

Tesis de Posgrado

Inmunoregulación en ratones F1 híbridos recíprocos

Nepomnaschy, Irene

1985

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Nepomnaschy, Irene. (1985). Inmunoregulación en ratones F1 híbridos recíprocos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1926_Nepomnaschy.pdf

Cita tipo Chicago:

Nepomnaschy, Irene. "Inmunoregulación en ratones F1 híbridos recíprocos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1926_Nepomnaschy.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Tesis
1926
03:2

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**INMUNOREGULACION
EN
RATONES F1 HIBRIDOS RECIPROCOS**

**AUTORA: IRENE NEPOMNASCHY
DIRECTORA: DRA. CHRISTIANE DOSNE PASQUALINI
CO-DIRECTORA: DRA. ISABEL PIAZZON**

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 1985

1926

1926
E 2

a Tito, Mariana y Hernan

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 Pasqualini, Jefe de la Sección Leucemia Experimental y Directora de esta Tesis, quien, en momentos muy difíciles, me brindó la oportunidad y el apoyo para realizar este trabajo.

A la Dra. Isabel Piazzon, Co-directora de esta Tesis, por su personal y leal manera de brindar su conocimiento y su afecto, y

a Adriana Dèroche, con quienes he compartido a lo largo de este trabajo no sólo las tareas sino también el intento de vivir mejor.

A todos mis compañeros, quienes me brindaron su apoyo y colaboración.

A los Sres. Juan J. Portaluppi, Antonio Morales y Rafael Repetto quienes me han brindado su inestimable asistencia técnica y la calidez de su cariño.

Al Sr. Julio Tejeda y al resto del personal tècnico y de apoyo, quienes no escatimaron su esfuerzo diario, imprescindible para la concreciòn de este trabajo.

A Tito, por su apoyo total.

A Informàtica Aplicada SA por su gentileza al facilitarme el uso de sus equipos.

A Leo, Benjamin, Delia, Alberto, Marcelo, Salvador y Fabiàn por su amable colaboraciòn en el manejo de las computadoras y, sobre todo, por haber transformado en agradables las largas horas de elaboraciòn de este manuscrito.

A Carlos, Rafael y Teresa por el diseõ de las figuras.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Cientificas y Tècnicas (CONICET) y a la Fundaciòn Para la Lucha Contra la Leucemia (FUNDALEU), instituciones que, al distinguirme con sus becas, hicieron posible este trabajo.

OBJETIVOS.	1
INTRODUCCION.	4
1.EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD.	5
1.1.El complejo mayor de histocompatibilidad del ratón.	5
1.2.Antígenos de clase I.	6
1.3.Antígenos de clase II.	8
1.4.Polimorfismo.	11
2.RECONOCIMIENTO DE LO PROPIO. I.LA RESTRICCIÓN T.	12
2.1.Restricción de la respuesta inmune por el complejo mayor de histocompatibilidad.	12
2.2.Estructuras interectuentes en la restricción T.	16
2.3.Modelos de restricción T.	19
2.4.Rol del timo en el aprendizaje de la discriminación específica propia.	19
2.5.Genes de respuesta inmune.	27
3.ENSAYOS EXPERIMENTALES PARA LA DETERMINACION DE LOS NIVELES NORMALES DE RECONOCIMIENTO DE LOS AMH PROPIOS.	29
3.1.Cultivo mixto de linfocitos singéneico.	26
3.2.Reacción de injerto contra huésped singéneico.	30
4.RESPUESTA FRENTE A ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD NO PROPIOS.	32
4.1.Aloreactividad T.	32
4.2.Reacción de injerto contra huésped.	35
4.3.Resistencia frente a reacciones de injerto contra huésped.	41
4.4.Antígenos menores de histocompatibilidad.	44

