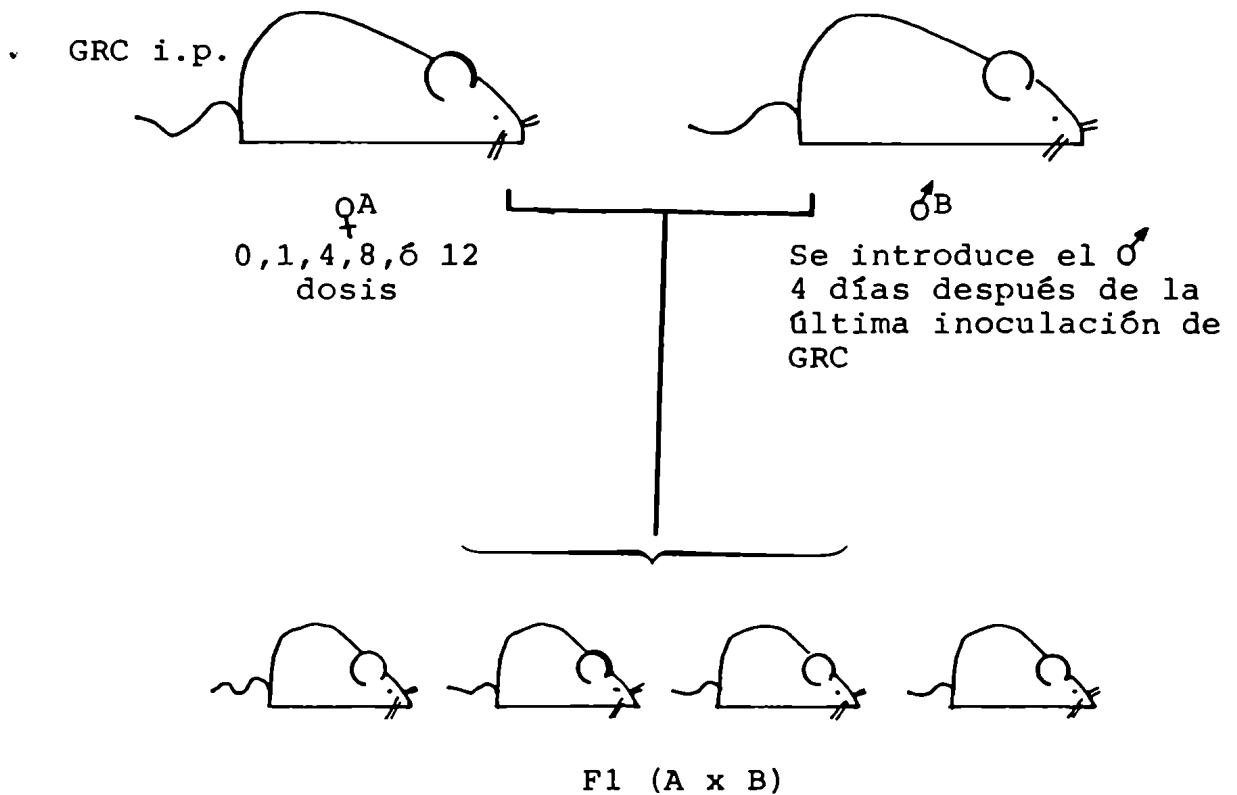
8. Efecto de la inoculación de GRC por vía ip sobre la incidencia de daño fetal.

Ratones hembras de las cepas BALB/c y Swiss fueron inoculadas con diferentes dosis de GRC por vía intraperitoneal. Posteriormente, las hembras fueron apareadas con machos de diferentes cepas. Se realizaron cruzamientos sin geneicos, alogeneicos con el mismo H-2 y alogeneicos con diferentes H-2. Se observaron diferentes parámetros: número de hembras preñadas/total, porcentaje de runting al destete, porcentaje de abortos; número de crías/madre y muertes totales

(Figura 31).

9. Efecto de la inmunización intrauterina con GRC sobre los niveles alorreactivos T en los ganglios que drenan el útero y en el bazo.
  - 9.1. Inducción de pseudopreñez por inoculación de progesterona: Ratones BALB/c fueron inoculados con progesterona de manera de inducir estados de pseudopreñez. El estado de pseudopreñez se controló por medio de extendidos vaginales.
  - 9.2. Inoculación intrauterina de GRC: Los ratones BALB/c en estado de pseudopreñez fueron inoculados por vía intrauterina con GRC. La inoculación se realizó en uno de los cuernos uterinos. En algunos se inoculó solución fisiológica. En el momento de la inmunización, algunos ratones fueron sangrados y se les dosó progesterona en suero.
  - 9.3. Peso de los ganglios paraaórticos de los ratones inoculados con GRC por vía intrauterina: Siete días después de la inoculación intrauterina con GRC, se extrajeron los ganglios paraaórticos derecho e izquierdo y se los pesó de manera de determinar la diferencia de peso entre los ganglios drenantes del cuerno uterino sensibilizado y los drenantes del cuerno uterino no inoculado. Se utilizaron como controles ratones normales no inoculados, ratones inoculados con progesterona solamente, con progesterona y solución

Figura 31: INDUCCION DE DAÑO FETAL POR INOCULACION i.p.  
DE UN ANTIGENO CONVENCIONAL.



Se consigna n° de preñadas/total; fecha de nacimiento de las crías; n° de crías por madre y sobrevivida hasta los 45 días de vida

fisiológica por vía intrauterina y con GRC en útero sin progesterona.

9.4. Niveles de alorreactividad T en ganglios paraaórticos drenantes de cuernos uterinos inoculados con el antígeno convencional: Se desencadenaron reacciones sistémicas de GVH en recién nacidos Swiss y GVH locales en F1 (BALB/c x AKR) con suspensiones celulares de los ganglios paraaórticos que drenaban cuernos uterinos sensibilizados con GRC. Se utilizaron los mismos controles que en el punto 9.3 (Figuras 32 y 33).

9.5. Niveles de alorreactividad T esplénica de ratones inoculados por vía uterina con el antígeno convencional: Se desencadenaron reacciones sistémicas de GVH en recién nacidos Swiss y GVH locales en F1 (BALB/c x AKR) con esplenocitos provenientes de ratones que habían sido inoculados con GRC por vía intrauterina. Se utilizaron los mismos controles que en el punto 9.4 (Figuras 32 y 33).

10. Incidencia de leucemia en ratones inoculados con GRC por vía ip.

10.1. Ratones BALB/c que habían recibido entre 8 y 12 inoculaciones de GRC por vía intraperitoneal, fueron mantenidos en observación de modo de registrar el porcentaje de leucemias espontáneas.

10.2. Pasajes celulares y acelulares de leucemias espontáneas en ratones singeneicos.



Figura 32: NIVEL DE ALORREACTIVIDAD T EN BAZO Y GANGLIOS PARAAORTICOS  
DRENANTES DE CUERNOS UTERINOS INOCULADOS CON EL ANTIGENO  
CONVENCIONAL. NIVELES ALORREACTIVOS T BALB/c ANTI-Swiss

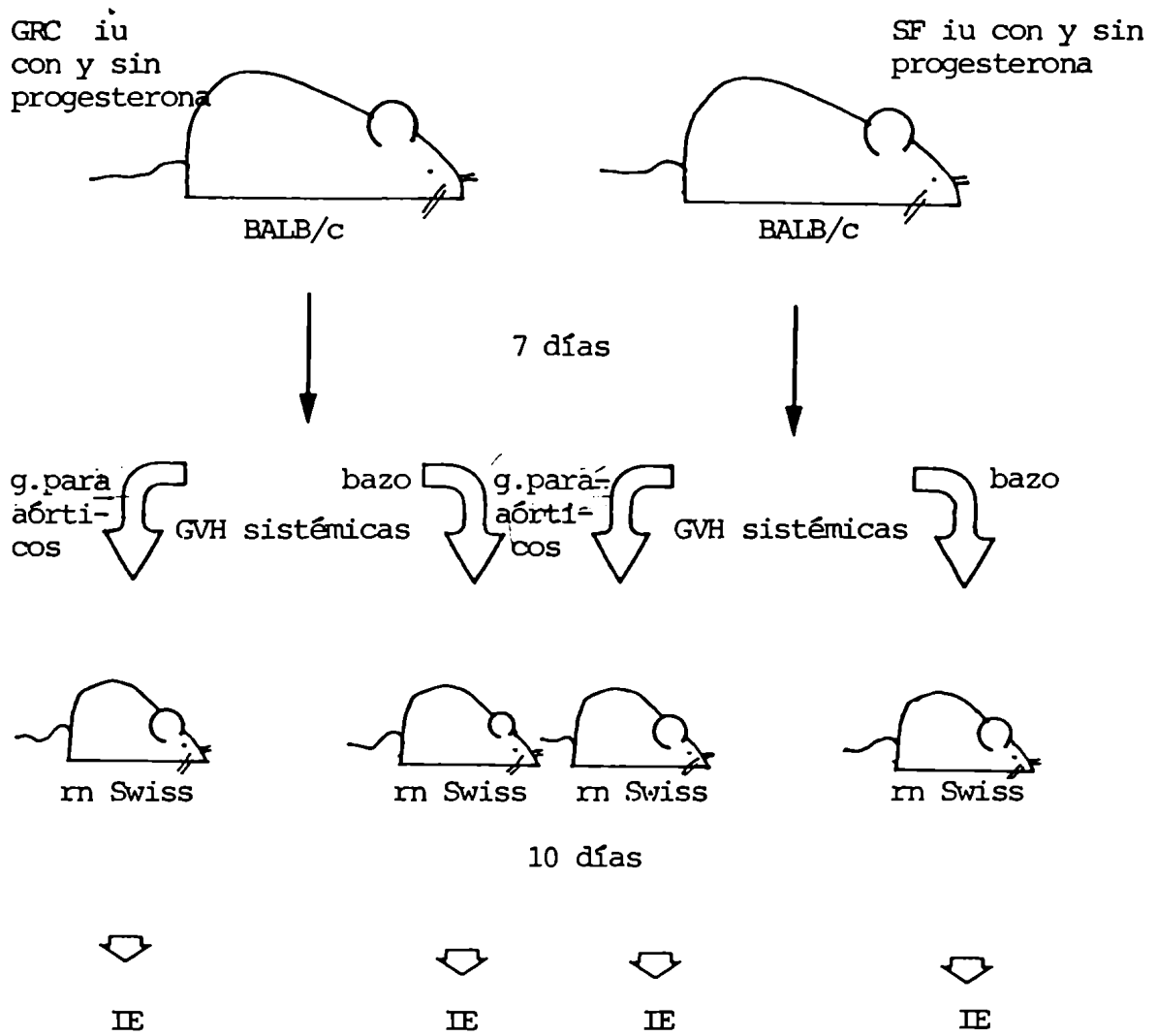
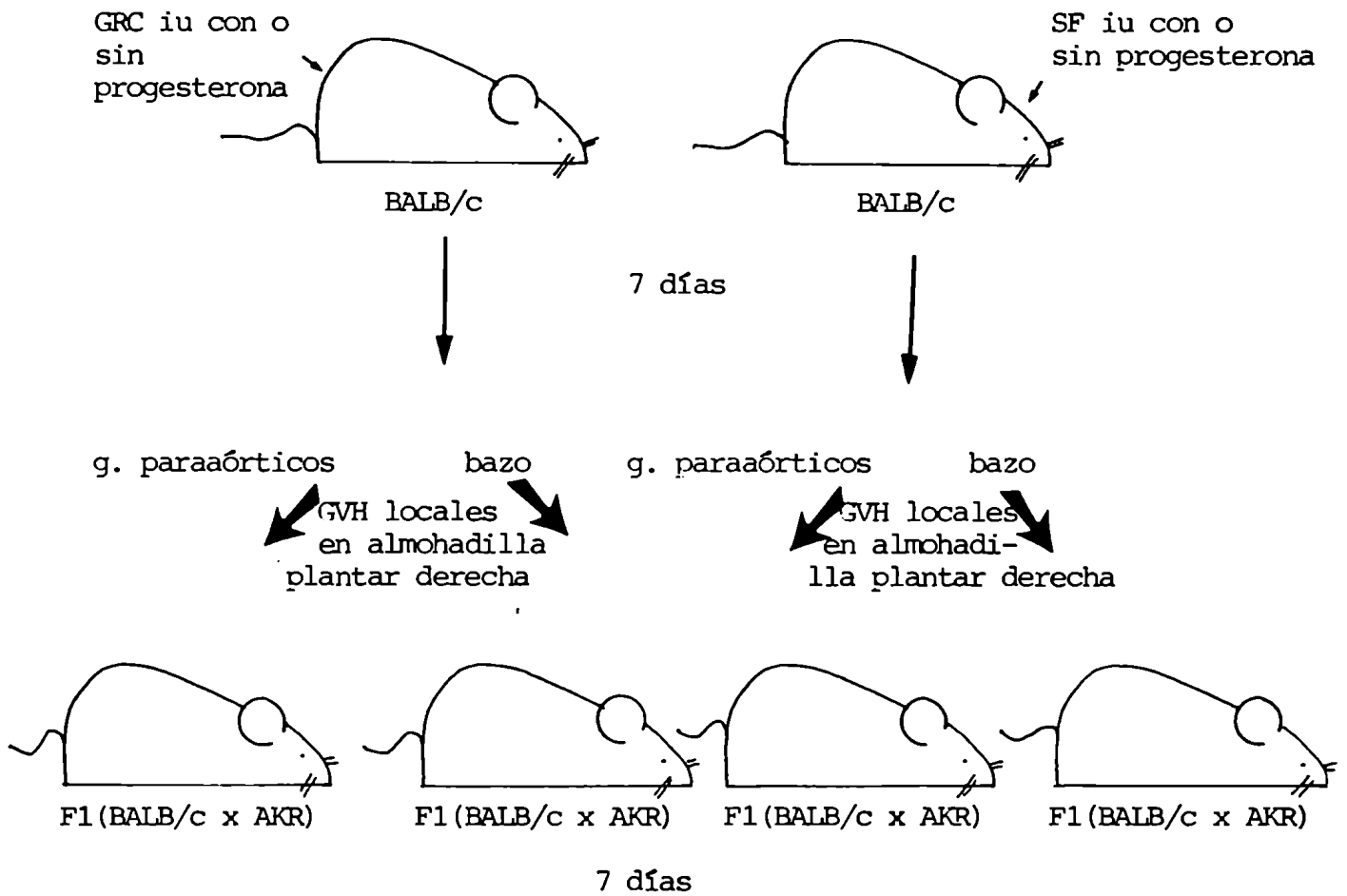


Figura 33: NIVEL DE ALORREACTIVIDAD T EN BAZO Y GANGLIOS PARAAORTICOS  
DRENANTES DE CUERNOS UTERINOS INOCULADOS CON EL ANTIGENO  
CONVENCIONAL. NIVELES ALORREACTIVOS T BALB/c ANTI-AKR



Diferencia de peso entre ganglios poplíteos  
derecho e izquierdo

M A T E R I A L E S   Y   M E T O D O S

## 1. Animales.

Se utilizaron ratones de las cepas endocriadas BALB/c; AKR/J; C57Bl/Ks; C57Bl/6J, DBA/2; ratones de exocría Swiss; híbridos F1 (BALB/c x AKR/J); F1 (BALB/c x C57Bl/Ks) y F1 (BALB/c x DBA/2) y conejos. Todos los animales provenían del bioterio de la Sección Leucemia Experimental, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina.

## 2. Sueros.

### 2.1. Suero BALB anti-GRCo:

Ratones BALB/c de ambos sexos y de 2-3 meses de edad, fueron inoculados con 2 a 4 dosis de GRCo. Se utilizaron GRCo provenientes de un único conejo. El esquema de inmunización fue el siguiente: 0.40 ml de una suspensión de GRCo al 10-15%, una vez por semana.

### 2.2. Suero Swiss anti-GRCo:

Ratones de la cepa Swiss de exocría de ambos sexos y de 2-4 meses de edad fueron inoculados con tres dosis de GRCo con intervalos de una semana entre cada dosis. Se utilizaron GRCo provenientes del mismo conejo utilizado para preparar el suero BALB anti-GRCo. La dosis inoculada fue la siguiente: se inocularon 0.4 ml por vía ip de una suspensión de GRCo al 10-15%. Los ratones se sangraron a blanco por punción retroorbital y el pool de sueros se fraccionó y congeló hasta su uso.

### 2.3. Suero BALB/c anti AKR:

Fue obtenido por inoculación de ratones de la cepa BALB/c con suspensiones celulares de un pool de bazos, ganglios y timos de ratones de la cepa AKR/J. Se utilizaron ratones BALB/c hembras de 2 meses de edad y ratones AKR hembras de 1-2 meses de edad. Se realizaron tres inoculaciones con  $10 \times 10^6$  células por vía intraperitoneal, con un intervalo de una semana entre cada una de ellas. Cuatro días después de la tercera inoculación, los ratones BALB fueron sangrados a blanco por punción retroorbital y el suero se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso.

### 2.4. Suero C57Bl/6J anti AKR:

Este suero se obtuvo por inoculación de ratones de la cepa C57Bl/6J con suspensiones celulares de un pool de bazos, timos y ganglios de ratones de la cepa AKR. Se utilizaron ratones hembras C57Bl/6J de 3 meses de edad y ratones AKR hembras de 1 a 2 meses de edad. Se realizaron tres inoculaciones con  $10 \times 10^6$  células por vía intraperitoneal, con un intervalo de una semana entre cada una de ellas. Cuatro días después de la tercera inoculación, los ratones se sangraron por punción retroorbital a blanco y el suero se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 2.5. Suero BALB/c normal:

Ratones de la cepa BALB/c de 2-3 meses de edad, hembras, fueron sangrados por punción retroorbital. El suero se fraccionó y congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

2.6. Suero F1 (BALB/c x AKR) normal:

Ratones F1 (BALB/c x AKR) de 2-3 meses de edad fueron sangrados por punción retroorbital. El suero se fraccionó y congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

2.7. Suero anti-idiotipo anti-glóbulos rojos de conejo:

2.7.a. Purificación de anticuerpos BALB/c anti-glóbulos rojos de conejo:

Los glóbulos rojos provenientes del mismo conejo utilizado para la preparación del suero BALB/c anti-GRCo se fijaron con glutaraldehído al 2%. Para ésto, se mezclan volúmenes iguales de una solución de glutaraldehído al 2% con una suspensión de GRCo al 2.5%. Se incubó en baño a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Se realizaron posteriormente, tres lavados con PBS. Parte de los GRCo fijados se trataron con buffer tris cloruro de amonio durante 20 minutos y se realizaron lecturas espectrofotométricas del sobrenadante de la suspensión para determinar si la fijación se había realizado correctamente. Los GRCo se observaron al microscopio. Una vez controlada de esta manera la fijación, los GRCo fijados se centrifugaron y el pellet se incubó con el suero anti-GRCo. Dicho suero se centrifugó previamente a 13.500 rpm durante 10 minutos. La incubación del suero con los GRCo se realizó durante media hora a temperatura ambiente y una hora a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se lavó repetidamente con PBS hasta que la lectura espectrofotométrica del sobrenadante fue repetidamente nula. En ese momento, se agregó al pellet,

buffer Glicina-clorhídrico 0.2 M pH 2.8. Se realizó a diferentes tiempos de incubación la lectura espectrofotométrica del eluido. El eluido obtenido en el pico de las lecturas se dializó primeramente contra solución fisiológica y posteriormente, se concentró por diálisis contra PVP. Las partidas se fraccionaron y congelaron a -20°C hasta su uso.

#### 2.7.b. Inoculación de anticuerpos anti-GRCo a ratones F1 (BALB/c x AKR).

Ratones F1 (BALB/c x AKR) de 2-3 meses de edad, machos, fueron inoculados repetidamente con anticuerpos BALB/c anti-GRCo. El esquema de inmunización fue el siguiente:

Se inocularon 0.4ml de anticuerpos anti-GRCo -200 ug/ml- en dos sitios de la zona ventral del animal por vía i.d. (0.2 ml en cada sitio de inoculación). Las inoculaciones se repitieron dos veces por semana durante dos semanas. Luego de 15 días, se repitió el esquema de inmunización. Se siguió con el mismo esquema hasta obtener un antisuero con actividad anti-idiotípica anti-GRCo. El suero se absorbió repetidamente con GRCo, se tituló por inhibición de la hemoaglutinación y se congeló a -20°C hasta su uso.

## 2.8. Titulación del suero BALB/c anti-GRCo.

### 2.8.a. Ensayos de hemoaglutinación directa:

El suero BALB anti-GRCo fue de complementado (una hora a 56°C). Se incubaron 0.1 ml de distintas diluciones del suero con 0.1 ml de GRCo al 1% a 37°C durante una hora. Se retiró del baño y se los dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, sin agitar. Se leyeron los resultados en ese momento. Se agitaron los tubos y se dejaron a 4°C, hasta el día siguiente, para realizar una segunda lectura. Se trabajó por triplicado.

## 2.9. Titulación del suero Swiss anti-GRCo.

Se procedió en la misma forma que para titular el suero BALB/c anti-GRCo.

## 2.10. Detección de actividad anti-idiotípica BALB/c anti-GRCo. Inhibición de la hemoaglutinación.

Se mezclaron cantidades constantes de suero BALB/c anti-GRCo de título hemoaglutinante conocido (1/80), con cantidades crecientes del suero F1 anti-idiotípico a testear. Se llevó al volumen final con MEM. Se incubó la mezcla durante una hora a 37°C y una hora a 4°C. Se agregaron, luego, los GRCo al 1%. Se incubó durante una hora a 37°C. Se realizaron controles incubando suero BALB/c anti-GRCo con suero F1 normal. También controles incubando suero Swiss anti-GRCo



de título hemoaglutinante conocido con el suero F1 en el que se quiso probar actividad anti-idiotípica. Se trabajó por triplicado. Al día siguiente, se realizó una segunda lectura de los resultados.

2.11. Obtención de IgG BALB/c anti-AKR, IgG C57Bl/6J anti-AKR e IgG BALB/c normal.

La purificación de la fracción IgG de los sueros se realizó por cromatografía de intercambio iónico según técnica de rutina (197a). Los sueros se dializaron frente a buffer fosfatos 10mM, pH 7.7 y se sembraron sobre una columna de DEAE celulosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) estabilizada con el mismo buffer. Se eluyó la fracción IgG con el buffer. Las fracciones que contenían el primer pico eluído se mezclaron y se dosaron por absorción a 280nm utilizando seroalbúmina bovina como testigo. Se dializaron frente a SF y PVP.

2.12. Detección de anticuerpos anti-idiotípicos BALB/c anti-AKR.

Ensayo de hemoaglutinación indirecta:

1. 200ug de IgG BALB anti-AKR se llevaron a un volumen de 200 ul con solución salina normal.
- b. Se lavaron los GRC frescos tres veces con PBS y se llevaron a una concentración del 50% con MEM.

- c. Se incubaron 200ul de una solución fresca de Cr Cl3 al 0.1% y 200ul de los GRC, con 400ul de IgG BALB anti-AKR.
- d. Se agitó y se incubó durante 4 minutos a temperatura ambiente. Esto permite que la IgG se pegue a los GRC.
- e. Se lavó 3 veces con PBS, pH 7.3 con 5% de suero bovino fetal inactivado. Se diluyó luego hasta alcanzar una concentración final del 0.4%.
- f. Se incubaron estas células en placas de hemoaglutinación con fondo en V, con diluciones crecientes del suero a testear, durante una hora a 37°C y dos horas a 4°C. Al día siguiente, se repitió la lectura.

Se utilizaron como controles IgG BALB normal e IgG C57Bl/6J anti-AKR, también GRC más las diferentes inmunoglobulinas en ausencia de suero. Los sueros se absorbieron previamente con GRC. Se trabajó por triplicado.

### 3. INMUNIZACIONES

#### 3.1. Inmunización intraperitoneal con GRCo.

Ratones de la cepa BALB/c de ambos sexos y de 2-4 meses de edad fueron inmunizados con 2 a 12 dosis de GRCo por vía i.p. Las dosis se administraron con un intervalo de una semana, inoculándose 0.2ml de una suspensión de GRCo (provenientes del mismo conejo utilizado para la obtención del suero anti-idiotípico anti-GRCo) al 10% en S.F. Los es

plenocitos de estos animales fueron posteriormente utilizados para desencadenar reacciones de GVH.

### 3.2. Inmunización intraperitoneal con GRC.

Ratones de las cepas BALB y Swiss fueron inoculados por vía i.p. con 1 a 12 dosis de GRC. Las dosis se administraron con intervalos de una semana inoculándose 0.2ml de una suspensión de GRC al 10% en S.F.

### 3.3. Inmunización intrauterina con GRC.

Ratones hembras de 2 a 3 meses de edad de la cepa BALB/c fueron inmunizados por vía i.u. con 0.03ml de una suspensión de GRC al 50%.

Se inmunizaron ratones vírgenes normales y ratones en los que se había inducido previamente un estado de pseudopreñez con progesterona. Los animales fueron sometidos a anestesia general con Embutal. Mediante una incisión en la zona ventral se expuso uno de los cuernos uterinos y se realizó la ligadura de la parte superior de los mismos. Inmediatamente se efectuó la inoculación dentro de dicho cuerno uterino. Se suturó peritoneo y pared abdominal. Se utilizaron controles a los que se les inoculó solución fisiológica, sufriendo el mismo procedimiento quirúrgico que los grupos experimentales.

Un grupo de ratones en estado de pseudopreñez fue

sangrado ese día para dosar niveles de progesterona en su suero. Siete días después de la inoculación de los GRC, los animales fueron sacrificados y sus ganglios paraaórticos y bazos se utilizaron para desencadenar reacciones de GVH. Previamente se pesaron los ganglios paraaórticos izquierdo y derecho de algunos de los animales y se estableció la diferencia de peso entre ellos.

#### 4. INDUCCION DEL ESTADO DE PSEUDOPREÑEZ CON PROGESTERONA.

##### 4.1. Inoculación de progesterona.

Ratones hembras de 2 a 3 meses de edad de la cepa BALB/c fueron llevados al estado de pseudopreñez mediante la administración de progesterona. Se utilizaron 75mg de progesterona pura (Schering) por animal. La progesterona se disolvió en alcohol 100° y se embebieron con ella esponjas de nylon de 1cm<sup>3</sup>. Se dejó evaporar el alcohol. Las esponjas fueron implantadas subcutáneamente en uno de los flancos del animal. Se realizaron extendidos vaginales diarios de manera de establecer con certeza que los animales estuvieron en estado de pseudopreñez.

##### 4.2. Determinación de progesterona en el suero de los ratones

Diez días después de colocada la progesterona y habiéndose establecido por medio de extendidos vaginales el estado de pseudopreñez, un grupo de ratones fueron sangrados de modo de dosar progesterona en su suero. Se sangraron tam

bién hembras de la misma cepa y edad a los 4 días de haber observado en las mismas la presencia de tapón vaginal. La presencia de dicho tapón vaginal indica con una muy alta probabilidad estado de preñez. De todas maneras, la preñez se confirmó por observación de los cuernos uterinos. Los sueros fueron remitidos al laboratorio de Análisis Clínicos del Dr. Moisés Schere y mediante la técnica de radioinmunoensayo se estableció la concentración de progesterona en ambos pools de sueros.

#### 5. PESO DE LOS GANGLIOS PARAAORTICOS EN RATONES INMUNIZADOS POR VIA INTRAUTERINA CON GRC.

Siete días después de la inmunización con GRC en uno de los cuernos uterinos, se extrajeron los ganglios paraaórticos derecho e izquierdo. Se los limpió y secó y se los pesó en balanza Mettler, estableciéndose la diferencia de peso entre ambos. Se procedió de la misma forma con ganglios de animales inoculados con S.F. en uno de los cuernos uterinos.

#### 6. PREPARACION DE LAS SUSPENSIONES CELULARES.

Se pasaron las células a través de una malla de alambre con MEM. Luego a través de aguja fina dos o tres veces. Se trataron con cloruro de amonio al 0.83% p/v durante 7 minutos a temperatura ambiente para lisar los GR. Se lavaron tres veces con MEM. Se contaron mediante el mé

todo de exclusión por Azul Trypan y se llevaron a la concentración requerida con MEM.

## 7. REACCIONES DE INJERTO CONTRA HUESPED.

### 7.1. Ensayo local de Ford y Simonsen.

#### 7.1.a. Niveles de alorreactividad T en ratones inmunizados con GRCo por vía i.p.:

Se utilizó la técnica local de Ford y Simonsen. Ratones F1 adultos fueron inoculados en la almohadilla plantar derecha por vía subcutánea con suspensiones esplénicas de una de las cepas parentales. Siete días después de la inoculación, se extrajeron los ganglios poplíteos derecho e izquierdo, se los limpió y secó cuidadosamente, y se los pesó en balanza Mettler, estableciéndose la diferencia entre ambos.

Los grupos estudiados fueron:

1. Esplenocitos BALB/c normales no inmunes en F1 (BALB/c x AKR); esplenocitos BALB inmunes a GRCo (diferentes dosis) en F1 (BALB/c x AKR).
2. Esplenocitos BALB/c normales no inmunes en F1 (BALB/c x C57Bl/Ks); esplenocitos BALB/c inmunes a GRCo (dife-

rentes dosis) en F1 (BALB/c x C57Bl/Ks).

3. Esplenocitos BALB/c normales no inmunes en F1 (BALB/c x DBA/2); esplenocitos BALB/c inmunes a GRCo (diferentes dosis) en F1 (BALB/c x DBA/2).

4. Esplenocitos BALB/c no inmunes en F1 (BALB/c x AKR); esplenocitos BALB/c inmunes a AKR en F1 (BALB/c x AKR).

7.1.b. Efecto de un suero con actividad anti-idiotípica anti-GRCo sobre la alorreactividad T BALB/c anti-AKR:

En los grupos 1 y 4 recientemente enumerados, un grupo de ratones F1 (BALB/c x AKR) fueron inoculados por vía iv con 0.2ml del suero anti-idiotipo BALB/c anti-GRCo, 24 horas antes de desencadenar en los mismos las reacciones de GVH. Se utilizaron como controles, ratones F1 inoculados por vía iv con 0.2ml de suero F1 normal.

7.1.c. Niveles de alorreactividad T en bazo y ganglios drenantes de cuernos uterinos inmunizados con GRC:

Se realizaron reacciones locales de GVH en ratones F1 (BALB/c x AKR) adultos hembras. Los grupos estudiados fueron:

1. BALB/c normales vírgenes no inmunes inoculadas con SF iu

2. BALB/c vírgenes inoculadas con progesterona.
3. BALB/c vírgenes inoculadas con progesterona e inmunizadas por vía i.u. con GRC.
4. BALB/c vírgenes inmunizadas por vía i.u. con GRC.

7.2. Citotoxicidad complemento-dependiente en ganglios poplíteos de F1 (BALB/c x AKR) inoculados con células esplénicas BALB/c en la almohadilla plantar.

Con el objeto de evaluar si el aumento registrado en el peso de los g.p. drenantes de la inoculación de células BALB/c en la almohadilla plantar de los híbridos F1 (BALB/c x AKR) se debía a la proliferación de las células injertadas, se realizaron pruebas de citotoxicidad dependiente de complemento sobre las células de dichos ganglios poplíteos, con un suero BALB/c anti-AKR. El suero BALB/c anti-AKR en presencia de complemento lizará las células del F1.

Se usaron como blanco entonces, células de g.p. de F1 (BALB/c x AKR) al séptimo día de haber desencadenado en la almohadilla plantar correspondiente, reacciones de GVH con células esplénicas BALB/c. Estas células se incubaron a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/0.1ml de un suero BALB/c anti-AKR de título conocido durante 30 minutos a 4°C. Se lavaron luego con MEM contrifugándolas a 200g durante 5 minutos. Se agregó 0.1ml de suero de cobayo 1:10 como fuente de complemento y se reincubaron a 37°C durante una hora. Para evaluar el efecto citotóxico del suero se agregó coloran



te Azul Tripán (0.20% en S.F.) y se determinó el porcentaje de células muertas. Se utilizaron como controles: a) células de g.p. con GVHR y MEM, células de g.p. con GVHR en presencia de suero BALB/c normal, células de g.p. con GVHR más complemento, células de g.p. normales más suero BALB/c anti-AKR más complemento.

### 7.3. Ensayo de Simonsen en ratones recién nacidos.

#### 7.3.a. Niveles de alorreactividad T en ratones inmunizados con GRC por vía i.p.:

Se utilizó la técnica de Simonsen para recién nacidos. Recién nacidos Swiss y F1 (BALB/c x DBA/2) fueron inoculados por vía i.p. con esplenocitos BALB/c normales o inmunes a GRC (diferentes dosis GRCo por vía i.p.). El volumen de la suspensión celular inoculada en los recién nacidos fue de 0.05ml. Antes de inocular a los recién nacidos se mezclan todas las camadas y se las redistribuye al azar colocando aproximadamente el mismo número de crías a cada madre y se establecieron los índices esplénicos (IE: peso bazo/peso corporal).

#### 7.3.b. Niveles de alorreactividad T en bazo y ganglios drenantes de cuernos uterinos inmunizados con GRCo:

Mediante la técnica descripta recientemente, se desencadenaron reacciones de GVH en ratones Swiss recién nacidos utilizando suspensiones celulares esplénicas y de

ganglios paraaórticos de los siguientes grupos:

1. Ratones BALB/c normales no inmunes, hembras vírgenes de 2-3 meses de edad.
2. Ratones BALB/c del mismo sexo y edad en estado de pseudopreñez inducido por progesterona.
3. Ratones BALB/c del mismo sexo y edad, vírgenes inoculados con GRC por vía i.u.
4. Ratones BALB/c del mismo sexo y edad inoculados con GRC por vía i.u. en estado de pseudopreñez inducido por progesterona.

Las reacciones deGVH se expresaron como IE: Peso bazo/peso corporal.

#### 8. EFFECTO DE LA INMUNIZACION INTRAPERITONEAL CON GRC EN LA INDUCCION DE DAÑO FETAL.

Hembras de la cepa BALB/c de 2-3 meses de edad fueron inoculadas con 0, 4, 8 y 12 dosis de GRC por vía i. p.; 4 días después de la última inoculación se las apareó con machos de las cepas BALB/c; Swiss o DBA/2. Se observaron los siguientes parámetros: número de preñadas/total de hembras a preñar; porcentaje de muertes al destete o runting; porcentaje de abortos; porcentaje de muertes totales; número de crías por madre.

Hembras de la cepa Swiss de 2-3 meses de edad fueron inoculadas con 1, 4 y 8 dosis de GRC. Cuatro días

después de la última inoculación se aparearon con machos Swiss o AKR. Se observaron los parámetros citados anteriormente.

9. DETECCION DE REACCIONES AUTOINMUNES EN RATONES BALB/c INMUNIZADOS CON 10-12 DOSIS DE GRCo POR VIA INTRAPERITONEAL.

9.1. Reacciones locales de GVH en ratones adultos singeneicos.

Se utilizó la técnica local de Ford y Simonsen inoculando esplenocitos en ratones adultos singeneicos. Se inocularon entonces en la almohadilla plantar derecha ratones de la cepa BALB/c hembras de 2-3 meses de edad con:

1. Esplenocitos de ratones BALB/c hembras de 2-3 meses de edad normales no inmunes.
2. Esplenocitos de ratones de la misma cepa, sexo y edad que habían recibido 5 dosis de GRCo por vía i.p.
3. Esplenocitos de ratones de la misma cepa, sexo y edad que habían recibido entre 11 y 12 dosis de GRCo por vía i.p.

Siete días después de la inoculación, se extrajeron los g.p. derecho e izquierdo y se estableció la diferencia de peso entre ellos. Los ganglios fueron cuidadosamente limpiados y secados antes de pesarlos en balanza

Mettler.

9.2. Ensayos de Simonsen para recién nacido en ratones singeneicos.

Se realizaron también, ensayos de GVH mediante la técnica de Simonsen para r.n. singeneicos. Los r.n. BALB/c fueron inoculados con:

1. Esplenocitos de ratones BALB/c machos de 2-3 meses de edad normales no inmunes.
2. Esplenocitos de ratones de la misma cepa, edad y sexo inoculados con 11-12 dosis de GRCo por vía i.p.

Diez días después de la inoculación i.p. de los r.n., se extrajeron los bazo y se calcularon los IE: Peso bazo/peso corporal.

10. INCIDENCIA DE LEUCEMIA EN RATONES INOCULADOS CON DOSIS REPETIDAS DE GRC O GRCo

Grupos de ratones BALB/c inoculados con 8 a 12 dosis de GRC o GRCo por vía i.p., fueron mantenidos en observación durante 12 a 18 meses. Se registró el porcentaje de leucemias espontáneas, realizándose la autopsia de todos los animales.

## 11. PASAJE DE LEUCEMIAS ESPONTANEAS EN RATONES SINGENEICOS

### 11.1. Pasaje celular de leucemias espontáneas en ratones singeneicos.

Varias leucemias espontáneas se inocularon en ratones singeneicos por pasajes celulares (ratones adultos). Los animales inoculados con suspensiones celulares de bazo por vía ip se mantuvieron en observación hasta su muerte. Se realizaron autopsias en todos los animales.

### 11.2. Pasaje acelular de leucemias espontáneas en ratones singeneicos.

Se realizaron pasajes acelulares de algunas leucemias espontáneas. Los extractos acelulares se prepararon de la siguiente manera:

1. se homogeneizaron uno o más bazos leucémicos en PBS en una relación de 1 a 10 (p/v),
2. se centrifugó a 1000g durante 15 minutos a 4°C.
3. Se centrifugó el sobrenadante anterior a 8000g durante 15 minutos a 4°C. Este último sobrenadante se inoculó a los animales. El volumen de la inoculación fue de 0.3ml por vía ip.

## R E S U L T A D O S

1. EFFECTO DE LA INMUNIZACION CON GRCo POR VIA i.p. SOBRE LOS NIVELES DE ALORREACTIVIDAD T ESPLENICOS

1.1. EN COMBINACIONES QUE INVOLUCRAN DIFERENCIAS A NIVEL DE ANTIGENOS MAYORES DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

La inmunización de ratones de la cepa BALB/c con distintas dosis de GRCo, indujo aumentos en el nivel de alorreactividad esplénica frente a cepas que diferían de la inmunizada, en antígenos mayores de histocompatibilidad.

El aumento en la alorreactividad T se detectó en determinados momentos de la inmunización con el antígeno convencional y en las dos cepas testeadas se volvió a los niveles alorreactivos normales al continuar la inmunización.

1.1.a. Niveles alorreactivos T esplénicos medidos mediante reacciones de GVH en híbridos F1 (BALB/c x AKR) adultos.

Como puede observarse en la Tabla 4, la inoculación de diferentes dosis de GRCo por vía i.p. en ratones de la cepa BALB/c, produjo un aumento significativo de las reacciones de GVH inducidas en híbridos F1 (BALB/c x AKR) adultos.

La inoculación de 4 dosis de GRCo indujo valores significativamente superiores a los obtenidos con esplenocitos BALB/c normales no inmunes ( $p < 0.001$ ). Luego de recibir 6 y 8 dosis, los niveles T se mantuvieron elevados ( $p < 0.001$ , en ambos casos).

Tabla 4: REACCION DE INJERTO CONTRA HUESPED EN HIBRIDOS ADULTOS F1 (BALB/c x AKR).

Injerto de esplenocitos BALB/c	N°de células	N°de ratones	Diferencia peso g.p. <sup>a</sup> (mg)	p*
No inmunes	10 x 10 <sup>6</sup>	9	2.36 <sup>±</sup> 0.38 <sup>b</sup>	
4 dosis GRCo	10 x 10 <sup>6</sup>	6	6.52 <sup>±</sup> 0.45	< 0.001
6 dosis GRCo	10 x 10 <sup>6</sup>	17	6.60 <sup>±</sup> 0.45	< 0.001
8 dosis GRCo	10 x 10 <sup>6</sup>	7	7.54 <sup>±</sup> 0.51	< 0.001
10 dosis GRCo	10 x 10 <sup>6</sup>	8	2.54 <sup>±</sup> 0.34	NS

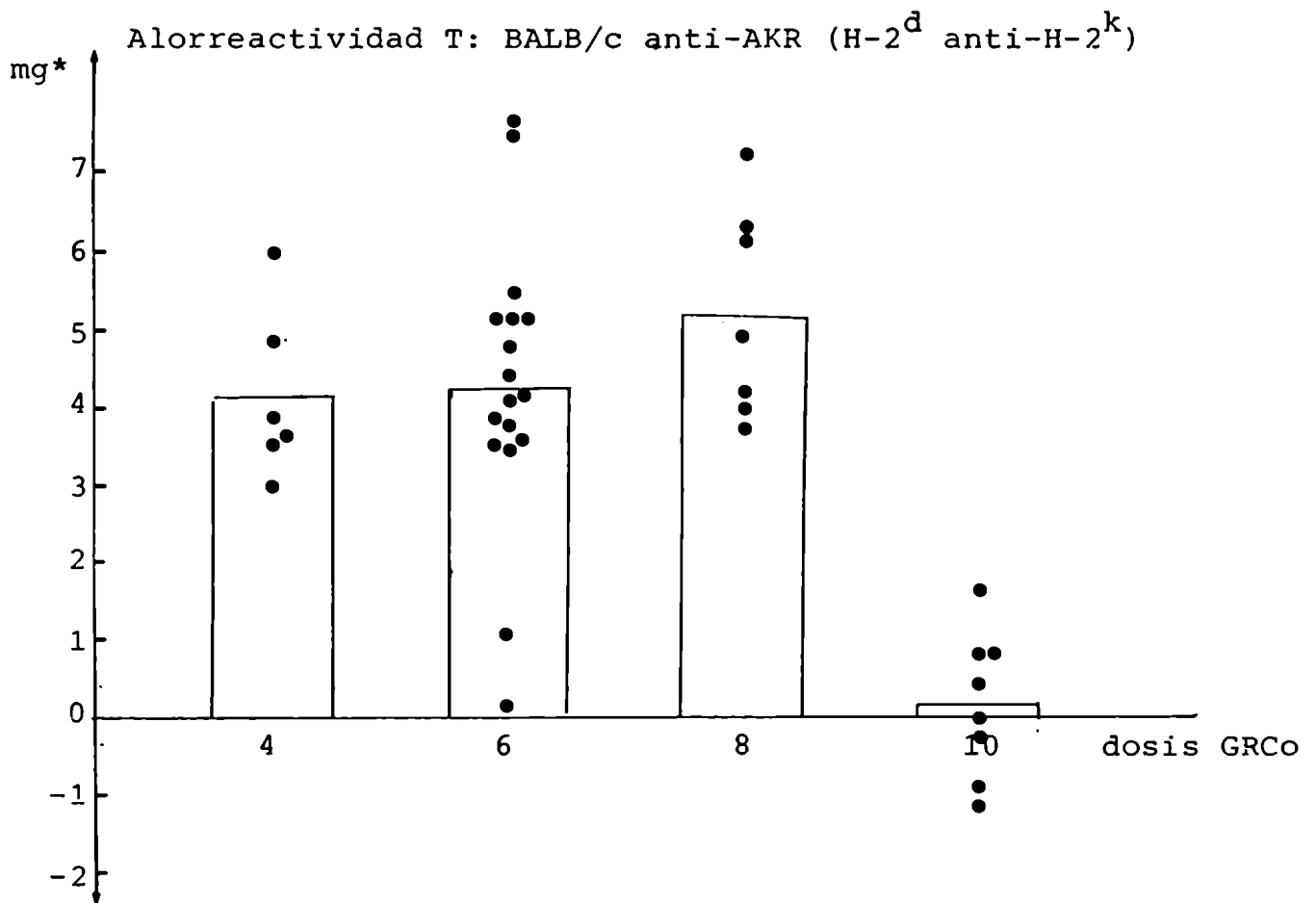
a: Siete días después de la inoculación de los esplenocitos en la almohadilla plantar derecha.

b: promedio en mg<sup>±</sup>ES

\*: calculada por "t" de Student.



Figura 34: NIVELES ALORREACTIVOS T ESPLÉNICOS MEDIDOS MEDIANTE REACCIONES DE GVH EN HIBRIDOS F1 (BALB/c x AKR) ADULTOS



\*: GVH experimental - GVH normal

El cero de la figura representa el nivel normal de alorreactividad T BALB/c anti-AKR  $\pm$  ES (línea punteada).

Tabla 5: REACCION DE INJERTO CONTRA HUESPED EN RATONES Swiss RECIEN NACIDOS

Injerto de esplenocitos BALB/c	Dosis N° células	n <sup>a</sup>	Indice esplénico medio <sup>b</sup> (x10 <sup>3</sup> )	p <sup>c</sup>
No inmunes	3.25x10 <sup>6</sup>	7	5.38 ± 0.19	
4 dosis GRCo	3.25x10 <sup>6</sup>	7	10.15 ± 0.71	< 0.001
6 dosis GRCo	3.25x10 <sup>6</sup>	9	4.58 ± 0.36	N.S.
8 dosis GRCo	3.25x10 <sup>6</sup>	11	4.86 ± 0.31	N.S.
10 dosis GRCo	3.25x10 <sup>6</sup>	8	5.13 ± 0.46	N.S.

a: Número de ratones utilizados

b: Promedio de índices esplénicos individuales calculados como la razón entre el peso del bazo y el peso corporal, 10 días después de la inoculación por vía intraperitoneal de los esplenocitos.<sup>±ES</sup>

c: Calculada por test "t" de Student.

A partir de la inoculación de 10 dosis de GRCo, se obtuvieron valores que no diferían significativamente de los normales.

En la Figura 34 se graficaron los aumentos alorreactivos registrados a lo largo del esquema de inmunización sobre los valores normales, de modo que el cero del gráfico represente el nivel normal de alorreactividad.

1.1.b. Niveles alorreactivos T esplénicos medidos mediante reacciones de GVH en ratones de la cepa Swiss recién nacidos.

En la Tabla 5 se observan los resultados obtenidos:

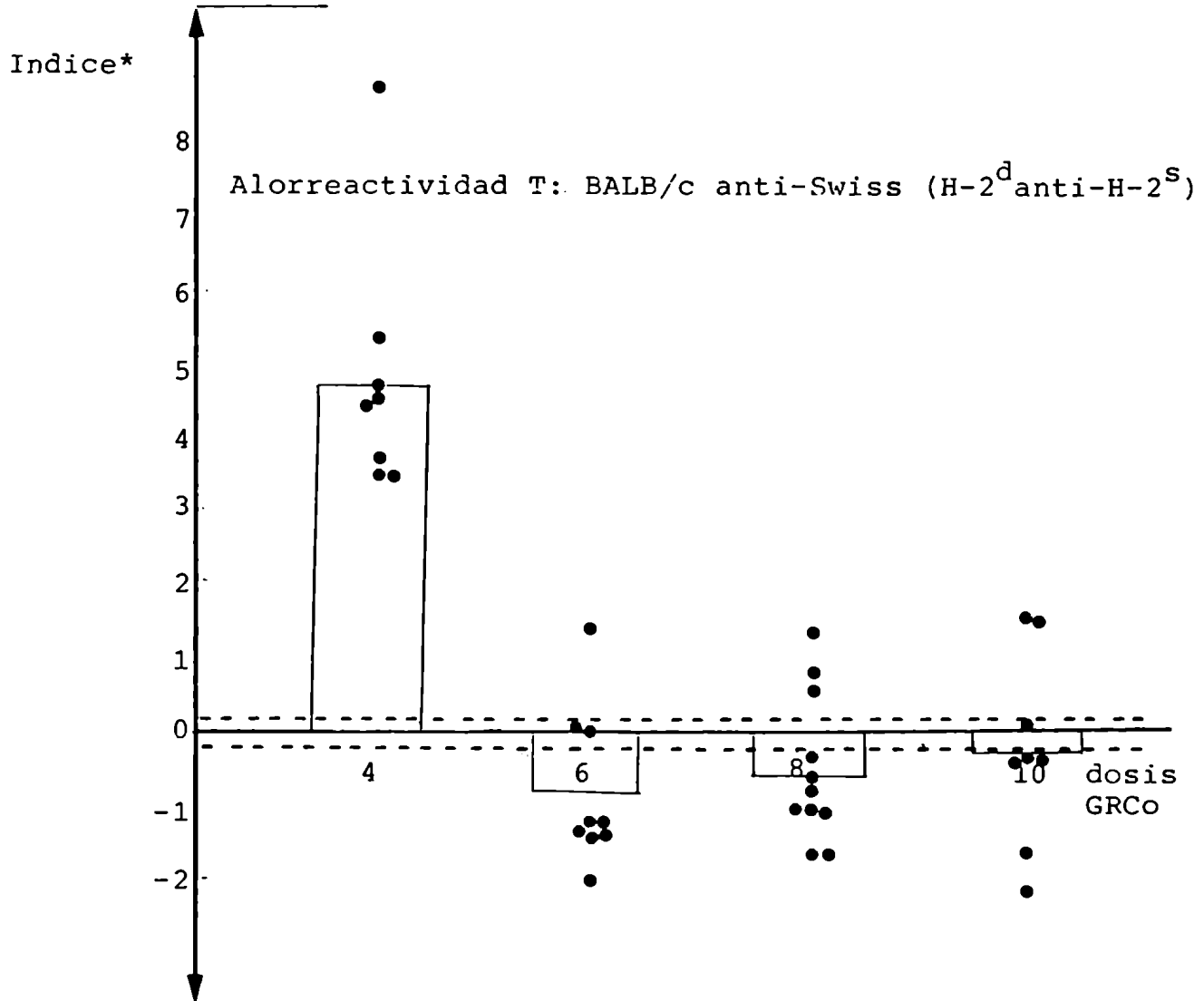
La inoculación de 4 dosis de GRCo produjo un aumento significativo de las reacciones de GVH desencadenadas en ratones recién nacidos de la cepa Swiss ( $p < 0.001$ ).