5. CIRCUITOS INMUNORREGULATORIOS T DEPENDIENTES.	46
5.1. Nivel 1 de supresión.	47
5.2. Contrasupresión.	48
5.3. Nivel 2 de supresión.	49
5.4. Ontogenia de los circuitos T inmunorregulatorios.	50
6. RECONOCIMIENTO DE LO PROPIO. II. RED DE IDIOTIPOS- ANTIIDIOTIPOS.	53
6.1. La teoría de la red.	53
6.2. Determinantes antigénicos privados y públicos.	57
7. RELACION MATERNO-FETAL.	59
7.1. Inmunología de la preñez.	59
7.2. Intercambio de células a través de la placenta.	61
7.3. Pasaje a través de la lactancia.	65
7.4. Influencia materna sobre el desarrollo de la respuesta inmune de la cría.	70
MATERIALES Y METODOS.	74
1. Animales.	75
2. Preparación de suspensiones celulares.	76
3. Reacción de injerto contra huésped.	77
3.1. Ensayo local de Ford y Simonsen.	77
4. Inducción de la proliferación de linfocitos T con receptores para los AMH propios de origen materno y paterno.	78
4.1. Supresión de reacciones de GVH local por inoculación a.v. de esplenocitos de la ceba parental.	78

5.Reacciones de GvH local singeneico entre F1 idénticos y recíprocos.	79
5.1.Ensayo local.	79
5.2.Pretratamiento del injerto con mitomicina-C.	81
5.3.Pasaje de células por columna de lana de nylon.	82
5.4.Reacciones de GvH singeneico entre híbridos idénticos y recíprocos amamantados por nodrizas de la cepa paterna.	83
6.Cultivo mixto de linfocitos singeneico.	84
6.1.CMLS entre híbridos idénticos y recíprocos.	85
6.2.Ensayos de CMLS entre F1 normales y F1 amamantados por nodrizas de la cepa paterna.	86
7.Crecimiento de tumores linfoides de origen parental en F1 recíprocos.	87
8.Planteo experimental y estadístico.	88
RESULTADOS.	89
1.REACCIONES DE INJERTO CONTRA HUESPED LOCAL DE ESLENOCITOS DE LAS CEPAS PARENTALES FRENTE A HÍBRIDOS F1 RECÍPROCOS.	90
1.1.a.Reacción de GvH con esplenocitos BALB/c en híbridos F1(BALB/cxAKR.M) y F1(AKR.MxBALB/c).	90
1.1.b.Reacción de GvH con esplenocitos AKR.M en híbridos F1(BALB/cxAKR.M) y F1(AKR.MxBALB/c).	91
1.2.a.Reacción de GvH con esplenocitos BALB/c en híbridos F1(BALB/cxAKR/J) y F1(AKR/JxBALB/c).	91
1.2.b.Reacción de GvH con esplenocitos AKR/J en híbridos F1(BALB/cxAKR/J) y F1(AKR/JxBALB/c).	92
1.3.a.Reacción de GvH con esplenocitos BALB/c en híbridos F1(BALB/cxDBA/2) y F1(DBA/2xBALB/c).	92
1.3.b.Reacción de GvH con esplenocitos DBA/2 en híbridos F1(BALB/cxDBA/2) y F1(DBA/2xBALB/c).	92

2.NIVELES DE PROTECCION FRENTE A GvH LOCALES DETERMINADOS POR LA INOCULACION E.V. DE LINFOCITOS PARENTALES.	93
2.1.Niveles de protección frente al GvH con esplenocitos BALB/c en F1(BALB/cxAKR/J) y F1(AKR/JxBALB/c).	93
2.2.Niveles de protección frente al GvH con esplenocitos BALB/c en F1(BALB/cxAKR.M) y F1(AKR.MxBALB/c).	94
3.CINETICA DE CRECIMIENTO DE TUMORES DE ORIGEN PARENTAL EN HIBRIDOS RECIPROCOS.	95
3.1.a.Crecimiento del linfoma LB en híbridos F1(BALB/cxAKR/J) y F1(AKR/JxBALB/c).	95
3.1.b.Crecimiento del linfoma L15 en híbridos F1(BALB/cxAKR/J) y F1(AKR/JxBALB/c).	96
4.REACCIONES DE GvH LOCAL SINGENEICO ENTRE HIBRIDOS IDENTICOS Y RECIPROCOS.	96
4.1.Reacciones de GvH local singeneico entre híbridos idénticos y recíprocos que difieren en sus AMH y en sus AmH.	97
4.1.a.Reacciones de GvH local singeneico entre híbridos F1(BALB/cxAKR.M) y F1(AKR.MxBALB/c).	97
4.1.b.Curva de dosis respuesta de la reacción de GvH singeneico idéntico y recíproco en huéspedes F1(BALB/cxAKR.M).	98
4.2.a.Reacciones de GvH singeneico entre híbridos F1(BALB/cxAKR/J) y F1(AKR/JxBALB/c).	98
4.3.Efecto del pretratamiento del injerto de esplenocitos del híbrido recíproco con mitomicina-C.	99
4.3.a.Injerto de esplenocitos F1(AKR/JxBALB/c) pretratados con mitomicina-C en huéspedes F1(BALB/cxAKR/J).	99
4.3.b.Injerto de esplenocitos F1(AKR/JxBALB/c) pretratados con mitomicina-C en huéspedes F1(BALB/cxAKR/J).	99
4.4.Reacciones de GvH local singeneico recíproco con poblaciones esplénicas enriquecidas en células T.	100