A partir de la inoculación de 6 dosis de GRCo se obtuvieron valores que no diferían significativamente de los normales.

En la Figura 35 se graficaron los valores obtenidos con respecto al nivel alorreactivo normal.

1.2. EN COMBINACIONES QUE NO INVOLUCRAN DIFERENCIAS A NIVEL

Figura 35: NIVELES ALORREACTIVOS T ESPLÉNICOS MEDIDOS MEDIANTE REACCIONES DE GVH EN RATONES DE LA CEPA Swiss RECIEN NACIDOS



\*: GVH experimental - GVH normal

El cero de la figura representa el nivel normal de alorreactividad T BALB/c anti-Swiss  $\pm$  ES (línea punteada).

Tabla 6: REACCIONES DE INJERTO CONTRA HUESPED EN HIBRIDOS  
ADULTOS F1 (BALB/c x C57Bl/Ks)

Injerto de esplenocitos BALB/c	N° de células	N° de ratones	Diferencia peso g.p. <sup>a</sup> (mg)	p*
No inmunes	2 x 10 <sup>6</sup>	14	-0.08 <sup>±</sup> 0.16 <sup>b</sup>	
4 dosis GRCo	2 x 10 <sup>6</sup>	7	0.14 <sup>±</sup> 0.17	NS
6 dosis GRCo	2 x 10 <sup>6</sup>	8	0.09 <sup>±</sup> 0.10	NS
8 dosis GRCo	2 x 10 <sup>6</sup>	6	-0.15 <sup>±</sup> 0.15	NS
10 dosis GRCo	2 x 10 <sup>6</sup>	10	0.01 <sup>±</sup> 0.08	NS

a: Siete días después de la inoculación de los esplenocitos en la almohadilla plantar derecha.

b: Promedio en mg<sup>±</sup>ES

\*: Calculada por "t" de Student

## DE ANTIGENOS MAYORES DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

La inmunización de ratones de la cepa BALB/c con diferentes dosis de GRCo, no indujo modificaciones significativas en los niveles de alorreactividad T esplénica frente a cepas que no diferían de la inmunizada con el antígeno, a nivel de antígenos mayores de histocompatibilidad.

### 1.2.a. Niveles alorreactivos T esplénicos medidos mediante reacciones de GVH en híbridos F1 (BALB/c x C57Bl/Ks) adultos.

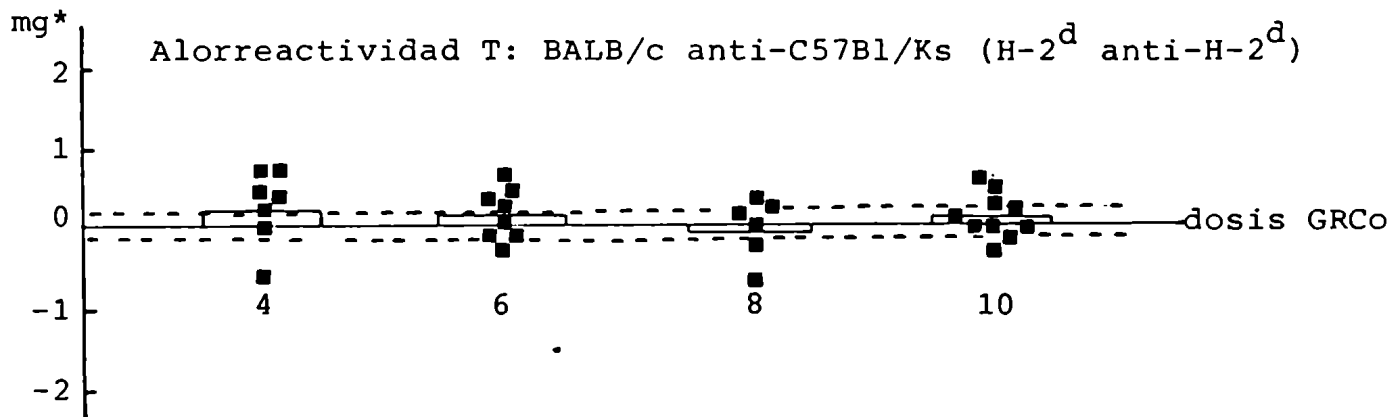
En la Tabla 6 puede observarse que la inoculación de 4; 6; 8 y 10 dosis de GRCo no indujo modificaciones de significación en los niveles de alorreactividad T esplénicos medidos mediante reacciones de GVH en híbridos F1 (BALB/c x C57Bl/Ks) adultos.

En la Figura 36 se graficaron los valores obtenidos con respecto a los niveles alorreactivos normales.

### 1.2.b. Niveles alorreactivos T esplénicos medidos mediante reacciones de GVH en híbridos F1 (BALB/c x DBA/2) adultos y recién nacidos.

La inoculación de 4; 6; 8 y 10 dosis de GRCo en ratones de la cepa BALB/c no indujo modificaciones significativas en el nivel de alorreactividad T esplénica medida

Figura 36: NIVELES ALORREACTIVOS T ESPLÉNICOS MEDIDOS MEDIANTE REACCIONES DE GVH EN HIBRIDOS F1 (BALB/c x C57B1/Ks) ADULTOS



\*: GVH experimental - GVH normal

El cero de la figura representa el nivel normal de alorreactividad T BALB/c anti-C57B1/Ks  $\pm$  ES (línea punteada).

mediante reacciones de GVH en híbridos F1 (BALB/c x DBA/2) adultos (Tabla 7). En la Figura 37 se graficaron los valores obtenidos con respecto a los niveles alorreactivos normales.

Se realizaron también reacciones de GVH en híbridos F1 (BALB/c x DBA/2) recién nacidos. En la Tabla 8, puede observarse que la inoculación 4; 6; 8 y 10 dosis de GRCo no indujo reacciones de GVH significativamente diferentes a los valores normales. En la Figura 38, se graficaron los valores obtenidos con respecto a los niveles alorreactivos normales.

## 2. CITOTOXICIDAD DEPENDIENTE DE COMPLEMENTO SOBRE GANGLIOS POPLITEOS DE RATONES BALB/c QUE SUFREN REACCIONES DE GVH LOCALES.

Con el fin de determinar si el aumento registrado en el peso de los g.p. de los híbridos F1 (BALB/c x AKR) inoculados con células BALB/c, se debe a la proliferación de las células injertadas, se realizaron ensayos de citotoxicidad dependiente de complemento. El suero BALB anti-AKR lisó las células de ganglios F1 inoculados con células BALB/c con una eficiencia del 96%. Cuando se realizaron los ensayos de citotoxicidad en 12 ganglios de híbridos F1 que habían recibido inóculos BALB/c en la almohadilla plantar, se determinó que el  $34 \pm 1\%$  de las células de los ganglios eran células BALB.



Tabla 7: REACCIONES DE INJERTO CONTRA HUESPED EN HIBRIDOS ADULTOS F1 (BALB x DBA/2).

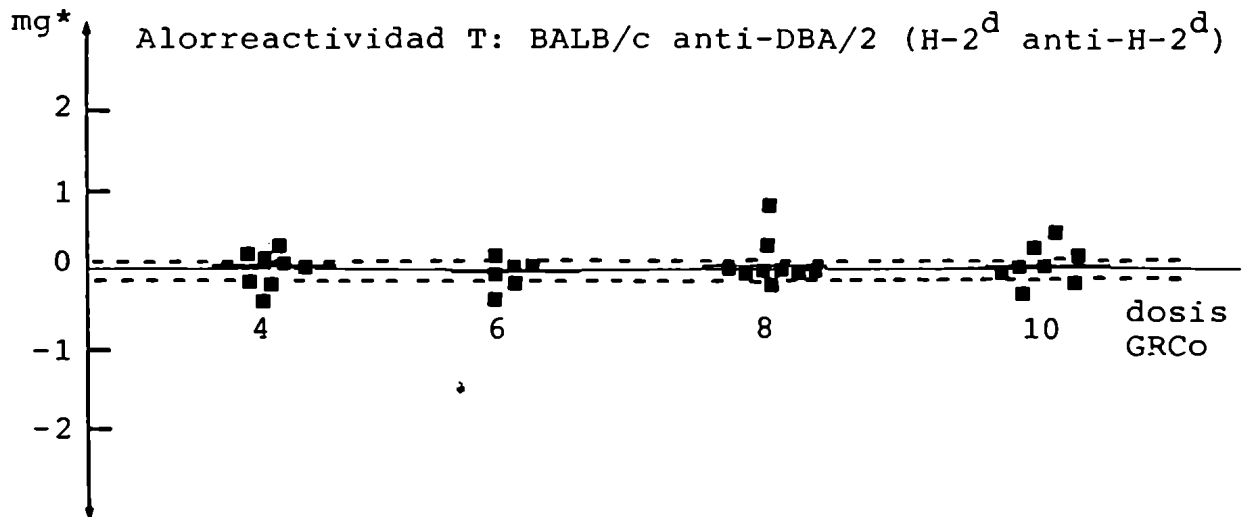
Injerto de esplenocitos BALB/c	N° de células	N° de ratones	Diferencia peso g.p. <sup>a</sup> (mg)	p*
No inmunes	5 x 10 <sup>6</sup>	15	0.17 ± 0.07 <sup>b</sup>	
4 dosis GRCo	5 x 10 <sup>6</sup>	8	0.25 ± 0.07	NS
6 dosis GRCo	5 x 10 <sup>6</sup>	6	0.15 ± 0.09	NS
8 dosis GRCo	5 x 10 <sup>6</sup>	9	0.26 ± 0.10	NS
10 dosis GRCo	5 x 10 <sup>6</sup>	8	0.20 ± 0.08	NS

a: Siete días después de la inoculación de los esplenocitos en la almohadilla plantar derecha.

b: Promedio en mg<sup>±</sup>ES

\*: Calculada por "t" de Student.

Figura 37: NIVELES ALORREACTIVOS T ESPLENICOS MEDIDOS MEDIANTE REACCIONES DE GVH EN HIBRIDOS F1(BALB/c x DBA/2) ADULTOS



\*: GVH experimental - GVH normal

El cero de la figura representa el nivel normal de alorreactividad T BALB/c anti-DBA/2  $\pm$  ES (línea punteada).

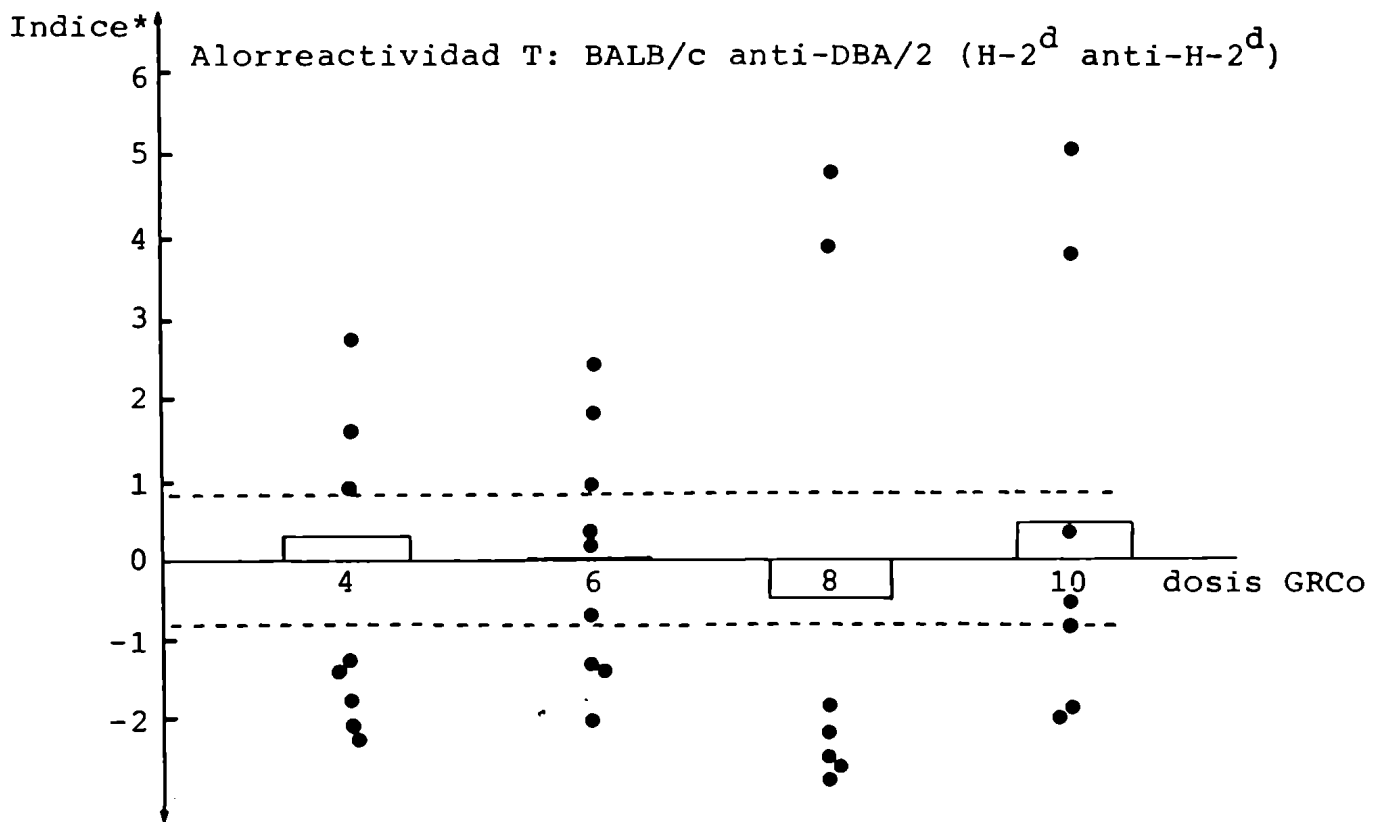
Tabla 8: REACCION DE INJERTO CONTRA HUESPED EN RATONES RECIEN NACIDOS  
F1 (BALB/c x DBA/2).

Injerto de esplenocitos BALB/c	N° de células	N° de ratones	Indice esplénico <sup>a</sup> x 10 <sup>3</sup>	p*
No inmunes	5 x 10 <sup>6</sup>	7	9.07 ± 0.81	
4 dosis GRCo	5 x 10 <sup>6</sup>	8	8.64 ± 0.68	N.S.
6 dosis GRCo	5 x 10 <sup>6</sup>	9	9.09 ± 0.51	N.S.
8 dosis GRCo	5 x 10 <sup>6</sup>	7	8.56 ± 1.22	N.S.
10 dosis GRCo	5 x 10 <sup>6</sup>	7	9.66 ± 1.06	N.S.

a: Promedio de índices esplénicos individuales calculados como la razón entre el peso del bazo y el peso corporal, 10 días después de la inoculación por vía i.p. de los esplenocitos.

\*: Calculada por "t" de Student.

Figura 38: NIVELES ALORREACTIVOS T ESPLÉNICOS MEDIDOS MEDIANTE REACCIONES DE GVH EN HÍBRIDOS F1 (BALB/c x DBA/2) RECIÉN NACIDOS



\*: GVH experimental - GVH normal

El cero de la figura representa el nivel normal de alorreactividad T BALB/c anti-DBA/2  $\pm$  ES (línea punteada).

3. DETERMINACION DE ACTIVIDAD ANTI-IDIOTIPICA BALB ANTI-GRCO EN EL SUERO F1 (BALB/c x AKR).

Como puede observarse en la Tabla 9, el suero F1 (BALB/c x AKR) anti(BALB/c anti-GRCo) poseía actividad contra idiotipos BALB/c anti-GRCo. La incubación de este suero F1 con suero Swiss anti-GRCo no inhibió la hemoaglutinación de GRCo por dicho suero, ni disminuyó su título.

4. EFFECTO DE UN SUERO CON ACTIVIDAD ANTI-IDIOTIPICA BALB/c ANTI-GRCO SOBRE LA ALORREACTIVIDAD T BALB/c ANTI-AKR.

Con el objeto de investigar si los aumentos registrados en el nivel de alorreactividad esplénica luego de la inoculación de GRCo, se debía a la proliferación de las poblaciones T reactivas a antígenos mayores de histocompatibilidad, se estudió el efecto de un suero F1 (BALB/c x AKR) anti-idiotipo (BALB/c anti-GRCo) sobre la alorreactividad T. Para esto, grupos de ratones F1 (BALB/c x AKR) adultos fueron inoculados por vía i.v. con el suero que contenía actividad anti-idiotípica BALB/c anti-GRCo, 24 horas antes de desencadenar en ellos, reacciones locales de GVH con esplenocitos de ratones BALB/c inoculados con 6 dosis de GRCo. Esta dosis de antígeno había mostrado provocar reacciones de GVH significativamente mayores que los esplenocitos BALB/c no inmunes a dicho antígeno. Como grupos controles se estudiaron: a) ratones F1 (BALB/c x AKR) inoculados con suero F1 (BALB/c x AKR) normal en los que se desencadenaron reacciones de GVH con esplenocitos de ratones BALB/c inmunes a GRCo (6 dosis) o esplenocitos BALB no in-

Tabla 9: INHIBICION POR SUERO ANTI-IDIOTIPICO F1(BALB/c x AKR) ANTI-GRCO DE LA HEMOAGLUTINACION DIRECTA MEDIADA POR SUERO BALB/c ANTI-GRCo\*.

Proporción a:b	Dilución final de suero BALB/c anti-GRCo			
	1:10	1:20	1:40	1:80
1:0	+	+	+	+
1:1	+	+	+	+
1:3	+	+	-	-
1:6	+	-	-	-
1:9	-	-	-	-

\*: Se incubó suero BALB/c anti-GRCo (título hemoaglutinante 1:80) con distintas proporciones de suero F1 anti-(BALB/c anti-GRCo). Luego se agregaron GRCo.

a: Suero BALB/c anti-GRCo de título hemoaglutinante 1:80

b: Suero F1 anti-(BALB/c anti-GRCo).

#### Controles

Se utilizó como control suero Swiss anti-GRCo. El suero F1(BALB/c x AKR) anti(BALB/c anti-GRCo) no inhibió la hemoaglutinación de dicho control en ninguna de las proporciones testeadas (1:0 a 1:9), ni en ninguna de las diluciones usadas. O sea, no disminuyó tampoco el título del suero Swiss anti-GRCo. La incubación con suero F1(BALB/c x AKR) normal tampoco inhibió la hemoaglutinación del suero BALB/c anti-GRCo.

munizados; b) ratones F1 (BALB/c x AKR) inoculados con suero anti-idiotipo (BALB/c anti-GRCo) en los que se desencadenaron reacciones de GVH inoculándoseles esplenocitos BALB/c no inmunes; c) ratones F1(BALB/c x AKR) inoculados con suero normal F1(BALB/c x AKR) y desafiados con esplenocitos BALB/c inmunes a AKR; d) ratones F1(BALB/c x AKR) inoculados con el suero anti-idiotípico (BALB/c anti-GRCo) y desafiados con esplenocitos BALB/c inmunes a AKR. Los grupos b), c) y d) tenían como objeto investigar si el suero F1(BALB/c x AKR) anti-idiotipo (BALB/c anti-GRCo) poseía actividad sobre el receptor T BALB/c anti-AKR.

Como puede observarse en la Tabla 10:

1. La inoculación de suero F1 (BALB/c x AKR) normal en los F1 (BALB/c x AKR) no modificó el nivel de alorreactividad T, BALB/c anti-AKR. El valor medio obtenido cuando se inoculan esplenocitos BALB/c normales no inmunes en ratones F1 inoculados 24 horas antes con suero F1 normal no difirió de los valores obtenidos cuando no se inoculó suero alguno en los F1.
2. La inoculación del suero anti-idiotipo BALB/c anti-GRCo disminuyó significativamente los valores de GVH obtenidos cuando se inocularon esplenocitos BALB/c inmunes a GRCo ( $p < 0.001$ ).
3. La inoculación del suero anti-idiotipo BALB/c anti-GRCo no afectó el nivel de alorreactividad obtenido cuando se inocularon esplenocitos BALB/c normales no inmunes.
4. La inoculación de esplenocitos BALB/c inmunes a AKR

Tabla 10: REACCION DE INJERTO CONTRA HUESPED EN HIBRIDOS ADULTOS F1(BALB/c x AKR). EFECTO DE UN SUERO ANTI-IDIOTIPO F1(BALB/C x AKR) ANTI-GRCo SOBRE EL AUMENTO DE ALORREACTIVIDAD REGISTRADO LUEGO DE LA INOCULACION DE GRCo.

Injerto de esplenocitos BALB/c	Nº de células	Pretratamiento <sup>a</sup> del huésped con suero F1(BALB/c x AKR)	Nº de ratones	Diferencia peso g.p. <sup>b</sup>	p <sup>c</sup>
normales no inmunes	10 x 10 <sup>6</sup>	normal	10	2.18 ± 0.27	
6 dosis GRCo	10 x 10 <sup>6</sup>	normal	17	6.60 ± 0.45	< 0.001
6 dosis GRCo	10 x 10 <sup>6</sup>	anti-idiotipo anti-GRCo	9	3.30 ± 0.40	< 0.001
normales no inmunes	10 x 10 <sup>6</sup>	anti-idiotipo anti-GRCo	6	2.21 ± 0.25	N.S.
inmunes a AKR <sup>d</sup>	10 x 10 <sup>6</sup>	normal	12	6.08 ± 0.56	N.S.
inmunes a AKR	10 x 10 <sup>6</sup>	anti-idiotipo anti-GRCo	10	5.89 ± 0.51	N.S.

a: Inoculación por vía endovenosa del suero F1(BALB x AKR) (0.2ml) a los ratones F1(BALB x AKR) 24 horas antes de desencadenar en los mismos, la reacción de injerto contra huésped.

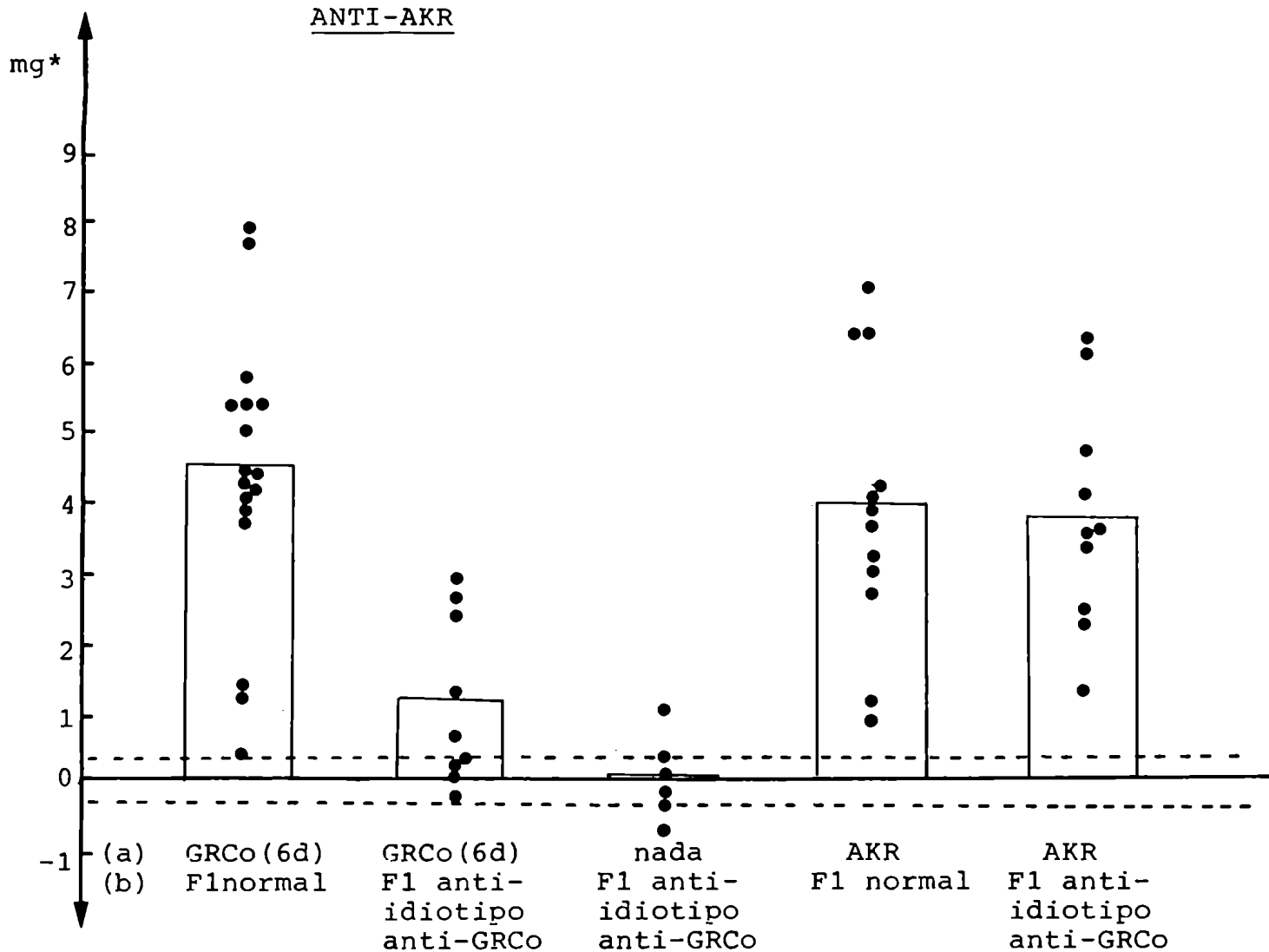
b: Siete días después de la inoculación de los esplenocitos en la almohadilla plantar derecha. ± ES

c: Calculada por el test de "t" de Student.

d: La inmunización constó de un injerto de piel AKR y dos dosis de 10 x 10<sup>8</sup> células de un pool de bazo y ganglios AKR.



Figura 39: EFECTO DE UN SUERO CON ACTIVIDAD ANTI-IDIOTIPICA  
BALB/c ANTI-GRCo SOBRE LA ALORREACTIVIDAD T BALB/c  
ANTI-AKR



\*: GVH experimental - GVH normal  
(a): esplenocitos inmunes a  
(b): suero

El cero de la figura representa el nivel normal de alorreactividad T BALB/c anti-AKR  $\pm$  ES (línea punteada).

indujo reacciones de GVH significativamente superiores a las obtenidas con esplenocitos BALB/c normales no inmunes.

5. La inoculación del suero anti-idiotipo anti-GRCo no afectó el nivel de alorreactividad obtenido mediante la inoculación de esplenocitos BALB/c inmunes a AKR.

En la Figura 39 se graficaron los valores obtenidos en los diferentes grupos con respecto a los niveles normales de alorreactividad BALB/c anti-AKR.

#### 5. EFFECTO DE LA INOCULACION DE GRC POR VIA i.p. SOBRE LA INCIDENCIA DE DAÑO FETAL.

Hembras de la cepa BALB/c fueron inmunizadas por vía i.p. con diferentes dosis de GRC. Cuatro días después, de recibir la última dosis fueron apareadas con machos de las cepas BALB/c (singeneicos), Swiss (alogeneicos, diferente H-2) o DBA/2 (alogeneicos, igual H-2). Se observaron diferentes parámetros: número de preñadas sobre total de animales, porcentaje de runting en las crías, porcentaje de abortos, porcentaje total de muertes y número de crías por madre.

##### 5.1. CRUZAMIENTOS BALB/c x BALB/c.

En la Tabla 11 se observan los resultados obtenidos cuando se inocularon las distintas dosis de GRC en hem

Tabla 11: DAÑO FETAL POR PRETRATAMIENTO DE LA MADRE CON DIFERENTES DOSIS DE GRC.

Preñez BALB x BALB	N°preñadas/ total	Runtin n/total	%	Abortos n/total	%	Total muertes n/total	%	N°crías/ madre
0 dosis	14/18	7/89	8	1/14	7	13/95	14	6.8
4 dosis	18/18	13/91	14	0/18	0	13/91	14	5.0
8 dosis	4/18	5/24	20	0/4	0	5/24	20	6.0
12 dosis	14/18	5/68	7	3/14	21	23/86*	27	6.0

\*:  $p < 0.05$ , calculada por test  $\chi^2$

bras que fueron apareadas con machos BALB/c. La inoculación de 4 y 8 dosis del antígeno no produjo alteraciones significativas en ninguno de los parámetros observados en las crías.

La inoculación de 12 dosis de glóbulos rojos produjo una incidencia de abortos superior al porcentaje de abortos registrados en los controles. No existió diferencia en la incidencia de runting hasta el destete. El total de muertes fue del 27%, valor que difieren significativamente del obtenido en los cruzamientos controles ( $p < 0.05$ ). No se registraron variaciones en el número promedio de crías por madre.

## 5.2. CRUZAMIENTOS BALB/c $\times$ Swiss.

En la Tabla 12 se observan los resultados obtenidos cuando las hembras BALB/c inmunizadas con GRC se cruzaron con machos de la cepa Swiss. La inoculación de 4 dosis del antígeno provocó una incidencia de abortos del 44%, significativamente superior ( $p < 0.01$ ) a la del grupo control. El total de muertes fue del 44% mientras que en los cruzamientos controles fue del 17% ( $p < 0.001$ ). Tanto el número de preñadas como el número de crías por madre no sufrió alteraciones significativas.

La inoculación de 8 y 12 dosis del antígeno no produjo modificaciones en ninguno de los parámetros considerados.

Tabla 12: DAÑO FETAL POR PRETRATAMIENTO DE LA MADRE CON DIFERENTES DOSIS DE GRC.

Preñez BALB/c x Swiss	N°preñadas/ total	Runting n/total	%	Abortos n/total	%	Total muertes n/total	%	N°crías/ madre
0 dosis	14/18	19/108	17	0/14	0	19/108	17	7.7.
4 dosis	16/18	3/59	5	7/16*	44	45/101**	44	6.5
8 dosis	10/18	10/63	16	1/10	10	16/69	23	7.0
12 dosis	11/18	9/64	14	1/11	9.9	15/70	21	6.4

\* :  $p < 0.01$  calculada por test  $\chi^2$   
 \*\* :  $p < 0.001$  calculada por test  $\chi^2$

### 5.3. CRUZAMIENTOS BALB/c x DBA/2.

En la Tabla 13, se muestran los resultados obtenidos cuando hembras BALB/c inmunizadas con GRC se cruzaron con machos de la cepa DBA/2. Ninguna de las dosis de antígeno examinadas produjo alteraciones significativas de los parámetros estudiados.

### 5.4. CRUZAMIENTOS Swiss x Swiss.

En la Tabla 14, se observan los resultados obtenidos cuando se inmunizaron con diferentes dosis de GRC hembras de la cepa Swiss (exocriadas). En este experimento, las hembras fueron cruzadas con machos Swiss. Los parámetros observados fueron los mismos que en los experimentos anteriores. La inoculación de una dosis de GRC no produjo alteraciones en ninguno de los parámetros observados. Cuando se inocularon 4 dosis, la incidencia de runting fue del 14.5%, cifra que resulta muy cercana al límite de significación. No se registraron abortos.

La inoculación de 8 dosis de GRC produjo alteraciones tanto en la incidencia de runting ( $p < 0.05$ ) como en la incidencia de abortos, lo que se ve reflejado en el porcentaje total de muertes que alcanzó el 28.6% ( $p < 0.001$ ).

Tabla 13: DAÑO FETAL POR PRETRATAMIENTO DE LA MADRE CON DIFERENTES DOSIS DE GRC.

Preñez BALB/c x DBA/2	N°preñadas/ total	Runting n/total	%	Abortos n/total	%	Total muertes n/total	%	N°crías/ madre
0 dosis	16/18	9/134	7	1/16	6	17/142	12	8.9
4 dosis	14/18	5/100	5	0/14	0	5/100	5	7.1
8 dosis	11/18	4/82	5	1/11	9.9	12/90	13	8.2
12 dosis	17/18	10/124	8	1/17	6	18/132	14	7.7.

Tabla 14: DAÑO FETAL POR PRETRATAMIENTO DE LA MADRE CON DIFERENTES DOSIS DE GRC.

Preñez Swiss x Swiss	N°preñadas/ total	Runting n/total	%	Abortos n/total	%	Total muertes n/total	%	N° crías/ madre
0 dosis	8/12	4/72	5.5	0/8	0	4/72	5.5	8.8
1 dosis	6/12	2/38	5.2	0/6	0	2/38	5.2	6.3
4 dosis	7/12	8/55	14.5	0/7	0	8/55	14.5	7.8
8 dosis	10/12	19/106*	18.0	2/10	20	35/122**	28.6	10.6

\* :  $p < 0.05$  calculada por test  $\chi^2$

\*\* :  $p < 0.001$  calculada por test  $\chi^2$



### 5.5. CRUZAMIENTOS Swiss x AKR.

En la Tabla 15, se muestran los resultados obtenidos cuando se inmunizaron hembras de la cepa Swiss y se las cruzó con machos de la cepa AKR. La inoculación de una dosis de GRC no produjo alteraciones. La inoculación de 4 dosis del antígeno produjo un 40% de abortos y una incidencia del 25% de muertes totales, significativamente diferente a la incidencia presentada en los cruzamientos controles ( $p < 0.01$ ).

Cuando se inocularon 8 dosis de GRC no fue posible detectar hembras preñadas durante el período de observación, a pesar de haber cambiado repetidamente los machos.

En resumen, la inoculación de futuras madres con determinadas dosis del antígeno, indujo modificaciones en algunos de los parámetros examinados -fundamentalmente en cuanto a la incidencia de abortos, muerte al destete y muertes totales- en el caso de cruzamientos alogeneicos con diferencias a nivel de H-2. En los cruzamientos alogeneicos sin diferencias a nivel de H-2, no se detectaron alteraciones de los parámetros examinados en ninguna de las dosis utilizadas. En los cruzamientos singeneicos se detectaron alteraciones sólo cuando se inmunizó con 12 dosis del antígeno.

### 6. PESO DE GANGLIOS PARAAORTICOS DE LOS RATONES INOCULADOS CON GRC POR VIA INTRAUTERINA.

Tabla 15: DAÑO FETAL POR PRETRATAMIENTO DE LA MADRE CON DIFERENTES DOSIS DE GRC.

Preñez Swiss x AKR	N°preñadas/ total	Runting n/total	%	Abortos n/total	%	Total muertes n/total	%	N° crías madre
0 dosis	7/12	2/46	4.3	0/7	0	2/46	4.3	6.6
1 dosis	2/12	1/19	5.2	0/2	0	1/19	5.2	9.5
4 dosis	5/12	2/44	4.5	2/5	40	14/56*	25.0	8.8
8 dosis	0/12	-	-	-	-	-	-	-

\*p < 0.01, calculada por test  $\chi^2$

Grupos de ratones BALE/c que habían recibido progesterona -de modo de alcanzar estados de pseudopreñez- fueron inoculados en uno de sus cuernos uterinos con GRC, en momentos en que la concentración de la hormona en sangre era similar a la que normalmente posee la cepa al cuarto día de preñez. Los niveles de progesterona en suero en el momento de la inoculación de GRC resultaron de 440ng/ml. Este valor fue similar al existente al cuarto día de preñez: 500ng/ml. Estos datos concuerdan con los determinados por otros autores (8). Se inocularon también ratones que no habían recibido progesterona. Como controles, se utilizaron ratones que habían recibido únicamente progesterona, ratones inoculados con progesteron y con solución fisiológica por vía i.u. y ratones que solamente habían sido inoculados con solución fisiológica por vía i.u. Diez días después de la inoculación, se extrajeron los ganglios paraaórticos drenantes del cuerno uterino inoculado y los contralaterales y se pesaron de modo de establecer la diferencia de peso entre ellos.

En la Tabla 16 pueden observarse los resultados obtenidos. Los ratones normales no presentaron diferencias significativas en el peso de sus ganglios paraaórticos derecho e izquierdo. Tampoco se observaron diferencias significativas de peso en los ratones que habían recibido sólo progesterona ni en aquellos inoculados por vía i.u. con solución fisiológica en presencia o no de progesterona. Los animales inoculados solamente con el antígeno presentaron aumentos significativos en el peso de los ganglios paraaórticos drenantes del cuerno uterino inoculados

Tabla 16: DIFERENCIA DE PESO ENTRE GANGLIOS PARAAORTICOS  
DERECHO E IZQUIERDO DE RATONES BALB/c INMUNIZA-  
DOS EN UTERO CON GRC.

Grupo	Diferencia peso <sup>b</sup> mg	N° de ratones
Normal no inmune	-0.3 ± 0.25	14
Progesterona + SF <sup>a</sup> i.u.	1.16 ± 0.53	7
Progesterona	0.2 ± 0.17	5
SF i.u.	1.03 ± 0.50	9
GRC i.u.	1.65 ± 0.46*	10
Progesterona + GRC i.u.	10.2 ± 2.1**	6

\* p < 0.01

\*\* p < 0.001

Calculados por test "t" de Student

a: Solución fisiológica

b: Diferencia de peso en mg<sup>±</sup>ES

( $p < 0.01$ ) con respecto a los ganglios contralaterales. Aquellos inoculados en estado de pseudopreñez, presentaron aumentos muy grandes del tamaño de los ganglios drenantes del inóculo de GRC ( $p < 0.001$ ). Este último grupo presentó diferencias muy significativas con respecto al grupo control que había recibido progesterona más solución fisiológica ( $p < 0.002$ ) y con respecto al grupo inoculado con GRC sin inoculación de progesterona ( $p < 0.001$ ).

## 7. EFECTO DE LA INMUNIZACION INTRAUTERINA CON GRC SOBRE LOS NIVELES ALORREACTIVOS T EN LOS GANGLIOS QUE DRENAN EL UTERO Y EN BAZO.

### 7.1. NIVELES DE ALORREACTIVIDAD EN GANGLIOS PARAAORTICOS.

#### 7.1.a. Alorreactividad T anti-Swiss.

Se realizaron reacciones de GVH utilizando como injerto suspensiones celulares de ganglios paraaórticos drenantes de cuernos uterinos inoculados con GRC tanto en ratones con progesterona como en ratones sin pretratamiento con dicha hormona. Como controles se injertaron suspensiones de ganglios paraaórticos no inmunes y de ganglios paraaórticos provenientes de ratones tratados con progesterona e inoculados con solución fisiológica intrauterina. Las reacciones de GVH se realizaron en ratones Swiss recién nacidos y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17: EFFECTO DE LA INMUNIZACION INTRAUTERINA CON GRC  
SOBRE LOS NIVELES ALORREACTIVOS T EN LOS GANGLIOS  
PARAAORTICOS (g.p.a.). ALORREACTIVIDAD BALB/c ANTI-  
Swiss.

Injerto de g.p.a. BALB/c	N° de células	N° de ratones	IE x 10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>	p *
No inmune, normales	5 x 10 <sup>5</sup>	10	7.28 <sup>±</sup> 0.37	
+ Progesterona	5 x 10 <sup>5</sup>	11	6.15 <sup>±</sup> 0.16	< 0.01
+ Progesterona + GRC i.u.	5 x 10 <sup>5</sup>	10	8.81 <sup>±</sup> 0.46	< 0.001
+ GRC i.u.	5 x 10 <sup>5</sup>	9	7.14 <sup>±</sup> 0.35	NS

a: promedio de índices esplénicos individuales <sup>±</sup> ES

\*: calculada por test "t" de Student.

Los niveles de alorreactividad T anti-Swiss en los ganglios de ratones inoculados con GRC sin pretratamiento con progesterona, no difirieron de los niveles normales. Los ratones pretratados solo con progesterona presentaron niveles alorreactivos inferiores a los normales ( $p < 0.01$ ). En cambio, los ratones pretratados con progesterona e inoculados por vía i.u. con el antígeno convencional mostraron niveles significativamente superiores tanto en comparación con los controles que habían recibido sólo el pretratamiento hormonal ( $p < 0.001$ ) como con los controles normales no inmunes ( $p < 0.01$ ).

#### 7.1.b. Alorreactividad T BALB/c anti-AKR.

Se realizaron reacciones de GVH locales en híbridos F1 (BALB/c x AKR) hembras adultas. Se utilizaron como injerto, células de ganglios paraaórticos de los mismos grupos que los experimentados en el punto 7.1.a. En la Tabla 18, pueden observarse los resultados obtenidos:

Los niveles de alorreactividad T anti-AKR en los ganglios paraaórticos de los animales inoculados con GRC sin pretratamiento con la hormona, no difirieron de los valores normales. Los animales pretratados únicamente con la hormona, presentaron niveles alorreactivos inferiores ( $p < 0.001$ ). Por el contrario, los ratones pretratados con progesterona e inoculados con el antígeno convencional, presentaron niveles alorreactivos significativamente superiores a los controles ( $p < 0.001$ ).

Tabla 18: EFFECTO DE LA INMUNIZACION INTRAUTERINA CON GRC  
SOBRE LOS NIVELES ALORREACTIVOS T EN LOS GANGLIOS  
PARAAORTICOS (g.p.a.). ALORREACTIVIDAD BALB/c ANTI-  
AKR.

INJERTO DE g.p.a. BALB/c	N° DE CELULAS	N° DE RATONES	DIFERENCIA PESO g.p. <sup>a</sup>	p*
No inmunes	5 x 10 <sup>5</sup>	8	1.36 ± 0.09	
+ Progesterona	5 x 10 <sup>5</sup>	8	0.62 ± 0.08	< 0.001
+ Progesterona + GRC i.u.	5 x 10 <sup>5</sup>	8	2.35 ± 0.13	< 0.001
+ GRC i.u.	5 x 10 <sup>5</sup>	8	1.40 ± 0.09	N.S.

a: Siete días después de la inoculación del injerto en la almohadilla plantar derecha de híbridos F1 (BALB/c x AKR) adultos; expresados en mg<sup>±</sup>ES.

\*: Calculada por test "t" de Student.



## 7.2. NIVELES DE ALORREACTIVIDAD T EN BAZO.

### 7.2.a. Alorreactividad T BALB/c anti-Swiss.

Cuando se realizaron reacciones de GVH utilizando el bazo de ratones que habían recibido los mismos pretratamientos que en los grupos anteriores, se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 19):

Todos los grupos estudiados presentaron niveles alorreactivos anti-Swiss similares, no encontrándose diferencias significativas entre ninguno de ellos.

### 7.2.b. Alorreactividad T BALB/c anti-AKR.

En la Tabla 20, se observan los resultados obtenidos cuando se midieron los niveles de alorreactividad T esplénica hacia la cepa AKR. Se analizaron reacciones locales de GVH en híbridos F1 (BALB/c x AKR) adultos utilizando esplenocitos de ratones BALB/c que habían recibido los mismos pretratamientos que los grupos anteriores.

Todos los grupos estudiados presentaron niveles alorreactivos anti-AKR similares, no existiendo diferencia significativa entre ninguno de ellos.

## 8. DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPICOS BALB/C ANTI-AKR EN RATONES INMUNIZADOS CON 10 A 12 DOSIS DE GRCo POR VIA i.p.

Tabla 19: EFFECTO DE LA INMUNIZACION INTRAUTERINA CON GRC  
SOBRE LOS NIVELES ALORREACTIVOS T EN EL BAZO.  
ALORREACTIVIDAD BALB/c ANTI-Swiss.

INJERTO DE BAZO BALB/c	N° DE CELULAS	N° DE RATONES	INDICE ESPLENICO <sup>a</sup> x10 <sup>3</sup>	p*
No inmune	4 x 10 <sup>6</sup>	6	5.04 ± 0.51	
+ Progesterona	4 x 10 <sup>6</sup>	7	5.21 ± 0.44	N.S.
+ GRC i.u.	4 x 10 <sup>6</sup>	8	5.79 ± 0.28	N.S.
+ Progesterona + GRC i.u.	4 x 10 <sup>6</sup>	8	5.31 ± 0.30	N.S.

a: Promedio de índices esplénicos individuales calculados como la razón entre el peso del bazo y el peso corporal, 10 días después de la inoculación por vía i.p. de los esplenocitos.

\*: Calculada por test "t" de Student.

Tabla 20: EFEECTO DE LA INMUNIZACION INTRAUTERINA CON GRC  
SOBRE LOS NIVELES DE ALORREACTIVIDAD T EN EL  
BAZO. ALORREACTIVIDAD BALB/c ANTI-AKR.

INJERTO DE ESPLENOCITOS BALB/c	N° DE CELULAS	N° DE RATONES	DIFERENCIA PESO g.p. <sup>a</sup> mg	p*
No inmunes	10 x 10 <sup>6</sup>	7	2.23 ± 0.15	
+ Progesterona	10 x 10 <sup>6</sup>	8	2.00 ± 0.19	N.S.
+ Progesterona + GRC i.u.	10 x 10 <sup>6</sup>	7	2.28 ± 0.14	N.S.
+ GRC i.u.	10 x 10 <sup>6</sup>	7	2.17 ± 0.21	N.S.

a: Siete después de la inoculación de los esplenocitos en la almohadilla plantar derecha de F1(BALB/c x AKR)adultos, expresado en mg<sup>±</sup>ES.

\*: Calculada por test "t" de Student.

En la Tabla 21 pueden observarse los resultados obtenidos cuando se quiso evaluar la presencia de anticuerpos anti-idiotípicos BALB/c anti-AKR en el suero de ratones BALB/c inmunizados con 10 a 12 dosis de GRCo.

Todos los sueros testeados presentaron reacción positiva frente a IgG BALB/c anti-AKR con un título medio de 3.6. Ninguno de ellos presentó reacción positiva frente a IgG C57Bl/6J anti-AKR. En cuatro de los seis experimentos realizados, se registraron reacciones positivas frente a IgG BALB/c normal con un título medio de 1.75.

## 9. DETECCION DE REACCIONES AUTOINMUNES EN RATONES INMUNIZADOS CON 10-12 DOSIS DE GRCo.

### 9.1. REACCIONES DE INJERTO CONTRA HUESPED EN RATONES SINGENEICOS ADULTOS.

Se realizaron ensayos de GVH locales utilizando como huéspedes ratones singeneicos adultos. Se injertaron en la almohadilla plantar de ratones BALB/c, esplenocitos provenientes de: a) ratones BALB/c normales no inmunizados; b) ratones BALB inmunizados con 5 dosis de GRCo y c) ratones BALB/c inmunizados con 10-12 dosis de GRCo. Al séptimo día, se extrajeron los ganglios linfáticos de los ratones injertados. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 22.

Como puede observarse, los ratones inoculados con esplenocitos provenientes de ratones singeneicos no

Tabla 21: DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPICOS BALB/c ANTI-AKR EN RATONES BALB/c INMUNIZADOS CON 10-12 DOSIS DE GRCo i.p.: HEMOAGLUTINACION INDIRECTA.

Experimento	GRC+IgG BALB anti-AKR				GRC+IgG C57Bl/6J anti-AKR				GRC+IgG BALB normal				GRC
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:1	1:2	1:4	1:8	1:1	1:2	1:4	1:8	
	Dilución suero BALB 10-12 dosis de GRCo												
1.	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
2.	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
3.	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
4.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
6.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 22: DETECCION DE REACCIONES AUTOINMUNES EN RATONES  
INMUNIZADOS A REPETICION CON GRCo: REACCION DE  
INJERTO CONTRA HUESPED EN RATONES SINGENEICOS  
ADULTOS.