4.5.Reacciones de GvH local singeneico entre hibridos reciprocos en combinaciones de cepas que difieren solamente en sus AmH.	100
4.5.a.GvH local singeneico entre los hibridos F1(BALB/cxDBA/2) y F1(DBA/2xBALB/c).	101
5.REACCIONES DE CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS SINGENEICO HIBRIDOS F1 IDENTICOS Y RECIPROCOS.	102
5.1.Reacciones de cultivo mixto de linfocitos singeneico entre F1 (AKR/JxBALB/c) y F1(BALB/cxAKR/J).	102
6.EFECTO DEL AMAMANTAMIENTO CON HEMBRAS DE LA CEPA PATERNA SOBRE LAS REACCIONES DE GvH SINGENEICO ENTRE HIBRIDOS IDENTICOS Y RECIPROCOS.	103
6.1.Reacciones de GvH local singeneico de F1(AKR/JxBALB/c) en huèspedes F1(AKR/JxBALB/c). fBALB/c	103
6.2.Reacciones de GvH local singeneico de F1(BALB/cxAKR/J) en huèspedes F1(BALB/cxAKR/J). fAKR/J	104
6.3.Reacciones de GvH local singeneico de F1(AKR/JxBALB/c) en huèspedes F1(BALB/cxAKR/J). fBALB/c	105
7.CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS SINGENEICO ENTRE HIBRIDOS NORMALES E HIBRIDOS AMAMANTADOS POR NODRIZAS DE LA CEPA PATERNA.	105
7.1.Reacciòn de CML singeneico de hibridos F1(AKR/JxBALB/c) frente a F1(AKR/JxBALB/c)fBALB/c y F1(BALB/cxAKR/J)fAKR/J.	106
DISCUSION.	108
RESUMEN.	134
BIBLIOGRAFIA.	138
ABREVIATURAS	165

OBJETIVOS

La inmunología en su concepción clásica, desarrollada a principios de este siglo por Paul Erlich, establecía que la capacidad central del sistema inmune consistía en reconocer y rechazar lo extraño o no propio, junto con la falta de respuesta frente a lo propio, de acuerdo a un principio que se denominó "horror autotòxicus". Teniendo en cuenta estas postulaciones, los términos autoinmunidad y reconocimiento de lo propio se relacionaron durante mucho tiempo exclusivamente con el concepto de enfermedad.

En los últimos 15 años, en base a numerosas evidencias experimentales, tales conceptos sufrieron fuertes cambios. Actualmente se acepta que el sistema inmune posee un alto nivel de complejidad que incluye el reconocimiento de lo propio como uno de sus mecanismos centrales. Específicamente, la regulación interna del sistema ocurre a través del reconocimiento de lo propio y esto constituye la forma más básica de la autoinmunidad.

En efecto, la restricción de la respuesta inmune por el complejo mayor de histocompatibilidad (1), que regula la interacción entre diversas células del sistema inmune, ocurre a través del reconocimiento de los antígenos de histocompatibilidad propios expresados en diferentes células del sistema inmune por los linfocitos T. Otro mecanismo central de regulación de la respuesta inmune consiste en el reconocimiento de los idiotipos expresados

en las inmunoglobulinas propias y la producción de los anticuerpos antiidiotípicos correspondientes (2), lo cual representa otra forma de respuesta frente a lo propio.

En condiciones normales, estos mecanismos inmunorregulatorios funcionarían adecuadamente dentro de los canales homeostáticos, autolimitándose a través de circuitos de retroalimentación. Las enfermedades autoinmunes se desencadenarían por alteraciones profundas de este equilibrio que llevarían a un reconocimiento anormal de los antígenos propios, con la consecuente aparición de daños diversos para el organismo.