INJERTO DE ESPLENOCITOS BALB/C	Nº DE CELULAS	HUESPED	Nº DE RATONES	DIFERENCIA PESO g.p. <sup>a</sup> mg	p*
No inmunes	8 x 10 <sup>6</sup>	BALB/c	12	0.15 ± 0.13	
5 dosis GRCo	8 x 10 <sup>6</sup>	BALB/c	10	0.18 ± 0.10	N.S.
12 dosis GRCo	8 x 10 <sup>6</sup>	BALB/c	10	0.80 ± 0.15	<0.01

a: Siete días después de la inoculación de los esplenocitos en la almohadilla plantar derecha, expresado en mg ± ES

\*: Calculada por test "t" de Student.

inmunizados, no presentaron incrementos significativos en el peso de los ganglios poplíteos drenantes de la al mohadilla plantar inoculada. La inoculación de espleno citos provenientes de ratones inoculados con 5 dosis del antígeno convencional tampoco indujo aumentos en el peso de los ganglios poplíteos. El grupo de ratones inoculados con esplenocitos provenientes de ratones que habían recibido 10-12 ~~dos~~ dosis del antígeno, sí presentó un incremento significativo del peso de los ganglios poplíteos ( $p < 0.01$ ).

#### 9.2. REACCIONES DE INJERTO CONTRA HUESPED EN RATONES SINGENEICOS RECIEN NACIDOS.

Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla 23. Los ratones recién nacidos de la cepa BALB inoculados con esplenocitos provenientes de ratones BALB adultos que habían recibido 11 dosis de GRCo, presentaron índices esplénicos significativamente superiores al de los inoculados con esplenocitos BALB/c m inmunes ( $p < 0.01$ ). Los ratones recién nacidos del grupo experimental presen taban además, signos de estar sufriendo reacciones de GVH.

#### 10. INCIDENCIA DE LEUCEMIAS EN RATONES BALB/c INMUNIZADOS CON 8-12 DOSIS DE GRCo O GRC POR VIA INTRAPERITONEAL.

En la Tabla 24 se observa la incidencia de leucemias que presentaron los ratones ~~BALB~~/c inoculados con 8-

Tabla 23: DETECCION DE REACCIONES AUTOINMUNES EN RATONES INMUNIZADOS A REPETICION CON GRCo: REACCION DE INJERTO CONTRA HUESPED EN RATONES SINGENEICOS RECIEN NACIDOS.

INJERTO DE ESPLENOCITOS BALB/c	N° DE CELULAS	N° DE RATONES	INDICE ESPLENICO <sup>a</sup> (x 10 <sup>3</sup> )	p*	IEs <sup>b</sup> (x10 <sup>3</sup> )
No inmunes	4 x 10 <sup>6</sup>	12	4.50 <sup>±</sup> 0.4		1.6
12 dosis GRCo	4 x 10 <sup>6</sup>	12	7.27 <sup>±</sup> 0.7	<0.01	

a: Promedio de índices esplénicos individuales calculados como la razón entre el peso del bazo y el peso corporal, 10 días después de la inoculación por vía i.p. de los esplenocitos.  
±ES.

\*: Calculada por test "t" de Student.

b: Razón entre ambos IE<sup>a</sup>.



Tabla 24: INCIDENCIA DE LEUCEMIA EN RATONES BALB/c INMUNIZADOS CON REPETIDAS DOSIS DE GRC O GRCo.

	LEUCEMIA		
	N°/TOTAL	%	LATENCIA (meses)
Controles	75/500	15	13-24
8 dosis de GRC	9/24	37.5	4-5
12 dosis de GRCo	21/60	35	6-8

12 dosis de los antígenos convencionales utilizados a lo largo de este trabajo

El 37.5% de los ratones (9/24) que habían recibido 8 inóculos de GRC desarrollaron leucemias con una latencia media de 4-5 meses. Los ratones inoculados con GRCo presentaron también, una alta incidencia de leucemia: 35% (21/60). En este caso, el período de latencia registrado fue entre 6 y 8 meses.

La cepa BALB/c criada en nuestro bioterio presenta una incidencia de leucemias espontáneas del 15% con un período de latencia promedio de 18 meses. Sólo excepcionalmente un animal desarrolla leucemia antes de los 14 meses de edad.

Las leucemias aparecidas en los ratones inmunizados a repetición con los antígenos convencionales se caracterizaron por una marcada esplenomegalia y nódulos linfáticos agrandados, sin involucrar al timo, salvo en un único caso. Se realizaron pasajes celulares y acelulares de las leucemias en ratones adultos singeneicos. Todos los pasajes celulares indujeron leucemias con una latencia promedio de 15 días. Ninguno de los primeros pasajes acelulares indujo leucemias durante un período de observación de 4 meses.

D I S C U S S I O N

Durante el desarrollo de estos trabajos, se investigó si existía relación física y/o funcional entre las poblaciones celulares T reactivas a antígenos mayores de histocompatibilidad y las poblaciones T reactivas a antígenos convencionales. Se realizaron experimentos tendientes a aclarar este punto y se estudiaron además, algunos de los efectos biológicos de la relación entre ambas poblaciones.

Partiendo de la hipótesis de que ambas poblaciones estuvieran superpuestas, es decir, que las células T con receptores para antígenos mayores de histocompatibilidad extraños poseen además receptores para antígenos convencionales, durante el curso de una inmunización con un antígeno convencional y como consecuencia de la proliferación de los linfocitos reactivos a dicho antígeno, el nivel de alorreactividad T debería sufrir cambios. Los resultados obtenidos cuando se midieron los niveles de alorreactividad mediante reacciones de GVH durante el curso de un esquema de inmunizaciones repetidas con GRCo por vía i.p., parecen apoyar este concepto:

Ratones BALB/c inmunizados con 4; 6 y 8 dosis de GRCo presentaron niveles de alorreactividad esplénica anti-AKR significativamente superiores al nivel normal de la cepa (Tabla 4). Luego de recibir 10 dosis, los animales volvieron a presentar niveles alorreactivos normales. Un comportamiento similar se observó en los niveles de alorreactividad esplénica BALB/c anti-Swiss. Luego de 4 dosis del antígeno convencional, existían niveles alorreactivos significativamente superiores a los normales, mien-

tras que a partir de 6 dosis, los valores volvían a niveles normales (Tabla 5). Las cepas AKR y Swiss difieren de la cepa BALB/c en antígenos mayores y menores de histocompatibilidad. El hecho de que los niveles alorreactivos hacia cada una de estas dos cepas vuelvan a sus niveles normales en diferentes momentos del curso de la inmunización con un mismo antígeno (GRCo), sugieren más la existencia de mecanismos de regulación específicos que la de efectos inespecíficos debidos a la inmunización con el antígeno.

La no detección de modificaciones en el nivel de alorreactividad esplénica durante el curso de la inmunización cuando se realizaron reacciones de injerto contra huésped en cepas que difieren de la BALB/c solamente en antígenos menores de histocompatibilidad sugiere también especificidad. La cepa C57Bl/Ks comparte el mismo H-2<sup>d</sup> con la BALB/c y difiere de ésta, en numerosos antígenos menores de histocompatibilidad. Puesto que la frecuencia de los linfocitos T reactivos a antígenos menores de histocompatibilidad es baja en individuos normales no inmunes a dichos antígenos, podría argumentarse que es debido a esta baja frecuencia que la supuesta acción de efectos inespecíficos no se pone de manifiesto. La cepa DBA/2 comparte también con la cepa BALB/c los antígenos mayores de histocompatibilidad y difiere de ella en algunos antígenos menores. Entre éstos, el codificado por el locus Mls. La diferencia en este locus induce reacciones de GVH positivas en el ensayo local utilizado: el nivel normal BALB/c anti-DBA/2 es de  $0.17 \pm 0.07$ mg

( $p < 0.05$ ) (Tabla 7 ). La existencia de poblaciones T reactivas hacia los antígenos codificados por el locus Mls en los ratones de la cepa BALB/c, población que no necesita, como ocurre con el resto de los antígenos menores, de sensibilización previa para producir reacciones locales de GVH restaría en parte validez a la objeción recientemente planteada.

Tomados estos resultados en conjunto, los datos obtenidos muestran la existencia de por lo menos una relación funcional in vivo entre las poblaciones T reactivas a antígenos mayores de histocompatibilidad y aquellas reactivas al antígeno convencional utilizado. Hasta el momento, los aumentos alorreactivos registrados en estos experimentos podrían atribuirse a:

1. La proliferación de células T reactivas al antígeno convencional y portadoras además, de receptores para los antígenos mayores de histocompatibilidad, expresados por las cepas utilizadas: poblaciones superpuestas.

2. La proliferación de células T alorreactivas, debida a la acción de algún factor o factores producidos directa o indirectamente por las células reactivas a antígenos convencionales. Esto es, que se trate de poblaciones separadas y que, por ejemplo, la proliferación de una de ellas (aquellas reactivas a GRCo) ejerciera una acción proliferativa sobre la otra (célula

las T alorreactivas).

3. La tercera alternativa se refiere a la posibilidad de que hubiera existido una alteración en el tráfico linfoide. Esto es, que la inmunización con glóbulos rojos hubiese producido una mayor afluencia al bazo de linfocitos T reactivos a los antígenos mayores de histocompatibilidad examinados: poblaciones separadas.

Por lo anteriormente explicado, la primera de estas alternativas resulta la más probable; sin embargo, no es posible solamente mediante estos ensayos descartar por completo las otras dos.

La inoculación del suero anti-idiotipo anti-GRCo en los F1(BALB/cxAKR) en los que se desencadenaron reacciones de GVH con esplenocitos BALB/c inmunes a GRCo, produjo una disminución significativa de los valores alorreactivos que se obtienen con los mismos esplenocitos en presencia de suero F1 normal (Tabla 10).

El suero anti-idiotipo utilizado contiene anticuerpos dirigidos contra los idiotipos BALB/c anti-GRCo (Tabla 9). Es capaz de inhibir la hemoaglutinación directa de glóbulos rojos de conejo por anticuerpos BALB/c anti-GRCo pero no inhibe la hemoaglutinación directa de GRCo por suero Swiss anti-GRCo. El receptor del linfocito T de los ratones de la cepa BALB/c dirigido contra los de-

terminantes antigénicos presentados por los glóbulos rojos comparte determinantes idiotípicos con los anticuerpos BALB/c anti-GRCo (27, 28, 30, 50, 70). El suero anti-idiotipo en presencia de complemento poseería la capacidad de lisar células T con receptores anti-GRCo reconociendo los determinantes idiotípicos BALB/c anti-GRCo presentes en el receptor T. En otras palabras, el suero inoculado en los F1 por vía i.v., sería capaz de actuar sobre el receptor anti-GRCo de las células T inmunes a dicho antígeno.

La inoculación de este suero no modificó el nivel de alorreactividad normal BALB/c anti-AKR, ni modificó el de los esplenocitos BALB/c inmunes a AKR. Estos datos indicarían que en dicho suero no existen anticuerpos capaces de reconocer el receptor T anti-AKR, es decir que en el ensayo utilizado no va a lisar células T reactivas a los antígenos de histocompatibilidad presentes en AKR, actuando sobre el receptor T anti-AKR. Se puede descartar también la presencia en el suero de otros factores que alteren la funcionalidad de las células T alorreactivas actuando sobre el receptor anti-CMH de la cepa AKR.

Así, el hecho de que la eliminación de células T portadoras de receptores idiotípicos BALB/c anti-GRCo produzca el efecto de volver a niveles alorreactivos T BALB/c anti-AKR significativamente inferiores a los obtenidos en presencia de suero F1 normal, sugiere fuertemente que el aumento alorreactivo inducido por inmunización con GRCo se debería a la proliferación de células T



portadoras de ambos tipos de receptores: BALB/c anti-GRCo y BALB/c anti-AKR. Se habla aquí desde el punto de vista de la funcionalidad de los receptores, no intentando establecer si se trata de dos receptores sobre la misma célula o de un sólo receptor con actividad doble. Se descartaría así, que los aumentos alorreactivos mostrados en los experimentos anteriores se hubieran debido exclusivamente a alteraciones en el tráfico linfóide de dos poblaciones separadas: Si este hubiera sido el caso y al bazo inmune a GRCo hubiera afluído un mayor número de células T alorreactivas, éstas habrían seguido existiendo una vez eliminada la población reactiva a GRCo y los niveles alorreactivos no habrían descendido significativamente. También resulta difícil aceptar la posibilidad de que el aumento alorreactivo se hubiera debido al efecto/s de poblaciones inmunes a GRCo sobre poblaciones alorreactivas T independientes ya que las células esplénicas se toman para desencadenar las reacciones de injerto contra huésped 10 días después de la última inoculación de GRCo y lo más probable sería que los citados efectos se hubieran producido ya al tomar dichas células. La única alternativa posible consistiría en que el efecto de una población sobre la otra se produjera cuando la reacción de GVH se estuviera desencadenando. Esto es, que las células T alorreactivas se volvieran "sensibles" a la acción de las poblaciones inmunes a GRCo una vez estimuladas por los antígenos expresados en el híbrido F1. Sin embargo, nuevamente el hecho de que no se detectaran alteraciones en los niveles de alorreactividad hacia cepas que comparten el mismo H-2 con la BALB/c hace difícil aceptar esta alternativa ya que

las células T reactivas a antígenos menores de histocompatibilidad -si bien en baja frecuencia en individuos normales no inmunizados con ellos- aumentan mucho su frecuencia una vez en contacto con dichos antígenos menores, esto es, una vez inoculados en el F1 y, en ese caso, no se comprendería por qué los supuestos efectos de una población sobre la otra no afectarían a dichas células.

Por todo lo expuesto, los resultados obtenidos sugieren fuertemente que sería la misma célula T poseedora de receptores idiotípicos anti-glóbulos rojos, la que posee receptores anti-AKR.

Durante el transcurso de nuestro trabajo, otros autores realizaron diferentes experimentos -la mayoría de ellos, in vitro- cuyos resultados confirman los aquí obtenidos (43, 148).

Wilson y colaboradores (106) enriquecieron in vitro una población de linfocitos de rata con reactividad hacia un haplotipo CMH determinado. Esta población poseía -además de la alorreactividad seleccionada- una actividad Th cuantitativamente normal para la colaboración con células B en respuestas primarias a GRC. El autor de estos trabajos (100) concluye que las células T colaboradoras para las respuestas a GRC estarían in-

cluidas en la población T reactiva a antígenos mayores de histocompatibilidad y que entonces estas dos poblaciones se encontrarían superpuestas.

En otros trabajos, se mostró que células citotóxicas efectoras específicas para virus en asociación con antígenos CMH propios, eran capaces también de matar células blanco alogeneicas no infectadas (62). Finberg y colaboradores (81), utilizando células citotóxicas efectoras contra células autólogas infectadas con virus Sendai, mostraron que dichas células inmunes ( $H-2^d$ ) al virus, mataban todas las células alogeneicas examinadas ( $H-2^b$ ;  $H-2^f$ ;  $H-2^k$ ;  $H-2^s$  y  $H-2^r$ ). En cada caso, la citotoxicidad alogeneica representaba sólo una pequeña fracción de la actividad citotóxica total vista frente a las células autólogas infectadas. Los niveles de citotoxicidad no aumentaban cuando las células alogeneicas se encontraban infectadas con el virus. Se ha visto también, que linfocitos generados en el curso de una infección con virus Herpes simplex en ratones de la cepa CBA ( $H-2^k$ ) no sólo eran capaces de lisar células singeneicas infectadas con dicho virus, sino también células no infectadas que expresaban el aloantígeno  $D^d$ . Se observó que mataban con igual eficiencia ambos tipos de células blanco (175). Estos autores interpretan que sus datos serían mejor explicados mediante el modelo de reconocimiento T de la modificación de lo propio, pero aclaran que no es posible descartar el modelo de reconocimiento dual. Sostienen también, que sus datos apoyan la propuesta de Bevan (20, 154) en cuanto a que las células T alorreactivas y

las células T reactivas a antígenos convencionales que muestran restricción H-2, no derivan de diferentes grupos sino que derivarían de un pool de precursores con especificidad para antígenos extraños más antígenos CMH propios, los que poseerían reacción cruzada con moléculas CMH extrañas.

La posibilidad de clonar linfocitos T (93) ha contribuido también a aclarar el punto que nos ocupa; se ha obtenido un clon proveniente de ratones B.10A específico para DNP-OVA. Las células de este clon pueden ser estimuladas para dividirse y propagarse in vitro con células de bazo alo geneicas (provenientes de ratones B10.S) en ausencia de DNP-OVA y células B.10A presentadoras de antígeno. Estudios de reclonado extensivo sugieren fuertemente que un único clon celular T estaría respondiendo a dos estímulos separados: un aloantígeno específico y un antígeno soluble convencional en conjunción con productos del CMH propio (219).

von Boehmer y colaboradores han encontrado que clones de células Tc reactivas al antígeno H-Y en asociación con moléculas CMH propias  $D^b$ , eran capaces de lisar con igual eficiencia células blanco de machos  $D^b$  y células de machos y hembras con especificidad  $D^d$ . No mataban ninguna de las restantes células blanco examinadas.

Un clon derivado de una única célula T debería ser capaz de poseer reactividad -según el modelo de Janeway y colaboradores y según nuestro modelo- hacia el antígeno convencional en asociación con un antígeno CMH propio

y también hacia un particular antígeno CMH extraño.

Binz y colaboradores (26) aislaron un material que contenía receptores T específicos para productos CMH alogeneicos utilizando anticuerpos anti-idiotípicos. Estos receptores se unieron a Sefarosa y se investigó su capacidad para unirse a material CMH marcado. Se encontró que un producto de la región I del CMH no propio se unía al receptor con alta afinidad. La misma columna retardaba el pasaje de moléculas I autólogas -aunque estos antígenos I propios no se unían fuertemente a los receptores- lo cual según estos autores sugiere una baja afinidad del receptor para estas moléculas. Las moléculas I de otras cepas no relacionadas no se unían al receptor sino que pasaban a través de la columna sin sufrir retardos en su pasaje.

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo y los obtenidos por otros autores recientemente (26, 43, 81, 219) sugieren fuertemente que la célula T que reacciona hacia antígenos de tipo convencional -vistos en el contexto de los antígenos CMH propios- poseería también receptores para antígenos CMH alogeneicos. Otros de los hechos que apoyarían nuestra hipótesis resulta la observación clínica de los pacientes que reciben trasplantes de médula ósea. Se ha comprobado que éstos sufren una incidencia menor de reacciones de GVH cuando se los mantiene en ámbitos libres de gérmenes. Las infecciones (antígenos convencionales) suelen agravar las reacciones de GVH (178).

En cuanto a los modelos de reconocimiento T, los resultados apoyan los planteados por Janeway, Benacerraf y Bevan y contradicen algunos aspectos de los sostenidos por Jerne y Williamson. El modelo de Williamson por ejemplo, plantea que las células T alorreactivas poseerían un receptor anti-K, D o I alógenicos codificado por genes no V y receptores específicos anti-CMH extraños (K, D o I), codificados por genes V. Nuestros resultados sugieren que las células T alorreactivas poseerían receptores hacia un antígeno convencional -GRCo-. El modelo planteado por Jerne afirma que las poblaciones T aloreactivas y aquellas reactivas a antígenos convencionales serían poblaciones separadas.

No es posible aún distinguir entre las hipótesis de reconocimiento dual y la del reconocimiento único. Nuestros resultados no contestan dicha pregunta, si bien, el hecho de que el suero anti-idiotipo anti-GRCo no modifique en absoluto la alorreactividad T anti-AKR, favorecería la hipótesis del reconocimiento dual. Sin embargo, es probable que aunque se tratara de un único receptor, la acción de un suero con actividad anti-idiotípica contra un solo antígeno -aunque poseedor de muchos determinantes antigénicos- no permitiría visualizar alteraciones en los niveles alorreactivos.

Hemos enfocado además nuestros trabajos de manera que pudieran visualizarse algunos de los efectos bio-

lógicos de la superposición de las poblaciones T alorreac-  
tivas y las que responden en forma restringida a antígenos  
de tipo convencional:

Desde el punto de vista de la inmunobiología, puede considerarse al feto como un injerto semialogeneico (11, 12), puesto que comparte usualmente la mitad de sus antígenos de histocompatibilidad con la madre (huésped) y difiere de ella en los antígenos de histocompatibilidad paternos. El hecho de que el feto no sea rechazado por la madre constituye entonces, desde este punto de vista, un enigma de la naturaleza que permanece aún sin resolverse. Numerosos autores consideran que en la madre se generan mecanismos inmunorregulatorios que contribuyen al desarrollo de una preñez exitosa. Es poco lo que se sabe aún a ciencia cierta de estos mecanismos. Pero sin duda, éstos deben incluir a las poblaciones T alorreactivas que son las que potencialmente podrían ocasionar mayores daños al feto actuando como células citotóxicas efectoras.

En condiciones especiales, es posible inducir daño en la progeñe en forma experimental. Beer y Billingham (12) obtuvieron daño fetal en ratas inmunizando a la futura madre con linfocitos singeneicos inmunizados contra antígenos de histocompatibilidad de la cepa paterna. En otros casos, el daño se consigue realizando injertos de piel de la cepa paterna a las futuras madres. En estos casos, el daño se produce cuando el pico de inmunidad coincide con la implantación del embrión. Este daño fetal fue

denominado runting o enfermedad secundaria, y se lo define como el daño producido por el pasaje transplacentario de linfocitos T alorreactivos maternos que reconocen los antígenos de histocompatibilidad extraños del feto y desencadenan en él, reacciones de GVH. Se considera también que estas reacciones pueden producirse por pasaje de linfocitos T alorreactivos maternos a través de la leche (8, 24).

En nuestro laboratorio, hemos reproducido el modelo de inducción de runting inoculando a las futuras madres con tumores de origen paterno (152). Hemos podido correlacionar además, mayores incidencias de runting cuanto mayor es la capacidad alorreactiva T esplénica de la madre hacia los antígenos de histocompatibilidad paternos (152, 177). El modelo pudo reproducirse, por otra parte, inoculando a las futuras madres con tumores de origen no paterno (153). Quisimos investigar cuáles eran los efectos de alterar los niveles de alorreactividad T maternos en cuanto a la sobrevivencia de los fetos singeneicos, semialogeneicos con igual H-2 y semialogeneicos con distinto H-2. Así, se inmunizó a las futuras madres con distintas dosis de GRC y se las cruzó con machos de diferentes cepas. La inmunización de hembras de la cepa BALB/c con 4 dosis de GRC, por vía i.p., produjo una incidencia de daño fetal significativamente superior a la de los cruzamientos controles cuando fueron cruzadas con machos de la cepa Swiss (diferente H-2). En estos cruzamientos, la inmunización con 8 y 12 dosis no produjo alteraciones significativas con respecto a los controles.



4

Cuando se pretrataron hembras de las cepas Swiss (cepa de exocría cerrada) y se las cruzó con machos de las cepas Swiss o AKR, se produjeron alteraciones significativas cuando se utilizaron 8 dosis de GRC no detectándose alteraciones de significación con las otras dosis usadas. El pretratamiento de hembras de la cepa BALE/c cruzadas con machos de la cepa DBA/2 (igual H-2), no produjo alteraciones significativas con ninguna de las dosis examinadas. En cuanto a los cruzamientos singeneicos, sólo se detectaron alteraciones cuando se inocularon 12 dosis de GRC. Los resultados obtenidos a lo largo de este experimento muestran que la inmunización de la futura madre con el antígeno convencional utilizado induce alteraciones en el desarrollo de las crías según la dosis utilizada y la cepa paterna. El daño fetal confirma los resultados obtenidos en la primera parte de esta tesis en cuanto a alteraciones en el nivel de alorreactividad inducido por inoculación de otro antígeno convencional (GRCo): No se obtuvo daño fetal con ninguna de las dosis utilizadas cuando el feto comparte con la madre el mismo CMH y difiere de ella, en antígenos menores de histocompatibilidad (cruzamientos BALB/c x DBA/2). Esto correlaciona con los datos que muestran que no existen alteraciones en el nivel de alorreactividad esplénica hacia la cepa DBA/2 cuando se inmuniza con GRCo (Tablas 7 y 8).

Estos resultados muestran que el fenómeno de alteración de los niveles de alorreactividad hacia antígenos mayores de histocompatibilidad no se limita a cambios locales (por ejemplo, esplénicos) sino que se altera la regulación del tráfico de linfocitos T alorreactivos desde la madre al

feto, o sea se alteran mecanismos inmunorregulatorios fisiológicos, en este caso, mecanismos que contribuyen a la eficaz relación materno-fetal. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de trabajo. Debería llamar la atención que, cierto tipo de inmunizaciones en mujeres en algún momento de la gestación, podría ocasionar riesgos.

Otro de los fenómenos biológicos que quisimos estudiar fue investigar si la superposición de las poblaciones que estamos estudiando permitiría poner en marcha mecanismos que aseguren la sobrevivencia fetal. Dichos mecanismos incluirían la posibilidad de que las poblaciones T reactivas a los antígenos de histocompatibilidad paternos expresados en el feto pudieran ser reguladas de tal modo de no dañar al mismo.

Durante algún tiempo el útero fue considerado como un sitio inmunológicamente privilegiado en el sentido de no permitir que el sistema inmune se "enterara" de la presencia del antígeno. Posteriormente, este concepto fue desvirtuado (10, 12). El útero es una vía por la que se pueden desencadenar reacciones inmunes. El pretratamiento de futuras madres con injertos de piel o linfocitos por vía i.u. no sólo produce alteraciones en el peso de los ganglios paraaórticos drenantes del cuerno uterino sino que además, la preñez futura en dicho cuerno uterino se desarrolla mejor que en el cuerno uterino no inmunizado. En estos experimentos se mostró que son los antígenos menores de histocompatibili

dad del injerto (antígenos de tipo convencional a nuestro criterio), los responsables de estos efectos (10). En última instancia, el desarrollo exitoso de una preñez alogéneica dependería de lograr la regulación de las poblaciones T reactivas a los antígenos de histocompatibilidad expresados por el feto.

Si la existencia de superposición entre las poblaciones T estudiadas formara parte de los mecanismos de regulación que permitirían el desarrollo de la preñez normal, el útero sería la vía de inmunización más indicada para que dichos mecanismos se pusieran de manifiesto.

Es sabido que durante el desarrollo de preñeces alogeneicas, luego del 9º día de preñez, el nivel de alorreactividad T de los ganglios paraaórticos se encuentra por debajo de los niveles alorreactivos normales (41). Este descenso de los niveles alorreactivos no está dirigido exclusivamente hacia los antígenos de histocompatibilidad de la cepa paterna, sino que también opera hacia los antígenos de histocompatibilidad presentados por otras cepas no relacionadas. En trabajos realizados en nuestro laboratorio (179, 180) hemos encontrado que los niveles de alorreactividad T de los ganglios paraaórticos y esplénica al 4º día de preñeces alogeneicas se encuentran por encima de los niveles normales. El aumento también resulta significativo en preñeces singeneicas. Al igual que ocurre al 9º día en los ganglios paraaórticos, la modificación de los niveles alorreactivos no está dirigida exclusivamente hacia la cepa paterna.

¿Cuáles son los antígenos que producen estas modificaciones de los niveles alorreactivos en el transcurso de preñeces normales?. Puesto que al 4º día de preñez el feto no expresaría aún antígenos mayores de histocompatibilidad y teniendo en cuenta que la modificación también se detecta en cruzamientos singeneicos, queda descartada la posibilidad de que sean dichos antígenos CMH los que desencadenan el aumento alorreactivo. Pero la madre sí se encuentra confrontada con diferentes antígenos fetales (entre los que también se encontrarían algunos antígenos menores de histocompatibilidad en el caso de cruzamientos alogeneicos) (8, 10, 11, 12). Si existe una relación entre las poblaciones T reactivas a los antígenos CMH y las reactivas a antígenos de tipo convencional, como sugieren los datos obtenidos hasta el momento, resulta lógico pensar que estas alteraciones no ocurren en forma caprichosa sino que encierran un sentido biológico. El hecho de que los niveles de alorreactividad se encuentren por encima de los valores normales al 4º día de preñez, no implicaría peligro para la sobrevivencia del feto, ya que éste no expresa en ese momento sus antígenos CMH y en consecuencia, no se ofrece como blanco para el ataque citotóxico. Sin embargo, resulta probable que sea este aumento temprano el que permita poner en marcha mecanismos inmunorregulatorios que operen "controlando" la actividad de estas poblaciones alorreactivas de modo que se logre la regulación adecuada para ese momento en que el feto exprese sus antígenos CMH. En experimentos realizados en nuestro laboratorio (177) hemos encontrado que el bazo y el timo de ratones híbridos F1 recién nacidos contienen células

capaces de inhibir las reacciones de GVH de linfocitos de origen materno contra los antígenos de histocompatibilidad expresados por la cepa paterna, mientras que eran incapaces de alterar las reacciones de GVH de linfocitos paternos hacia antígenos de la cepa materna. Es decir, existirían células que regulan la alorreactividad T de la madre hacia los antígenos de histocompatibilidad paternos. Res\_ taría determinar si dichas células son de origen materno o fetal. ]

Quisimos investigar si la presencia de un antíge\_ no convencional (GRC) en el útero de hembras en estado de pseudopreñez era capaz de inducir alteraciones en los nive\_ les alorreactivos del bazo y ganglios paraaórticos, inten\_ tando reproducir el efecto que normalmente causaría la pre\_ sencia de antígenos fetales durante la preñez normal.

En primer lugar, se vio que la inmunización con GRC en uno de los cuernos uterinos inducía aumentos en el peso de los g.p.a. drenantes del cuerno uterino inoculado. Cuando el antígeno convencional era inoculado en presencia de concentraciones sanguíneas de progesterona similares a las existentes al cuarto día de preñez (8), el aumento re\_ gistrado en el peso de los g.p.a. drenantes fue evidente\_ mente superior (Tabla 16).

Consideremos ahora los niveles de alorreactividad que presentaban esos mismos ganglios:

Los animales pretratados con progesterona en au-

sencia de estimulación antigénica presentaron niveles alorreactivos inferiores a los normales. Estos datos concuerdan con los hallados por otros investigadores en diferentes modelos experimentales, en cuanto a que la progesterona es capaz de disminuir -según la dosis usada- respuestas alorreactivas (8, 10). Resulta sumamente interesante que la misma hormona, a la misma concentración, en presencia de un antígeno convencional produzca efectos opuestos, o sea, induzca niveles alorreactivos superiores a los normales. Estos aumentos alorreactivos se registraron tanto frente a la cepa Swiss como frente a la AKR (Tablas 17 y 18 ). La inoculación del antígeno convencional en ausencia de progesterona no indujo cambios alorreactivos significativos con respecto a los controles normales. Al mismo tiempo, se estudiaron los niveles alorreactivos esplénicos frente a las cepas Swiss y AKR. Dichos niveles no se alteraron en ninguno de los grupos estudiados (Tablas 19 y 20).

Los datos obtenidos muestran que la inmunización con un antígeno convencional en presencia de concentraciones de progesterona similares a las existentes al cuarto día de preñez induce los mismos efectos que los observados en ese día tanto en preñeces alogeneicas como singeneicas: aumentos en el peso de los ganglios paraaórticos (10) y aumentos en los niveles de alorreactividad T (179, 180). Los niveles alorreactivos esplénicos no se vieron alterados, lo cual podría explicarse por la diferencia importante que existe cualitativa y cuantitativamente entre los antígenos de un feto en crecimiento y el inóculo de antígeno convencional utilizado en estos experimentos.

Los resultados obtenidos apoyarían la hipótesis de que la presencia de antígenos de tipo convencional en el útero de hembras preñadas -antígenos fetales convencionales- cumpliría un papel importante en la puesta en marcha de mecanismos inmunorregulatorios tempranos que permitirían el control de las células T alorreactivas maternas. Resulta nuevamente difícil aceptar que este tipo de interacciones se deba a efectos inespecíficos. Los mecanismos inmunorregulatorios que se pongan en marcha para permitir el desarrollo fetal deben sin duda, estar perfectamente establecidos, ya que del éxito de los mismos, depende la supervivencia de las numerosas poblaciones de mamíferos existentes.

Habíamos encontrado hasta el momento, que la inmunización con un antígeno convencional producía aumentos en los niveles T alorreactivos y que los aumentos registrados tendían a regularse: Cuando la inmunización se realizaba por vía i.p., a partir de ciertas dosis, los niveles alorreactivos volvían a ser normales; en los experimentos en los que se inmunizó a futuras madres y se observaba daño fetal, también a partir de determinadas dosis del antígeno convencional no se observaba daño fetal significativo (salvo en preñeces singeneicas en las que sólo se detectó daño fetal con la dosis más alta). Los aumentos alorreactivos detectados en los ganglios paraaórticos al cuarto día de preñeces alogeneicas y singeneicas, se transforman hacia el día 9-11 en niveles inferiores a los normales. En to-

dos estos casos se observó entonces, que tras un aumento en los niveles de alorreactividad se sucedía un descenso de los mismos, lo que nos sugirió la existencia de mecanismos inmunorregulatorios. Quisimos investigar uno de los mecanismos de regulación posibles: la presencia de anticuerpos antiidiotípicos anti-aloantígenos de histocompatibilidad. Para esto se realizaron los ensayos de hemoaglutinación indirecta enfrentando el suero de los animales que habían sido inmunizados a repetición con el antígeno convencional (GRCo) con IgG BALB/c anti-AKR, tratando de detectar anticuerpos anti-idiotípicos BALB/c anti-AKR. Como controles se utilizaron IgG C57Bl/6J anti-AKR e IgG BALB/c normal. Los animales presentaron en su suero factores que daban reacción positiva frente a IgG BALB/c normal, lo que sugiere la presencia de anticuerpos dirigidos contra antígenos expresados por inmunoglobulinas normales propias o sea, reacciones autoinmunes. Fue debido a la existencia de estas reacciones positivas que no pudimos confirmar la presencia de anticuerpos anti-idiotípicos BALB/c anti-AKR en el suero de estos ratones. Sin embargo, en todos los experimentos realizados, el título de anticuerpos obtenido frente a IgG BALB/c anti-AKR fue superior al obtenido frente a IgG BALB/c normal e incluso se registró positividad en dos experimentos en los que no se registraba positividad frente a IgG BALB/c normal. Sin embargo, y a pesar de haberse utilizado en los tres grupos la misma cantidad de IgG total en la incubación con los GRC, deberían haberse realizado otros experimentos -reacciones de inmunofluorescencia por ejemplo- de modo de registrar si la IgG estaba distribuída uniformemente sobre



el soporte (GRC) en cada uno de los grupos. Sólo así podríamos confirmar la presencia de anticuerpos anti-idiotípicos BALB/c anti-AKR en el suero, en base a las diferencias de títulos registradas (Tabla 21).

Estos experimentos indicaban la presencia de reacciones autoinmunes en ratones sometidos a una estimulación reiterada con un antígeno convencional.

Habíamos obtenido ya otros resultados que sugerían también la existencia de fenómenos autoinmunes: Las hembras BALB/c inmunizadas con 12 dosis de otro antígeno convencional (GRC) habían mostrado una incidencia de daño fetal significativamente superior a la normal para la cepa (Tabla 11) cuando eran apareadas con machos singeneicos. La inoculación de dosis menores del antígeno no había producido alteración alguna en la sobrevivencia de las crías.

Para confirmar la presencia de reacciones autoinmunes se realizaron los ensayos de GVH en ratones singeneicos: El hecho de que los esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con 12 dosis de GRC indujeran reacciones positivas de GVH en ratones singeneicos adultos y recién nacidos (Tablas 22 y 23) mientras que aquellos inmunizados con una dosis menor no lo hicieran confirmaría la existencia de reacciones autoinmunes. En los dos últimos experimentos parecerían estar involucradas células T.

La asociación entre inmunizaciones crónicas y desórdenes autoinmunes ha sido ya descripta por otros autores

(7, 116). Si bien aún no se conocen los mecanismos que relacionan estos dos fenómenos, se plantea que existirían desbalances regulatorios principalmente a nivel de linfocitos T. Otros autores han correlacionado reacciones crónicas de GVH con patologías autoinmunes (2, 68). Las reacciones autoinmunes encontradas en este trabajo, incluyen reacciones que parecerían poder atribuirse a células T autólogas que estarían remediando reacciones crónicas de GVH: la inducción de daño fetal en los cruzamientos singeneicos, por inoculación de 12 dosis de GRC, con signos similares al daño fetal provocado por linfocitos T alorreactivos; la inducción de reacciones de GVH locales positivas en ratones adultos singeneicos y la de reacciones de GVH sistémicas en ratones singeneicos recién nacidos con signos también similares a la inducción de runting por linfocitos T alorreactivos apoyan la idea de que los animales inoculados a repetición con antígenos convencionales estarían sufriendo reacciones similares a reacciones de GVH crónicas.

Si bien no pretendemos en este trabajo, ofrecer una explicación precisa de los mecanismos que pudieran actuar para desencadenar los fenómenos autoinmunes hallados, quisiéramos realizar algunas observaciones que podrían aportar datos para la futura comprensión del problema.

Considerando que las células T alorreactivas poseerían receptores para antígenos convencionales, la inmunización con dichos antígenos induciría -como lo hemos mostrado- aumentos en los niveles de alorreactividad. Entre los mecanismos de regulación de la respuesta hacia el antí

geno convencional podría incluirse la aparición de anticuerpos anti-idiotípicos dirigidos contra el receptor para dicho antígeno y la presencia de linfocitos T supresores (con actividad anti-idiotípica o no), dirigidos contra el mismo receptor. Es posible plantearse además, la acción de anticuerpos anti-idiotípicos dirigidos contra los receptores anti-CMH extraños y la de células T dirigidas también contra estos receptores.

Si, como plantean algunos autores, el receptor anti-CMH propio es el mismo que reacciona contra los antígenos CMH extraños, no resultaría improbable que la existencia de desequilibrios en la regulación de los niveles alorreactivos (producidos, tal vez, cuando la estimulación antigénica continúa inexorablemente) implique desequilibrios en la regulación del reconocimiento de los antígenos CMH propios. El factor común más constante que se ha encontrado en las patologías autoinmunes experimentales y humanas es justamente una alteración en el reconocimiento de los antígenos CMH propios (226, 243, 244). La aparición de desórdenes autoinmunes en animales inmunizados a repetición con un antígeno convencional podría explicarse así por alteraciones en la regulación de los niveles T alorreactivos, lo que implicaría desórdenes en la regulación del reconocimiento de los antígenos CMH propios.

Los animales que habían sido sometidos a estimulación antigénica reiterada con los antígenos convencionales fueron mantenidos en observación. La mayoría de ellos presentaban signos típicos de enfermedad alogeneica crónica (GVH): Al finalizar el período de observación, se detectó en estos animales un aumento significativo en la incidencia de leucemias (Tabla 24 ). La inmunización a repetición con los dos antígenos convencionales utilizado nó entonces con aumentos en la incidencia de neoplasias del sistema inmune. Las leucemias aparecieron con una latencia mucho menor que la habitual para la cepa y se caracterizaron por una gran esplenomegalia.

Hace ya mucho tiempo que la inmunización antigénica crónica -en presencia o no de inmunosupresión- ha sido considerada como desencadenante de linfomas y leucemias (107, 143, 144). Numerosos trabajos clínicos afirman que la incidencia de linfomas se encuentra significativamente aumentada en pacientes que han recibido trasplantes alogeneicos y atribuyen este hecho, a la estimulación antigénica crónica debida a los antígenos extraños para el huésped, presentes en el trasplante.

Recientemente se ha publicado un trabajo (231) en el que la inmunización crónica con GRC inducía la aparición de leucemias. En ese trabajo se sometía a una inmunización pasiva a ratones de la cepa BALB/c recién nacidos, con células de ratones singeneicos adultos inmunizados a repetición con el antígeno convencional. Los ratones recién nacidos desarrollaban leucemias con una laten-

cia de 4 a 16 meses, y el aumento en relación a la incidencia normal de la cepa era de aproximadamente del 2%. Cuando se inoculaban los ratones adultos con el antígeno convencional, en algunas ocasiones se detectó en ellos, un aumento significativo de la incidencia de leucemias; en otras, no se observaron modificaciones en la incidencia de estas neoplasias.

Otros autores han conseguido la inducción experimental de aumentos en la incidencia de linfomas y leucemias por inoculación de otros antígenos a repetición en determinadas condiciones experimentales (143, 144).

Incluso se ha sugerido recientemente que la gran incidencia de leucemias espontáneas que presentan algunas cepas de ratones -la AKR por ejemplo- no se debería a la acción directamente transformante de los virus de leucemia murina, sino a la estimulación crónica que la presencia de estos virus implica para los linfocitos T (107).

La asociación de reacciones autoinmunes y leucemia ha sido registrada en algunos trabajos (55, 117).

Las reacciones crónicas de GVH han sido también consideradas como factor desencadenante en este tipo de neoplasias (55). En estos trabajos las leucemias se caracterizan por una gran esplenomegalia y el timo no suele estar involucrado. Las leucemias espontáneas aparecidas en nuestro trabajo poseen estas mismas características.

De modo que diferentes autores han observado independientemente las siguientes asociaciones:

1. Estimulación antigénica crónica y leucemias (143, 144, 231).
2. Estimulación antigénica crónica y autoinmunidad (7,116).
3. Reacciones crónicas de GVH y leucemias (4, 55, 87, 117).
4. Reacciones de GVH y autoinmunidad (2, 68, 139, 198).
5. Autoinmunidad y leucemias (55, 117).

En uno de estos trabajos (55) se relacionan las reacciones de GVH a reacciones autoinmunes y a linfomas.

Resulta entonces de gran interés señalar que todos estos factores que han sido propuestos por separado como inductores de neoplasias linfoides parecerían tener relación entre sí y han sido encontrados en forma secuencial a lo largo de nuestro trabajo: La estimulación antigénica a repetición indujo aumentos en los niveles T alorreactivos. Los experimentos realizados sugieren que dichos aumentos alorreactivos T se deberían a la presencia de receptores para antígenos convencionales en las poblaciones T alorreactivas. Al continuar la estimulación con el antígeno convencional se detectaron reacciones autoinmunes que parecerían incluir reacciones autólogas que semejan reacciones crónicas de GVH. Finalmente, se registró una incidencia de neoplasias significativamente superior a la normal para la cepa.

R E S U M E N

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo permiten realizar las siguientes observaciones:

1. La inmunización in vivo por vía i.p. con un antígeno convencional, glóbulos rojos de conejo (GRCo) indujo cambios en los niveles alorreactivos T esplénicos. El cambio en los niveles alorreactivos fue dependiente de la dosis y del CMH extraño hacia el que se midió la alorreactividad. Los aumentos de alorreactividad T registrados operarían sólo hacia antígenos mayores de histocompatibilidad. No se registraron modificaciones de los niveles T hacia ninguno de los numerosos antígenos menores de histocompatibilidad examinados.

2. La inmunización in vivo con otro antígeno convencional, glóbulos rojos de carnero (GRC) por vía i.p. fue capaz de inducir también cambios en los niveles de alorreactividad T medidos como desequilibrios en el pasaje transplacentario de estos linfocitos T alorreactivos de la madre al feto. También en este caso los desequilibrios alorreactivos T fueron dependientes de la dosis para cada uno de los H-2 extraños examinados. En estos experimentos -al igual que en los anteriores- no se registraron modificaciones en los niveles de respuesta T hacia los antígenos menores de histocompatibilidad examinados.

3. El útero, en condiciones de pseudopreñez, resultaría un lugar privilegiado para el desencadenamiento de desniveles alorreactivos T inducidos por inmunización con un antígeno convencional. Este mecanismo de interacción entre la inmunización con antígenos convencionales y la modificación de



los niveles alorreactivos T produciría un efecto similar al que ocurre naturalmente en los primeros días de preñeces singeneicas y alogeneicas, cuando la madre se ve confrontada por vía uterina con antígenos fetales de tipo convencional y modifica también sus niveles de alorreactividad T hacia diferentes antígenos CMH extraños. Este mecanismo podría jugar un papel importante en la regulación de la respuesta inmune durante la relación materno-fetal.

4. Los desniveles -aumentos en nuestro caso- alorreactivos T registrados por inmunización con el antígeno convencional tendieron a regularse, volviéndose a los niveles alorreactivos normales.

5. Cuando la inmunización con un antígeno convencional indujo aumentos en los niveles T alorreactivos, dichos aumentos pudieron reducirse en forma significativa por pre-tratamiento de las células con un suero con actividad anti-idiotípica anti- dicho antígeno convencional.

6. La inmunización con antígenos convencionales indujo (como ya hemos señalado) aumentos en los niveles de alorreactividad T. Al continuar la inmunización-haciéndose casi crónica -se registraron desórdenes autoinmunes. Los desórdenes autoinmunes incluyeron reactividad hacia IgG autóloga normal y reacciones T hacia antígenos de histocompatibilidad propios.

7. La inmunización crónica con los dos antígenos convencionales utilizados indujo aumentos significativos en la incil

dencia de leucemias espontáneas.

El conjunto de los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo muestra una relación funcional entre las células T reactivas a antígenos convencionales vistos en el contexto de los antígenos mayores de histocompatibilidad propios y las células T que reaccionan hacia antígenos CMH extraños. Dicha relación funcional sería consecuencia de una relación física entre ambos tipos de células T: los experimentos realizados con suero con actividad anti-idiotípica contra el antígeno convencional sugieren fuertemente que la célula T que reacciona hacia antígenos convencionales, poseería también receptores dirigidos contra antígenos CMH extraños. La superposición existente entre ambas poblaciones podría jugar un rol importante en los mecanismos que operan en la regulación del sistema inmune.



1  
DR. CHRISTIANE DOSNE PASQUALINI  
DIRECCIÓN LEUCEMIA EXPERIMENTAL



N. Isabel Pizarro

B I B L I O G R A F I A

1. Abuaf N, Halle-Panneko O, Mathé G: Graft vs host reaction. Influence of genetic background in donor recipient pairs incompatible for major histocompatibility complex (MHC). *Transplantation* 24: 74, 1977.
2. Allison A: Autoimmunity and tolerance. In *Biological Basis of Immunity*. (eds) EW Gelfand, HM Bosch. Raven Press, New York, 1980, pp 241-250.
3. Andersson R, Binz H, Frischknecht H, Jonsson B, Shen FW, Wigzell H: Specific auto-immunity during the immune response: Idiotypes and antigen-binding specificity of antibodies and T cell receptors. In *T and B Lymphocytes: Recognition and Function*. ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. Bach FH, Bonavida B, Vitetta ES, Fox CF (eds), vol XVI, 1979, p 447.
4. Armstrong MYK, Gleichmann H, Beldotti L, André-Schwartz J, Schwartz RS: Chronic allogeneic disease. II Development of lymphomas. *J Exp Med* 132: 417, 1970.
5. Asofsky RA, Cantor H, Tigelaar RE: Cell interactions in the GVH response. In *Progress in Immunology*. B Amos (ed). Academic Press, New York, 1971, p 369.
6. Atkins RC, Ford WL: Early cellular events in a systemic graft versus host reaction. In *The migration of responding and non-responding donor lymphocytes*. *J Exp Med* 141: 664, 1975.
7. Ballou M, Mc Lean RH, Domjanov I, Lowenstein MB: Immunologic reconstitution, autoimmunity, and T-cell immune deficiencies. *Cell Immunol* 45: 364, 1979.
8. Beer AE: Comunicación personal.
9. Beer AE, Billingham RE: Immunoregulatory aspects of pregnancy. *Federation Proc* 37: 2374, 1978.
10. Beer AE, Billingham RE: Maternal immunological recognition mechanisms during pregnancy. In *Maternal Recognition Mechanisms*. CIBA Foundation Symposium, vol 64: 293, 1979.
11. Beer AE, Billingham RE: *The immunobiology of mammalian reproduction*. by Prentice-Hall Inc, Englewood Cliffs, New Jersey, 1976.
12. Beer AE, Billingham RE: The Embryo as a transplant. *Scientific American*, vol 230 n°4, p 36, april 1974.