El aprendizaje de la discriminación entre lo propio y lo no propio comienza tempranamente en la ontogenia, y dependería de la interacción adecuada de las células del sistema inmune con diversos antígenos. Los embriones y recién nacidos se hallan expuestos normalmente al contacto con numerosos antígenos maternos: este contacto temprano podría dejar una impronta particular en el desarrollo posterior de la respuesta inmune del individuo.

Este trabajo fué desarrollado con el objetivo de investigar la existencia de influencia materna en la determinación de los niveles de expresión y/o reconocimiento de los antígenos de histocompatibilidad propios de origen materno y paterno en los hijos híbridos.

Nuestro modelo experimental consistió en estudiar el reconocimiento con alta y baja afinidad de los antígenos de histocompatibilidad propios en ratones F1 híbridos recíprocos entre dos cepas endocriadas. En una segunda etapa, investigamos si el amamantamiento constituía un vehículo a través del cual se podrían ejercer estos efectos maternos.

INTRODUCCION

1. EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

La capacidad de discriminar entre lo propio y lo no propio aparece tempranamente en la escala evolutiva. Los metazoos mas primitivos, los porifera, poseen ya un sistema que les permite responder frente al contacto con otras colonias de la misma especie pero genéticamente distintas, destruyéndolas(3-4).

Sistemas similares, de diverso grado de complejidad, se han descrito en invertebrados y vertebrados. Todos comparten ciertas características: poseen receptores para el reconocimiento de lo propio y lo no propio en la superficie de sus células; estos receptores son altamente polimórficos; y poseen mecanismos efectores que permiten la destrucción de las células o estructuras reconocidas como no propias (4-5-6).

1.1. El complejo mayor de histocompatibilidad del ratón.

En los mamíferos, se denomina complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), a un grupo de genes intimamente ligados que intervienen en el reconocimiento de lo propio-no propio. Estos genes codifican para glicoproteínas de la superficie celular denominadas antígenos mayores de histocompatibilidad (AMH).

La primera descripción de un complejo de este tipo, así como el mejor conocimiento actual, corresponde al CMH del ratón, debido al uso habitual de cepas endocriadas, es decir genéticamente idénticas, y a la construcción mediante cruzamientos adecuados de cepas congénicas que difieren sólo en uno o pocos loci de este complejo.

El CMH del ratón, denominado H-2, se encuentra en el cromosoma 17; se ha determinado por análisis genético que posee una longitud de 1600 centimorgans, y, de acuerdo a técnicas bioquímicas contiene 3×10^9 pares de bases, (5-7). Los genes de este complejo se han subdividido en dos clases llamadas I y II que difieren en cuanto a las propiedades y funciones de sus respectivos productos (Fig.1).

1.2. Antígenos de clase I.

Los antígenos de clase I mejor caracterizados están codificados en las regiones denominadas K y D del CMH, aunque actualmente se incluyen en esta clase a los antígenos codificados en las regiones denominadas Qa y Tla.

Los antígenos K y D son glicopéptidos de membrana, tienen un peso molecular de 44.000, poseen una única cadena polipeptídica de 340 a 350 aminoácidos, a la que se unen dos cadenas laterales de carbohidratos. En la membrana celular se hallan unidos no covalentemente con una

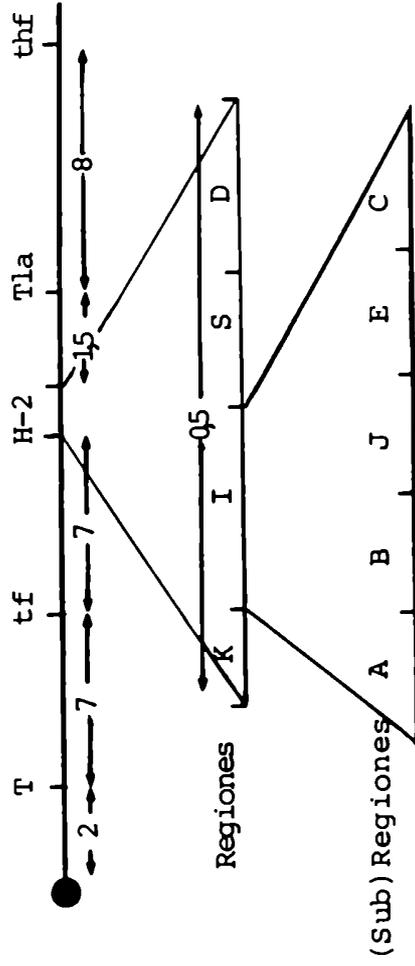


Figura 1 : Mapa lineal del complejo H-2 en el cromosoma 17.