13. Bellgrau D, Wilson DB: Immunological studies of T-cell receptors. I. Specifically Induced resistance to Graft-versus-host disease in rats mediated by host T-cell immunity to alloreactive parental T cells. *J Exp Med* 148: 103, 1978.
14. Bellgrau D, Wilson DB: Immunological studies of T-cell receptors. II. Limited Polymorphism of idiotypic determinants on T-cell receptors specific for major histocompatibility complex alloantigens. *J Exp Med* Vol 149: 234, 1979.
15. Benacerraf B: Role of MHC Gene Products in Immune Regulation. *Science* 212: 1229, 1981.
16. Benacerraf B: Genetic control of the specificity of T lymphocytes and their regulatory products. *Progress in Immunology IV Fourth International Congress of Immunology*. M Fougereau, J Dausset (eds), 1980, p 419.
17. Benacerraf B, Germain RN: The Immune Response genes of the major histocompatibility complex. *Immunological Rev* 38: 70, 1978.
18. Benacerraf B, Unanue EL: *Textbook of Immunology*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1979.
19. Bernuau C, Gisselbrecht A, Devergie G, Feldmann E, Gluckman M, Marty J, Boiron M: Histological and ultrastructural appearance of liver during graft-versus-host disease complicating bone-marrow transplantation. *Transplantation* 29: 236, 1980.
20. Bevan MJ: Killer cells reactive to altered-self antigens can also be alloreactive. *Proc Natl Acad Sci* 74: 2094, 1977.
21. Bevan MJ, Langman RE, Cohn M: H-2 antigen-specific cytotoxic T cells induced by concanavalin A: estimation of their relative frequency. *Eur J Immunol* 6: 150, 1976.
22. Biddison WE, Shaw S: Virus specificity of human influenza virus immune cytotoxic T cells. *J Immunol* 122: 660, 1979.
23. Biddison WE, Payne SM, Shearer GM, Shaw S: Human cytotoxic T-cell responses to trinitrophenyl hapten and Influenza virus. Diversity of Restriction antigens and specificity of HLA-linked genetic regulation. *Proceedings of a Conference on Genetic Control of the human immune response*. *J Exp Med*, 1980, p 204s.

24. Billingham RE: The fetoplacental allograft. *Cellular Immunology* 62: 271, 1981.
25. Billingham R, Silvers W: *The Immunobiology of transplantation*. Osler A, Weiss L (eds). Prentice-Hall Inc, Englewood Cliffs, New Jersey, 1971.
26. Binz H, Frischknecht H, Mercolli CC, Dunst S, Wigzell H: Binding of purified, soluble major histocompatibility complex polypeptide chains onto isolated T cell receptors. I. Reactivity against allo and self-determinants. *J Exp Med* 150: 1084, 1979.
27. Binz H, Lindenmann J, Wigzell H: Inhibition of local graft-versus-host reaction by anti-alloantibodies. *Nature* 246: 146, 1973.
28. Binz H, Wigzell H: Specific transplantation tolerance induced by autoimmunization against the individual's own, naturally occurring idiotypic, antigen-binding receptors. *J Exp Med* 144: 1438, 1976.
29. Binz H, Wigzell H: Shared idiotypic determinants on B and T lymphocytes reactive against the same antigenic determinants. I. Demonstration of similar or identical idiotypes on IgG molecules and T-cell receptors with specificity for the same alloantigens. *J Exp Med* 142: 197, 1975.
30. Binz H, Wigzell H: Shared idiotypic determinants on B and T lymphocytes reactive against the same antigenic determinants. III. Physical fractionation of specific immunocompetent T lymphocytes by affinity chromatography using anti-idiotypic antibodies. *J Exp Med* 142: 1231, 1975.
31. Binz H, Wigzell H: Induction of specific transplantation tolerance in adult animals. *Transplantation Proc (VolXI)* 1:914, 1979.
32. Binz H, Wigzell H: Horror autotoxicus? *Fed Proc* 37: 2365, 1978.
33. Bitter-Suermann D, Krönke M, Brade V, Hadding U: Inherited polymorphism of Guinea pig factor B and C4: evidence for genetic linkage between the C4 and Bf loci. *J Immunol* 118: 1822, 1977.
34. Blaese RM, Martínez C, Good RA: Immunologic incompetence of immunologically runted animals. *J Exp Med* 119: 211, 1964.
35. Blanden RV, Doherty PC, Dunlop MBC, Gardner ID, Zinkernagel RM, David CS: Genes required for cytotoxicity against virus infected target cells in K and D regions of H-2 complex. *Nature* 254: 269, 1975.

36. Blankenhorn EP, Cecka JM, Goetze D, Hood L: Partial N-terminal aminoacid sequence of rat transplantation antigens. *Nature* 274: 90, 1978.
37. Bona C: V-Region Markers on Surface of T Cells. In Lymphocytic Regulation by Antibodies. Bona C, Casenave PA (eds). A Winey-Interscience publication, John Wiley and Sons, 1981, p 187.
38. Bona C: Idiotype suppression in adults. In Lymphocytic Regulation by Antibodies. Bona C, Casenave PA (eds). A Winey-Interscience publication, John Wiley and Sons, 1981, p 219.
39. Bona C, Nisonoff A: (workshop conveners): Network of Regulation. In Lymphocytic Regulation by Antibodies. Bona C, Casenave PA (eds). A Winey-Interscience publication, John Wiley and Sons, 1981, p 443.
40. Bona C, Paul WE: Cellular basis of the regulation of production of anti-TNP antibodies carrying MOPC 460 idiotype. In Lymphocytic Regulation by Antibodies. Bona C, Casenave PA (eds). A Winey-Interscience publication, John Wiley and Sons, 1981, 433.
41. Bonaparte YP, Colombo LL, Slobodanka K, Oisgold-Daga S, Kaplan-Ikonicoff L: Disminución de la respuesta inmune en la preñez temprana, medida por la reacción de injerto contra huésped regional. *Medicina (Bs Aires)* 40: 789, 1980.
42. Borysenko M: Evolution of lymphocytes and Vertebrate Alloimmune Reactivity. *Transplantation Proc*, Vol XI(Nº1):1123, 1979.
43. Burakoff SJ, Ratnofsky SE, Benacerraf B: Mouse cytolytic T lymphocytes induced by xenogeneic rat stimulator cells exhibit specificity for H-2 complex alloantigens. *Proc Natl Acad Sci*, 74: 4572, 1977.
44. Calkins CE, Stutman O: Changes in suppressor mechanisms during postnatal development in mice. *J Exp Med* 147: 87, 1978.
45. Cantor H: The effects of anti-theta serum upon graft vs. host activity of spleen and lymph node cells. *Cell Immunol* 3: 461, 1972.
46. Casenave PA: Idiotype of antibodies. In Lymphocytic Regulation by Antibodies. Bona C, Casenave PA (eds). A Winey-Interscience publication. John Wiley and Sons, 1981, p 171.
47. Cohn M, Langman R, Geckeler W: Diversity 1980. *Progress in Immunology IV, Fourth International Congress of Immunology*, Fougereau M, Dausset J (eds), 1980, 153.

48. Cook RG, Vitetta ES, Siegelman MH, Urh JW, Capara JD: Structural analysis of the I-A and I-E/C alloantigens. In T and B lymphocytes: Recognition and function. ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. Bach FH, Bonavida B, Vitetta ES, Fox CF (eds), 1979, p 37.
49. Cosenza H, Köhler H: Specific suppression of the antibody response by antibodies to receptors. Proc Natl Acad Sci 69: 2701, 1972a.
50. Cosenza H, Julius MH, Augustin AA: Idiotypes as variable regions markers: analogies between receptors on phosphorylcholine -specific T and B lymphocytes. Immunology Rev 34: 3, 1977.
51. Cosenza H: Comunicación personal.
52. Charron DJ, Engleman EG, Benike CJ, McDevitt HD: Ia antigens on alloreactive T cells in man detected by monoclonal antibodies. Evidence for synthesis of HLA-D/DR molecules of the responder type. Proceedings of a Conference on Genetic Control of the Human Immune Response. J Exp Med 152: 1275, 1980.
53. Charron DJ, McDevitt HO: Characterization of HLA-D region antigens by two dimensional gel electrophoresis. Molecular genotyping. Proceedings of a Conference on Genetic Control of the Human Immune Response. J Exp Med, 152:18s, 1980.
54. Cheever MA, Eisntein AB, Kempf RA, Fefer A: Reduction of fatal graft vs host disease by H3 Thymidine suicide of donor cells cultured with host cells. Transplantation 23: 299, 1977.
55. Datta SK, Schwartz RS: Autoimmunization and Graft versus host reactions. Transplantation Rev 31: 44, 1976.
56. Dausset J: The Major Histocompatibility Complex in Man. Science 213: 1469, 1981.
57. Dausset J, Contu L: The MHC and Immune response in Man. Progress in Immunology IV, Fourth International Congress of Immunology, Fouge-reau M, Dausset J (eds), 1980, p 513.
58. Dicke KA, Lotzova E, Spitzer G, McCredie KB: Immunobiology of Bone Marrow transplantation. Seminars in Hematology 15: 263, 1978.
59. Dicke KA, Lotzova E, Spitzer G, McCredie KB: Immunobiology of bone marrow transplantation. Sem Hematol 15: 263, 1978.



60. Dickmeiss E, Soeberg B, Svejgaard A: Human cell-mediated cytotoxicity against modified target cells is restricted by HLA. *Nature* 270: 8 Decemb 1977.
61. Doherty PC: Surveillance of self: CMI to virally modified cell surface defined operationally by the MHC. *Progress in Immunology IV, Fourth International Congress of Immunology, Fougereau M, Dausset J (eds), 1980, p 564.*
62. Doherty PC, Bennink JR: Vaccinia-specific cytotoxic T cell responses in the context of H-2 antigens not encountered in thymus may reflect aberrant recognition of a virus-H-2 complex. *J Exp Med* 149: 150, 1979.
63. Doherty PC, Zinkernagel RM: H-2 compatibility is required for T cell mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Immunol* 112: 1548, 1974.
64. Doherty PC, Zinkernagel RM: A biological role for the major histocompatibility antigens. *Lancet* 28: 1406, 1975.
65. Dunn TC, Gruneberg H, Snell GD: Report of Committee on Mouse Genetics nomenclature. *J Heredity* 31: 505, 1940.
66. Dupont B, Good RA (eds): *Immunobiology of bone marrow transplantation. A Transplantation Proceedings Reprint.* Grune and Stratton, New York, 1976.
67. Dupont B, Hansen JA, Yunis EJ: Human mixed-lymphocyte culture reaction: genetics specificity and biological implications. *Adv Immunol* 23:107, 1976.
68. Editorial: Graft-versus-host Reactions and Autoimmune disease. *Lancet* 1: 480, 1978.
69. Eichmann K, Rajewsky K: Induction of T and B cell immunity by anti-idiotypic antibody. *Europ J Immunol* 5: 661, 1975.
70. Eichmann K: Expression and function of idiotypes on lymphocytes. *Adv Immunol* 26: 195, 1978.
71. Eichmann K: Idiotypic suppression. I. Influence of the dose and of the effector functions of anti-idiotypic antibody on the production of an idio~~type~~. *Europ J Immunol* 4: 302, 1974.
72. Eichmann K: Idiotypic suppression. II. Amplification of a suppressor T cell with anti-idiotypic activity. *Europ J Immunol* 5: 511, 1975.

73. Elfenbein G, Green I, Paul WE: The allogeneic effect: increased cellular immune and inflammatory responses. *J Immunol* 112: 2166, 1974.
74. Elkins WL: Effector mechanisms and Graft-versus-host disease. *Transplantation Proceedings* 1: 15, 1978.
75. Elkins WL: Correlation of Graft-versus-host mortality and positive CML assay in the mouse. *Transplantation Proceedings* 3: 343, 1976.
76. Elkins WL: Cellular immunology and the pathogenesis of Graft-versus-host reactions. *Progress in Allergy* 15: 78, 1971.
77. Elkins WL, Guttman RD: Pathogenesis of a local Graft vs host reaction: Immunogenicity of circulating host leukocytes. *Science* 159: 1250, 1976.
78. Erb P, Feldmann M, Hogg N: Role of macrophages in the generation of T helper cells. IV. Nature of genetically related factor derived from macrophages incubated with soluble antigen. *Europ J Immunol* 6: 365, 1976.
79. Festenstein H. The Mls system. A *Transplantation Proceedings* Reprint. *Immunobiology of Bone-Marrow transplantation*. Dupont B, Good RA (eds), Grune and Stratton, New York, 1976, p 13.
80. Flaherty L: H-2 complex, Tla region, and other genes of the 17th chromosome. In *Biological Basis of Immunodeficiency*. Gelfand EW, Dosch HM (eds). Raven Press, New York, 1980, p 99.
81. Finberg R, Burakoff SJ, Cantor H, Benacerraf B: Biological significance of alloreactivity: T cells stimulated by Sendai virus-coated syngeneic cells specifically lyse allogeneic target cells. *Proc Natl Acad Sci* 75: 5145, 1978.
82. Ford WL, Burr W, Simonsen MM: A lymph node weight assay for the graft-versus-host activity of rat lymphoid cells. *Transplantation* 10: 258, 1970.
83. Ford WL, Simmonds SJ, Atkins RC: Early cellular events in a systemic graft versus host reaction. II. Autoradiographic estimates of the frequency of donor lymphocytes which respond to each Ag-B determined antigenic complex. *J Exp Med* 141: 681, 1975.

84. Germain RN, Ju ST, Kipps TJ, Benacerraf B, Dorf ME: Shared idiotypic determinants on antibodies and T cell derived suppressor factor specific for the random terpolymer L-glutamic acid-L alanine-L-tyrosine. *J Exp Med* 149: 613, 1979.
85. Gershon RK: Suppressor T cells: A miniposition paper celebrating a new decade. *Progress in Immunology IV, Fourth International Congress of Immunology*, 1980, p 375.
86. Gershon RK: A disquisition on suppressor T cells. *Transpl Rev* 26: 170, 1975.
87. Gleichmann E, Gleichmann H, Schwartz RS: Immunologic induction of malignant lymphoma: Genetics factors in the Graft-versus-host model. *J Natl Cancer Inst* 49: 793, 1972.
88. Golub ES: *The Cellular Basis of the Immuneresponse. An approach to Immunobiology.* Sinauer Associates, Sunderland, Massachussets, 1977.
89. Gordon RD, Simpson E: H-2 restricted T cell cytotoxic responses to H-Y antigen. *In* Eijsvogel, Roos VP, Zeylemaker WP (eds). *Proceedings of the Tenth Leukocyte Culture Conference.* Acad Press, New York, 1976, p 521.
90. Gottesman SRS, Stutman O: Cellular Immunity during Pregnancy. II. Response to T and B cell mitogens. *American Journal of Reproductive Immunology* 1: 78, 1981.
91. Goulmy E, Blokland ELS, van Rood J, Charmot D, Malissen B, Mawas C: Production, expansion, and clonal analysis of T cells with specific HLA-restricted male lysis. *Proceedings of a Conference on Genetic Control of the Human Immune Response.* *J Exp Med* 152:182s, 1980.
92. Grebe SC, Streilein JW: Graft versus host reactions. A review. *Adv Immunol* 22: 119, 1976.
93. Gillis S, Smith RA: Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells. *Nature* 268, 1977.
94. Greene MI, Bach BA, Sy M, Brown AR, Nisonoff A, Benacerraf B: Antigen and receptor stimulated regulation. The relationship of idiotype and MHC products to regulatory networks. *In* T and B lymphocytes: recognition and function. *ICN-UNCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology*, Bach FH, Bonavida B, Vitetta ES, Fox CF (eds), 1979, 361.

95. Griffin WST, Head JR, Woodward DJ, Carrol C: Graft vs host disease impairs cerebellar growth . Nature 275: 315, 1978.
96. Gross L: Oncogenic viruses. 2°ed. Pergamon Press, Oxford, 1970.
97. Hansen JA, O'Reilly RJ, Good RA, Dupont B: Relevance of major human histocompatibility determinants in clinical bone marrow transplantation. In Immunobiology of bone marrow transplantation, Grune and Stratton (eds), 1976, p 233.
98. Hay JB, Heron J, Poskitt D, Cahill RNP, Trnkà Z: Hemodynamics of GVhr in the rat lymph node. Transpl 26: N°1,1978.
99. Hayes CE, Bach FH: T-cell specific murine Ia antigens: Serology of I-J and I-E subregion specificities. In T and B lymphocytes: recognition and function. ICN-UNCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, Bach FH, Bonavida B, Vitetta ES, Fox CF (eds), 1979, 87.
100. Heber-Katz E, Wilson DB: Sheep red blood cell-specific helper activity in rat thoracic duct lymphocyte populations positively selected for reactivity to specific strong histocompatibility alloantigens. J Exp Med 143: 701, 1976.
101. Hellström KE, Hellström I: Immunological enhancement of tumor growth. In Mechanisms of tumor immunity. Green I, Cohen S, McCluskey R(eds), John Wiley and Sons, New York, 1977, p 147.
102. Heston NE: Development of inbred strains in the mouse and their use in Cancer Research: 20th. Comm Lect Jackson Lab, Bar Harbor, Maine, 1949.
103. Hiernaux J, Bona C. Immune Network. In Lymphocytic Regulation by Antibodies. Bona C, Casenave PA (eds). A Wiley-Interscience publication, John Wiley and Sons, 1981, 269.
104. Hildemann WH, Bigger CH, Johnston IS: Histoincompatibility Reactions and Allogeneic Polymorphism Among Invertebrates. Transplantation Proceedings, 1: 1136, 1979.
105. Hopper JE, Nisonoff A: Individual antigenic specificity of immunoglobulins. Adv Immunol 13: 58, 1971.
106. Howard J, Wilson DB: Specific positive selection of lymphocytes reactive to strong histocompatibility antigens. J Exp Med 140: 660, 1974.

107. Ihle JN, Lee JC, Enjuanes L, Cicurel L, Horak I, Pepersack L: Chronic immunostimulation as a possible mechanism in type-C viral leukemogenesis. In Viruses in Naturally Occurring Cancers. Essex M, Todaro G, zur Hausen H (eds), Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, 1980, p 1049.
108. Isa AM, Sanders B: Identification of suppressor cells in tumor immunity. Reprinted from Neoplasm Immunity: Mechanisms, Proceedings of a Chicago Symposium. Crispen RG (ed), 1976.
109. Janeway CA Jr: Suppressor T cells and immunoregulation: an overview. Transpl Proc , Vol X, N°2, 1978.
110. Janeway CA: Manipulation of the immune response by anti-idiotypic. Progress in Immunology IV, Fourth International Congress of Immunology, Fougereau M, Dausset J (eds), 1980, p 1149.
111. Janeway CA Jr: The specificity of T lymphocyte responses to chemically defined antigens. Transpl Rev 29: 164, 1976.
112. Janeway C, Jones B, Binz H, Frischknecht H, Wigzell H: T-cell receptor idiotypes. Scand J Immunol 12: 83, 1980.
113. Janeway CA Jr, Wigzell H, Binz H: Hypothesis. Two different VH gene products make up to the T-cell receptors. Scand J Immunol 15: 993, 1976.
114. Jerne NK: The somatic generation of immune recognition. Eur J Immunol 1: 1, 1971.
115. Jerne NK: Towards a network theory of the immune system. Ann Immunol (Institut Pasteur) 125c: 373, 1974.
116. Johnson PM: A new beginning in autoimmunity? Immunology today 2: 120, 1981.
117. Kaplan HS, Smithers DW: Auto-immunity in man and homologous disease in relation to the malignant lymphomas. Lancet 2: 1, 1959.
118. Kapp JA, Pierce CW, Theze J, Benacerraf B: Modulation of immune responses by suppressor T cells. Federation Proc 37: 2361, 1978.
119. Katz DH, Hamaoka T, Benacerraf B: Cell interactions between histocompatible T and B lymphocytes. II. Failure of physiologic cooperative interactions between T and B lymphocytes from allogeneic

- donor strains in humoral response to hapten-protein conjugates. *J Exp Med* 137: 1405, 1973.
120. Katz DH, Hamaoka T, Dorf ME, Maurer PH, Benacerraf B: Cell interactions between histocompatible T and B lymphocytes. IV. Involvement of the immune response (Ir) gene in the control of lymphocyte interactions in responses controlled by the gene. *J Exp Med* 138: 734, 1975.
  121. Kellof GJ, Peters RL, Donahoe RM, Ghazzouli I, Sass B, Nims RM, Huebner RJ: An approach to C-type virus immunoprevention of spontaneously occurring tumors in laboratory mice. *Cancer Res* 36:622, 1976.
  122. Kelsoe G, Cerny J: Reciprocal expansions of idiotypic and anti-idiotypic clones following antigen stimulation. *Nature* 279: 333, 1979.
  123. Kindred B: Antibody response in genetically thymus-less nude mice injected with normal thymus cells. *J Immunol* 107: 1291, 1971.
  124. Kindred B, Shreffler DC: H-2 dependence of cooperation between T and B cells in vivo. *J Immunol* 109: 940, 1972.
  125. Klein J: A call for a rational nomenclature; Demystifying the major histocompatibility complex. *Immunology Today* 2: 166, 1981.
  126. Klein J: Relative importance of H-2 regions in the development of graft-versus-host reactions. *Immunobiology of bone marrow transplantation. A Transplantation Proceedings Reprint*. Dupont B, Good RA (eds), Grune and Stratton, New York, 1976, p 9.
  127. Klein J: Relative importance of H-2 regions in the development of GVH reactions. *Transpl Proc* 8: 335, 1976.
  128. Klein J: Generation of diversity at MHC loci: implications for T cell receptor repertoires. *Prog Immunol* IV, 1980, p 239.
  129. Klein J: H-2 mutations: Their genetics and effect on immune functions. *Adv Immunol* 26: 55, 1978.
  130. Klein J: The major histocompatibility of the mouse. *Science* 203: 516, 1979.

131. Klein J: Les gènes de la résistance aux maladies. *La Recherche* 109: 294, 1980.
132. Klein J: Private and Public antigens of the mouse H-2 system. *Nature* 229: 635, 1971.
133. Klein J: Histocompatibility-2 (H-2) polymorphism in wild mice. *Science* 168: 1362, 1970.
134. Klein J: Histocompatibility -2 system in wild mice. I. Identification of five new H-2 chromosomes. *Transplantation* 13: 291, 1972.
135. Klein J, Chian L Ch: Ability of H-2 regions to induce graft-versus-host disease. *J Immunol* 117: 736, 1976.
136. Klein J: Genetic control of virus susceptibility. *In* *Biology of the Mouse Histocompatibility 2 Complex*, Berlin-Springer, 1975, p 385.
137. Klein J, Zaleska-Rutczynska Z: Histocompatibility -2 system in wild mice. VI. Histogenetic Analysis of Sixteen B10. W Congenic Lines. *J Immunol* 119: 1912, 1977.
138. Rieder I, Rodt H, Netzel B, Grosse-Wilde H, Scholz S, Schäffer E, Kolb H, Thierfelder S: Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation VI. GVH tolerance in DLA-incompatible dogs after in vitro treatment of bone marrow with absorbed antithymocyte globulin. *Transpl* 27: N°4 , 1979.
139. Konetzki WS, Streilin JW: GVHR within thyroid gland may evoke *pari passu* autoimmune thyroiditis. *Transplantation* 25(N°5), 1978.
140. Kornbluth J, Dupont B: Cloning and functional characterization of primary alloreactive human T lymphocytes. *J Exp Med* 152: 164s, 1980.
141. Kramer PH: The T-cell receptor problem. *Current topics in microbiology and immunology*. Springer-Verlag (ed), Berlin, 1981, p 91.
142. Krawinkel U, Crammer M, Melchers I, Imanishi-Kari T, Rajewsky K: Isolation of hapten-binding receptors of sensitized lymphocytes. III. Evidence for idiotypic restriction of T cell receptors. *J Exp Med* 147: 1341, 1978.
143. Krueger GRF: Chronic immunosuppression and lymphomagenesis in Man and Mice. National Cancer Institute Monograph n°5, Conference on Immunology of Carcinogenesis, 1972, p 183.