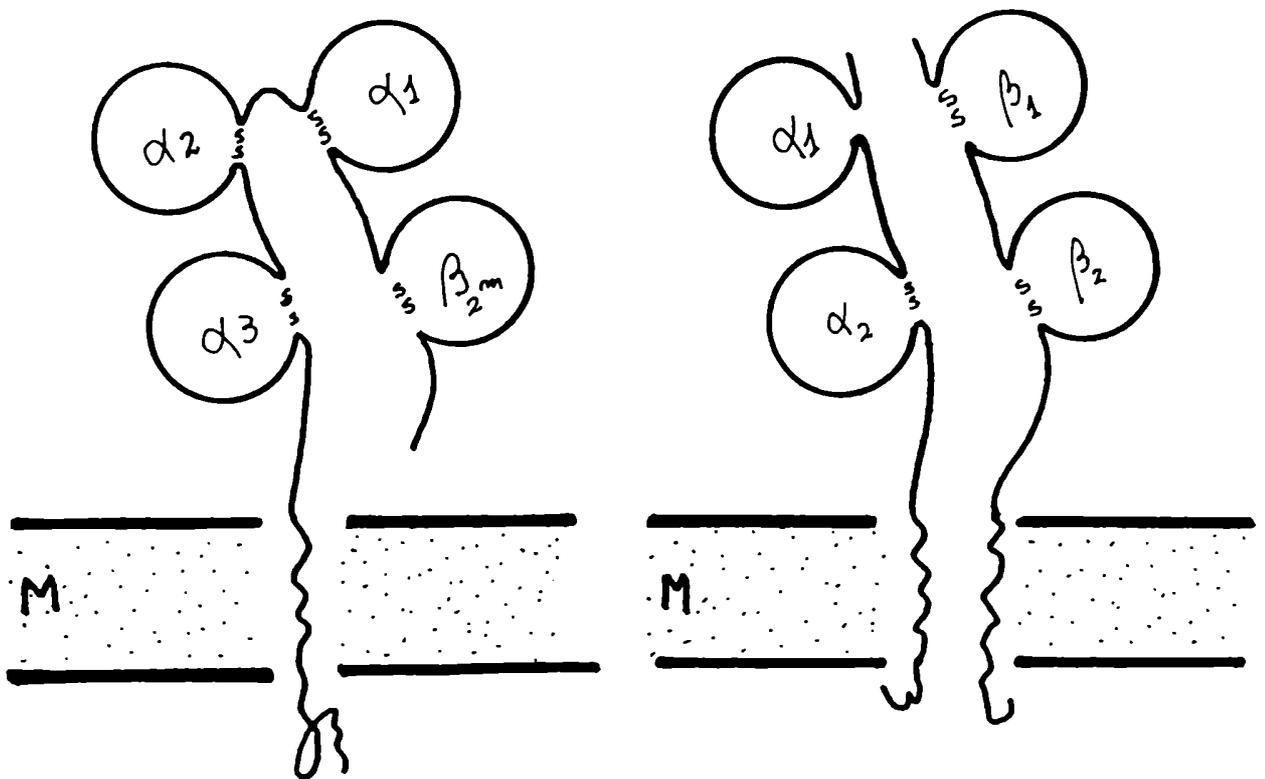


Figura 2 : Modelo de la expresión en la membrana plasmática de los antígenos de clase I y II. Se puede observar las relaciones entre las cadenas α/β y la β_2 microglobulina (β_{2m}).

molécula de 2-microglobulina, polipéptido codificado en el cromosoma 2 del ratón (Fig.2).

Estos antígenos se encuentran expresados en todas las células nucleadas del ratón, siendo su expresión diez veces mayor en los tejidos linfoides (8).