144. Krueger GRF, Malmgren RA, Berard CW: Malignant lymphomas and plasmacytosis in mice under prolonged immunosuppression and persistent antigenic stimulation. *Transplantation* 11: 138, 1971.
145. Krzychu U, Strausser HR, Bressler JP, Goldstein AL: Effects of sex hormones on some T and B cell functions, evidenced by differential immune expression between male and female mice and cyclic pattern of immune responsiveness during the estrous cycle in female mice. *Amer J Reprod Immunol* 1: 73, 1981.
146. Langman R: Dissecting H-2 restriction. *Nature* 274: 12, 1978.
147. Lipsky PE (workshop convener): Role of macrophages in the initiation and regulation of the immune response. In T and B lymphocytes: recognition and function. ICN-UNCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, Bach FH, Bonavida B, Vitetta ES, Fox CF (eds), 1979, p 285.
148. Lemonnier F, Burakoff SJ, Germain RN, Benacerraf B: Cytolytic thymus-derived lymphocytes specific for allogeneic stimulator cells crossreact with chemically-modified syngeneic cells. *Proc Natl Acad Sci* 74: 1229, 1977.
149. Mage MG, McHugh L: Specific partial depletion of graft-vs-host activity by incubation and centrifugation of mouse spleen cells on allogeneic spleen cell monolayers. *J Immunol* 115: 911, 1975.
150. Mage MG, McHugh LL, Rothstein TL: Separation of graft-versus-host antigen-reactive cells in vitro. *Immunobiology of bone marrow transplantation. A Transplantation Proceedings Reprint*. Grune and Stratton New York, 1976, p 73.
151. Margni RA: *Inmunología e Inmunología Química. Fundamentos. Tercera Edición*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, 1982.
152. Matusevich M, Andrada EC, Piazzón I, Pasqualini CD: Daño fetal en el ratón por pretratamiento de la madre con injertos de piel o de tumor de origen paterno. *Medicina (Bs Aires)* 40: 543, 1980.
153. Matusevich M, Piazzón I, Déroche A, Pasqualini CD: Daño fetal en el ratón por pretratamiento de la madre con antígenos tumorales. *Medicina (Bs Aires)* 41: 321, 1981.
154. Matzinger P, Bevan M: Hypothesis. Why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens?. *Cell Immunol* 29: 1, 1977.



- 154a. Mayer AMS: Immunoprevención de leucemia murina. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Buenos Aires, 1978.
155. McDevitt HO: The role of H-2 I region genes in regulation of the immune response. In Progress in Immunology IV, Fourth International Congress of Immunology, 1980, p 503.
156. McKenzie FC, Clarke A, Parish ChR: Ia antigenic specificities are oligosaccharide in nature: hapten-inhibition studies. J Exp Med 145: 1039, 1977.
157. McMichel AJ: HLA restriction of human cytotoxic T lymphocytes specific for influenza virus. J Exp Med 148: 1458, 1978.
158. McMichael AJ, Ting A, Zweerink HJ, Askonas B: HLA restriction of cell-mediated lysis of influenza virus-infected human cells. Nature 270: 524, 1977.
159. McMichel A, Parham P, Brodsky FM, Pilch JR: Influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes recognize HLA molecules. Blocking by monoclonal anti-HLA antibodies. J Exp Med 152: 195s, 1980.
160. McMichael AJ, Ting A, Zweevirek HJ, Asoonas BA: HLA restriction of cell mediated lysis of influenza virus-infected human cells. Nature 270: 524, 1977.
161. Michaelson J, Flaherty L, Vitetta E, Poulik MD: Molecular similarities between the Qa-2 alloantigen and other gene products of the 17th chromosome of the mouse. J Exp Med 145: 1066, 1977.
162. Miller SD, Sy M, Claman HN: H-2 restriction of suppressor T-cell induction by hapten-modified lymphoid cells in tolerance to 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene contact sensitization. J Exp Med 145: 1071, 1977.
163. Miller JFAP, Vadas MA, Whitelaw A, Gamble J: Role of major histocompatibility complex gene products in delayed type hypersensitivity. Proc Natl Acad Sci 73: 2486, 1976.
164. Mitchinson NA: The case for a functional nomenclature. Immunology today 2: 166, 1981.
165. Mitchinson NA, Sercarz EE: Helper and suppressor epitopes. In T and B lymphocytes: Recognition and function. ICN-UNCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology. Bach FH, Bonavida B, Vitetta ES, Fox CF (eds), 1979, 289.

166. Moller G: Suppressive effect of graft-versus-host reactions on the immune response to heterologous red cells. *Immunology* 20: 597, 1971.
167. Mota I: Activity of immune cells. In *Fundamentals of Immunology*. Bier, Dias da Silva, Götze, Mota (eds), Springer Verlag New York, Heidelberg, Berlin, 1981, p 33.
168. Nisonoff A, Baugasser SA: Immunological suppression of idiotypic specificities. *Transplant Rev* 27: 100, 1975.
169. Nisonoff A, Greene MI: Regulation through idiotypic determinants of the immune response to the p-azophenylarsonate hapten in strain A mice. *Progress in Immunology IV, Fourth International Congress of Immunology*. Fougeureau M, Dausset J (eds), 1980, p 57.
170. Owen FL, Ju S, Nisonoff A: Presence on idio<sup>type</sup>-specific suppressor T cells of receptors that interact with molecules bearing the idio<sup>type</sup>. *J Exp Med* 145: 1559, 1977.
171. Pasqualini CD: Interrelaciones inmunológicas entre la preñez, el transplante de órganos y el cáncer. *Medicina (Bs Aires)* 41 (Supl):303, 1981.
172. Pasqualini CD, Matusevich M: Correlación entre el crecimiento tumoral y el crecimiento fetal. *Medicina (Bs Aires)* 39: 531, 1979.
173. Pasqualini CD, Piazzon I, Matusevich M, Déroche A: From tumor-host to feto-maternal relationship: Immunological studies. In *Physiopathology of Hypophysial Disturbances and Diseases of Reproduction*. Liss AR Inc, New York, 1981.
174. Pasqualini C Dosne de, Saal F, Sen L, Rabasa SL: Leucemia murina. *Medicina (Bs Aires)* 28 (Supl 1): 116, 1968.
175. Pfizenmaier K, Stockinger H, Röllinghoff M, Wagner H: Herpes-Simplex-Virus-Specific, H-2D<sup>K</sup>-Restricted T Lymphocytes Bear Receptors for H-2D<sup>d</sup> alloantigen. *Immunogenetics* 11: 169, 1980.
176. Piazzon I, Déroche A, Pasqualini C Dosne: Kinetics of the Graft-versus-Host reaction during allogeneic tumor enhancement. *Arch Geschwulstforschung* 50: 322, 1980.

177. Piazzon I, Matusevich M, Déroche A, Pasqualini CD: Alorreactividad y preñez: células inmunorreguladoras en el ratón recién nacido. Medicina (Bs Aires) 41: 775, 1981.
178. Piazzón I, Pasqualini CD: Transplante de médula ósea y reconstitución inmunológica. Medicina (Bs Aires) 41: 233, 1981.
179. Piazzón I, Matusevich M, Déroche A, Pasqualini CD: Reacción de injerto contra huésped inducida por esplenocitos de ratones hembras a los 4 días de preñez. Medicina (Bs Aires) 40: 788, 1980.
180. Piazzón I, Matusevich M, Déroche A, Pasqualini CD: Alorreactividad y preñez. Primeras Jornadas de Endocrinología y Metabolismo del Cono Sur, Iguazú, 1981.
181. Pickel K, Hoffmann MK: Suppressor T cells arising in mice undergoing a graft-versus-host response. J Immunol 118(2): 653, 1977.
182. Pierce CW, Kapp JA, Bencerraf B: Regulation by the H-2 gene complex of macrophage-lymphocyte interactions in secondary antibody responses in vitro. J Exp Med 144: 371, 1976.
183. Pimsler M, Forman J: Use of H-2 mutations to quantitate alloreactivity: alloreactivity is strongest against H-2 antigens which are closest to self. Immunogenetics 11: 111, 1980.
184. Pink JRL, Miggiano VC, Ziegler A: Antigens of the Chicken major histocompatibility (B) complex. Folia Biol (Praha) 23: 404, 1977.
185. Plata F, Lilly F: T cell cytotoxicity in mice elicited by immunization with syngeneic tumor cells induced by different strains of mouse leukemia viruses. In T and B lymphocytes: recognition and function. ICN-UNCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, Fach FH, Bonavida B, Vitetta ES, Fox CF (eds), 1979, p 549.
186. Pollard M, Chang CF, Srivastava KK: The role of microflora in development of graft-versus-host disease. Dupont B, Good RA (eds) Immunobiology of bone marrow

- transplantation Proceedings Reprint. Grune and Stratton, New York, 1976, p 189.
187. Pritchard LL, Halle-Pannenko: Interactions of major and minor histocompatibility antigens in the graft-versus-host reaction. Transplantation 31: 257, 1981.
  188. Raff MCT: Cell recognition at Cold Spring Harbor. Nature 263: 10, 1976.
  189. Rapaport FT, Bachvaroff RJ, Watanabe K, Hirasawa H, Cannon FD, Mollen N, Ayrazian JH, Blumenstock D, Ferrebee JW: Genetics studies of bone-marrow transplantation in the canine species. In Immunology of bone marrow transplantation Proceedings Reprint. Dupont B, Good RA (eds), Grune and Stratton, New York, 1976, p 97.
  190. Rehn TG, Inman JK, Shearer GM: Cell mediated lympholysis of N-3(3nitro 4hydroxy-5 iodophenylacetyl)  $\beta$ alanyl-glycyl-glycyl-modified autologous lymphocytes. Effector cell specificity to modified cell surface components controlled by the murine major histocompatibility complex. J Exp Med 144: 1134, 1976.
  191. Reinherz EL, Schlossman SF: Regulation of the immune response-inducer and suppressor T-lymphocyte subsets in human beings. The New England J Med 303: 370, 1980.
  192. Rich RR, Abramson SL, Seldin MF, Puck JM, Levy R: Role of Ia-positive cells in induction of secondary human immune responses to haptens in vitro. Proceedings of a Conference on Genetic Control of the Human Immune Response. J Exp Med 152, 218s, 1980.
  193. Rinaldo CR Jr, Hirsh MS, Black PH: Activation of latent viruses following bone marrow transplantation. In Immunobiology of bone marrow transplantation. A Transplantation Proceedings Reprint. Dupont B, Good RA (eds), Grune and Stratton, New York, 1976, p 321.
  194. Robertson M: Recognition, restriction and immunity. Nature 280: 192, 1979.
  195. Rodkey LL: Studies of idiotypic antibodies. Production and Characterization of auto-anti-idiotypic antisera. J Exp Med 139: 712, 1974.

196. Rosenthal AS, Thomas JW, Schroer J, Blake T: The role of macrophages in genetic control of the immune response (restrict T-M genes Ir). Progress in Immunology IV, Fourth International Congress of Immunology. Fougereau M, Dausset J (eds), 1980, p 458.
197. Sachs DH: Genetic control of idiotype expression. Progress in Immunology IV, Fourth International Congress of Immunology. Fougereau M, Dausset J (eds), 1980, p 478.
- 197a. Satz L: Tesis de Doctorado. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, 1980.
198. Schwartz RS, Beldotti L: Malignant lymphomas following allogeneic disease: transition from an immunological to a neoplastic disorder. Science 149: 1511, 1965.
199. Schwartz RH, Solinger AM, Ultee ME, Margoliash E, Yano A, Stimfling JH, Chen Ch, Merryman CF, Maurer PH, Paul WE: IR gene complementation in the murine T-lymphocyte proliferative response. In T and B lymphocytes: Recognition and function. ICN-UNCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. Bach FH, Bonavida B, Vitetta ES, Fox CF (eds), 1979, p 261.
200. Seeling LL, Billingham RE: Concerning the natural transplantation of maternal lymphocytes via milk. Transplantation Proc 13: 1245, 1981.
201. Seddik M, Seemayer TA, Kongshavn P, Lapp WS: Thymic epithelial functional deficit in chronic graft versus host reactions. Transplantation Proc 11: 967, 1979.
202. Segall M, Reinsmoen NL, Noreen HJ, Bach FH: Complexity of the HLA-D region studied by primed-lymphocyte test. J Exp Med 152: 156s, 1980.
203. Shand FL: Analysis of immunosuppression generated by the graft-versus-host reaction. I. A suppressor T-cell component studied in vivo. Immunology 29: 953, 1975.
204. Shand FL: Analysis of immunosuppression generated by the graft versus host reaction. II. Characterization of the suppressor cell and its mechanism of action. Immunol 31: 943, 1976.

205. Shand FL: Characterization of the suppressor cell generated in a murine graft-versus-host reaction (GVHR). Transplantation Proc 9: N°1, 1977.
206. Shaw S, Nelson BL, Shearer GM: Human cytotoxic response in vitro to trinitrophenyl-modified autologous cells. J Immunol 121: 281, 1978.
207. Shaw S, Nelson BL, Shearer GM: Human cytotoxic response in vitro to trinitrophenyl-modified autologous cells. J Immunol 121: 290, 1978.
208. Shearer GM, Rehn TG, Schmitt-Verhust AM: Role of the murine major histocompatibility complex in the specificity of in vitro T-cell mediated lympholysis against chemically-modified autologous lymphocytes. Transplantation Rev 29:222, 1976.
209. Shevach EM, Rosenthal AS: The function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. II. Role of the macrophages in the regulation of genetic control of the immune response. J Exp Med 138: 1213, 1973.
210. Simonsen M: The heterogeneity of lymphocytes. Return to square one. In International Congress Series N°323, Allergy. Excerpta Medica, Amsterdam, 1974, p 146.
211. Simonsen M: Graft-versus-host studies in experimental animals. Transplantation Proc 8: 329, 1976.
212. Simonsen M: Graft-versus-host studies in experimental animals. A Transplantation Proceedings Reprint. Immunobiology of Bone-marrow transplantation. Dupont B, Good RA (eds), Grune and Stratton, New York, 1976, p 3.
213. Simonsen M, Hála K, Vilhemová M: The use of GVH methods in analysis of the B-complex. Folia Biol (Praha) 23:402, 1977.
214. Simpson E: Regulating the immune system. Nature 273: 99, 1978.
215. Slater LM, Böstick W, Fletcher L: Decreased mortality of murine graft vs host disease by human chorionic gonadotrophin. Transp 23: 103, 1977.

216. Snell GD: Studies in histocompatibility. Science 213: 172, 1981.
217. Snow Ch, Hilgard HR: Local cellular immunity in the draining lymph nodes of mice after immunization with histocompatibility alloantigens. Transplantation 32, N°1: 29, 1981.
218. Solnik C, Gleichmann H, Kavanah M, Schwartz RS: Immunosuppression and malignant lymphomas in Graft-versus-host reactions. Cancer Res 33: 2068, 1973.
219. Sredni B, Schwartz RH: Alloreactivity of an antigen-specific T-cell clone. Nature 287: 855, 1980.
220. Staat J: Standardized nomenclature for inbred strains of mice: Fourth listing. Cancer Res 28: 391, 1968.
221. Strong LC: The establishment of the "A" strain of inbred mice. J Heredity 27: 21. 1936.
222. Strong LC: The origin of some inbred mice. Cancer Res 2: 531, 1942.
223. Stutman O: Development of T cells in the mouse. In T and B lymphocytes: Recognition and function. ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. Bach FH, Bonavida B, Vitetta ES, Fox CF (eds), 1979, p 77.
224. Tada T, Taniguchi M, Hayakawa K, Okumura K: Multiple MCH loci controlling lymphocyte interactions. In T and B lymphocytes: Recognition and function. ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. Bach FH, Bonavida B, Vitetta ES, Fox CF (eds), 1979. p 293.
225. Takei F, Levy JG, Kilburn DG: Characterization of suppressor cells in mice bearing syngeneic mastocytoma. J Immunol 118, N°2, 1977.
226. Talal N, Roubinian JR, Shear H, Hom JT, Miyasaka N: Progress in the mechanisms of autoimmune disease. In Progress in Immunology IV, Fourth International Congress of Immunology, 1980, p 889.

227. Theofilopoulos AN, Gleicher N, Pereira AB, Dixon FJ: The Biology of Immune Complexes and their possible Role in Pregnancy. (Review). Amer J Repr Immunol 1: 92, 1981.
228. Thomas ED, Buckner CD, Banaji M et al: One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation and allogeneic marrow transplantation. Blood 49: 511, 1977.
229. Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL et al: Bone-marrow transplantation. N Engl J Med 292: 832, 1975.
230. Toivanen A: Interactions of leukocytes in phylogenetic perspective. Transplantation Proc Vol XI, N°1, 1979.
231. Tyndall RL, Otten JA, Estes PC: Oncogenic effect of repeated inoculation of mice with sheep erythrocytes. Transplantation 14:269, 1972.
232. Urbain J, Cazenave PA, Winkler M, Franssen JD, Mariamé B, Leo O: Idiotypic induction and Immune networks. In Progress in Immunology IV, Fourth International Congress of Immunology. Fougereau M, Dausset J (eds), 1980, p 81.
233. van Rood JJ, van Leeuwen A: Major and minor histocompatibility systems in man and their importance in bone-marrow transplantation. A Transplantation Proceedings Reprint. Grune and Stratton, New York, 1976, p 103.
234. Vilhelmová M: Comparison of the Graft-versus-Host Reactivity in inbred lines of chickens. Folia Biol (Praha) 23: 415, 1977.
235. Vitale B, Jaksic M, Silobrcic V, Tomazic V: Acute graft vs host reaction in mice. I Cellular events. Transpl 21: 502, 1976.
236. Vitetta ES, Capra D: The protein products of the murine 17th chromosome: genetics and structure. Adv in Immunol 26: 147, 1978.
237. Vitetta ES, Uhr JW, Klein J, Pazderka F, Moticka EJ, Ruth RF, Capra JD: Homology of (murine) H-2 and (human) HLA with a chicken histocompatibility antigen. Nature 270: 535, 1977.



238. Voisin GA, Chaouat G: Demonstration, nature and properties of maternal antibodies fixed on placenta and directed against paternal antigens. *Reprod Fert* 21:89, 1974.
239. von Boehmer H: Expression of receptor diversity in T lymphocytes. *Progress in Immunology IV, Fourth International Congress of Immunology*. Fougereau M, Dausset J (eds), 1980, p113.
240. von Bohemer H, Haas W, Jerne NK: Major histocompatibility complex-linked immune-responsiveness is acquired by lymphocytes of low-responder mice differentiating in thymus of high-responder mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 2439, 1978.
241. Wigzell H, Binz H: Lymphocyte receptors. *In Progress in Immunology IV, Fourth International Congress of Immunology*. Fougereau M, Dausset J (eds), 1980, p 94.
242. Weksler ME: Autologous immune reactions as regulatory mechanisms. *Introduction. Federation Proc* 37: 2360, 1978.
243. Weksler ME, Kuntz MM, Birnbaum G, Innes JB: Lymphocyte transformation induced by autologous cells. *Federation Proc* 37: 2370, 1978.
244. Weksler ME, Moody Ch E, Ostry RF, Casazza BA: Lymphocyte transformation induced by autologous cells. X. Soluble factors that generate cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 152: 2848, 1980.
245. Williamson AR: Three-receptor, clonal expansion model for selection of self-recognition in the thymus. *Nature* 283: 527, 1980.
246. Wilson DB: Immunologic reactivity to major histocompatibility alloantigens. HARC, effector cells and the problem of memory. *Progr Immunol* 2: 145, 1974.
247. Wolters EAJ, Benner R: Immunobiology of the GVHR. II. Symptoms of GVHD in mice are preceded by delayed-type hypersensitivity to host histocompatibility antigens. *Transpl* 26: N°1, 1978.

248. Wood G, Reynard J, Krishnan E, Racela L: Immunobiology of the human placenta. *Cell Immunol* 35: 191, 1978.
249. Woodruff JM, Hansen JA, Good RA, Santos GW, Slavin RE: The pathology of the graft-versus-host reaction (GVHR) in adults receiving bone marrow transplants. A transplantation Proceedings Reprint. Grune and Stratton, New York, 1976, p 327.
250. Zaleska-Rutczynska Z, Klein J: Histocompatibility-2 system in wild mice. V. Serologic Analysis of Sixteen B10. W Congenic Lines. *J Immunol* 119: 1903, 1977.
251. Ziegler JB, Alper Ch A, Balner H: Properdin factor B and histocompatibility loci linked in the rhesus monkey. *Nature* 254: 609, 1975.
252. Zinkernagel RM: Major transplantation antigens in T cell-mediated immunity: a comparison of the transplantation reaction with antiviral immunity. *Federation Proc* 37: 2379, 1978.
253. Zinkernagel RM: T cell differentiation and T cell restriction. *Progress in Immunology IV, Fourth International Congress in Immunology*. Fougereau M, Dausset J (eds), 1980, p 338.
254. Zinkernagel RM: Associations between major histocompatibility antigens and susceptibility to disease. *Ann Rev Microbiol* 33: 201, 1979.
255. Zinkernagel RM: MHC-restriction and differentiation of T cells. In T and B lymphocytes: Recognition and function. ICN-UNCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. Bach FH, Bonavida B, Vitetta ES, Fox CF (eds), 1979, p 505.
256. Zinkernagel RM, Callaghan GN, Althage A, Cooper S, Klein PA, Klein J: On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: evidence for dual recognition?. *J Exp Med* 147: 883, 1978.
257. Zinkernagel RM, Callaghan GN, Althage A, Cooper S, Streilein JW, Klein J: The lymphoreticular system in triggering virus plus self-specific cytotoxic T cells: evidence for T help. *J Exp Med* 147: 897, 1978.

258. Zinkernagel RM, Doherty PC: Restriction of in vitro T-cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. Nature 248: 701, 1974.
259. Zinkernagel RM, Doherty PC: H-2 compatibility requirement for T-cell mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. J Exp Med 141: 1427, 1975.
260. Zinkernagel RM, Doherty P: MHC restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. Adv Immunol 27: 51, 1979.
261. Zoschke DC, Bach FH: Specificity of allogeneic cell recognition by human lymphocytes in vitro. Science 172: 1350, 1971.

G L O S A R I O , S I N O N I M I A Y A B R E V I A T U R A S

## GLOSARIO, SINONIMIA Y ABREVIATURAS

Ac: anticuerpo

Ag: antígeno

Alogeneicos: miembros de la misma especie genéticamente diferentes

Antígenos Ia: antígenos codificados por la región I del H-2

Antígenos Lyt: antígenos alélicos expresados por subpoblaciones de células T

Autoanticuerpo: anticuerpo dirigido contra antígenos propios

Autorreactividad: la capacidad de montar una respuesta inmune contra antígenos propios

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad. En el ratón se denomina H-2, en el hombre HLA, en perros DLA, etc.

Complemento: Serie de proteínas séricas interactuantes que se combinan con complejos antígeno-anticuerpo y causan la lisis celular.

Determinantes carrier: determinantes sobre un antígeno con los que reaccionan las células T colaboradoras (Th).

Epitopo: determinante antigénico. En este trabajo nos referimos como epitopos a los determinantes antigénicos externos, no propios del individuo.

E.S.: error estandar

F1(A x B): híbrido de la primera generación del cruzamiento entre la hembra de la cepa A y el macho de la cepa B.

Genes Ir: genes de la región I del H-2

g.p.: ganglios poplíteos, drenantes de la almohadilla plantar

g.p.a.: ganglios paraaórticos, ganglios drenantes del útero

G.R.: glóbulos rojos

GRC: glóbulos rojos de carnero

GRCo: glóbulos rojos de conejo

GVH: reacción de injerto contra huésped. Reacción mediada por células en la que las células T del injerto reaccionan con los antígenos del huésped.

H: antígeno de histocompatibilidad mayor.

H-2: CMH del ratón.

Haplotipo: conjunto de determinantes antigénicos codificados por genes cercanamente ligados sobre un único cromosoma. En este trabajo se hace referencia al conjunto de genes del CMH existente en uno de los cromosomas.

i.d.: intradérmica

Idiotipo: marcador antigénico generalmente presente en el sitio de combinación de una molécula de Ig.

Idiotopo: cada uno de los determinantes antigénicos que constituyen un idiotipo.

IE: índice esplénico: Peso bazo/peso corporal.

Ig: inmunoglobulina

i.p.: intraperitoneal

i.u.: intrauterina

i.v.: endovenosa

MEM: medio para cultivo de células y tejidos

PBS: solución fisiológica tamponada

Quimera: células de origen genético diferente existentes en un mismo individuo

R: receptor celular

Regiones hipervariables: regiones de la molécula de Ig que poseen una gran variabilidad en la secuencia de aminoácidos cuando se las compara con otras Ig y sirven como sitio de unión con el antígeno.

s.c.: subcutánea

Selección clonal: propuesta que afirma que los linfocitos es tán preprogramados para reaccionar con un antígeno específico; la reacción con el antígeno induce la expansión clonal de estas células.

S.F.: solución fisiológica

Singeneicos: miembros de diferentes especies

Tc: célula T que posee la capacidad de matar a otras células

Th: T colaboradoras, subpoblación de células T que coopera  
con precursoras de células efectoras (T helper)

Ts: célula T supresora de respuestas inmunes

V: genes que codifican para las regiones variables de las Ig

VH: genes que codifican para las regiones variables de las  
cadenas pesadas de las Ig

VL: genes que codifican para las regiones variables de las ca  
denas livianas de las Ig.

Xenogeneicos: miembros de diferentes especies