Funcionalmente, estas moléculas proveen contexto para el reconocimiento de antígenos por los linfocitos T citotóxicos (4), por lo que están relacionados principalmente con el reconocimiento de antígenos integrados a la membrana celular, como antígenos virales, células modificadas químicamente y células que expresan en su superficie antígenos de histocompatibilidad no propios (reacciones de rechazo de tejidos alogeneicos).

Otros genes pertenecientes a la región I localizados en el extremo derecho del CMH, llamados Qa y Tla, codifican para antígenos de la superficie celular que están estructuralmente relacionados con los antígenos K y D, pero su función es aún discutida y su distribución celular diferente. Algunos de los genes Tla codifican para antígenos que únicamente se expresan en timocitos, en estadios tempranos de su diferenciación, y en células leucémicas (9). Los antígenos Qa se encuentran expresados en linfocitos T y B. En cuanto a sus funciones, resultan aún oscuras. Algunos autores suponen, dada su distribución celular y ontogenética, que los antígenos Tla serían antígenos de diferenciación de las células hematopoyéticas (5), mientras que otros autores postulan funciones relacionadas con los antígenos de clase I clásicos, aunque

de menor importancia dada su menor expresividad (6).

1.3. Antígenos de clase II.

Los antígenos de clase II o antígenos Ia están codificados en la región I del H-2, que ha sido subdividida por análisis recombinacional en cinco sub-regiones: A, B, J, E y C (10). Las sub-regiones I-A e I-E codifican para antígenos de clase II que han sido bien caracterizados y a los que nos referiremos primero. Estos polipéptidos están constituidos por dos cadenas polipeptídicas (α y β), de peso molecular 34.000 y 28.000, de 230 y 220 aminoácidos respectivamente (Fig.3).

Los antígenos I-A están formados por dos moléculas, A_α y A_β , cuyos genes mapean en la sub-región I-A. Las moléculas I-E, en cambio, constan de un polipéptido E codificado en la sub-región I-E y de un polipéptido E codificado en la sub-región I-A, en un loci adyacente al A (11). Los antígenos I-E no se expresan en algunos haplotipos, o bien por que en los animales de dicho haplotipo no se sintetiza ni E_α ni E_β (haplotipos f y q), o bien porque no se sintetiza E_α , quedando E_β en el citoplasma celular (haplotipos b y s)(12). En individuos híbridos F1, estas características de la expresión y la conformación polipeptídica de estos antígenos origina mayores grados de diversidad, ya que se puede encontrar en

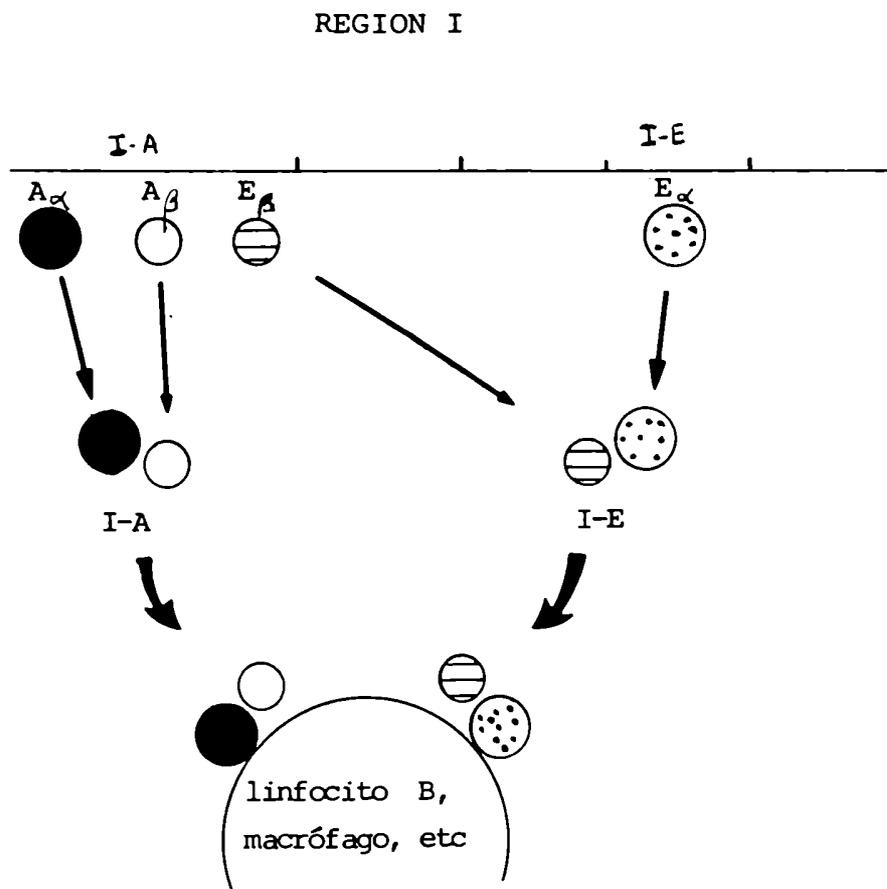


Figura 3 : Modelo de la organización genética y la expresión en la membrana plasmática de los antígenos I-A e I-E.

la superficie celular polipéptidos derivados de las combinaciones entre las cadenas paternas y maternas (10,13).

Los antígenos I-A e I-E se encuentran expresados principalmente en células del linaje B y monocítico, aunque no todas las células de estos linajes los expresan en cantidades apreciables (10).

Los antígenos Ia sirven como elementos de restricción que permiten a las células T reguladoras (colaboradoras, supresoras) reconocer al antígeno en el contexto de lo propio, regulando la respuesta inmune mediada por anticuerpos, así como las reacciones de hipersensibilidad retardada y la citotoxicidad T. Estos antígenos son responsables de la activación linfocitaria en las reacciones de cultivo mixto alogeneico (14) y singeneico (15).

Algunos autores postulan que la sub-región I-J del H-2 codificaría para polipéptidos que constituyen sub-unidades de los factores secretados por las células T supresoras (16-17). Klein y col. (18) proponen en cambio, que el locus I-J no existiría como tal, y que los determinantes antigénicos denominados J que caracterizan a los factores supresores provendrían de la asociación entre las cadenas antígeno específica y la cadena E β de los factores supresores T.

Las sub-regiones I-B e I-C han sido definidas

Únicamente en base a su capacidad de modular ciertas respuestas inmunes y su existencia es discutida por algunos autores (5-6,16).

Existen muchos puntos de similitud estructural entre los genes que codifican para los antígenos de clase I, clase II, la microglobulina y los genes que codifican para las inmunoglobulinas. Desde el punto de vista del análisis genético, desarrollado en los últimos años mediante enzimas de restricción y técnicas de hibridación, se ha determinado que en todos estos genes existe una precisa correlación entre la compartimentalización de los mismos en exones y los dominios que éstos codifican (5). La conformación espacial y la longitud de los dominios externos de la membrana plasmática (todos ellos de 90 aminoácidos), determinados probablemente por la ubicación de las uniones disulfuro a través de las cisteínas correspondientes, es similar en estas glicoproteínas. A partir de estos datos se ha desarrollado la hipótesis de un origen común para estos genes (5,19). Se ha postulado que el antígeno Thy-1, que presenta también cierta similitud en sus dominios externos, pertenecería a este grupo compartiendo un antecesor común (19). Otros investigadores, en cambio, argumentan a favor de la hipótesis de la convergencia para justificar esta similitud estructural (5).

1.4. Polimorfismo.

Una característica remarcable de los sistemas genéticos que intervienen en el reconocimiento de lo propio-no propio descritos en los invertebrados y vertebrados, es su alto grado de polimorfismo (4,5,20).

En el ratón los loci K y D poseerían más de 50 alelos estables cada uno (21). Existen muy pocos loci genéticos que exhiban tal grado de polimorfismo y, además, los loci polimórficos tienen en general un alelo predominante, que se expresa con frecuencias altas, del orden por ejemplo del 30%. Cuando se estudió la expresión fenotípica de diferentes loci del H-2 en poblaciones silvestres, se observó que el alelo más frecuente de un locus de clase I se expresaba solamente en el 12% de los animales, mientras que la mayoría de los alelos se encontraba con frecuencias del orden del 2% o menores (22-23). Además, en las poblaciones naturales de ratones se observan fluctuaciones locales importantes, expresándose en cada segmento poblacional local solamente unos pocos alelos predominantes. El hecho de que el polimorfismo genético se mantenga en forma estable a pesar de las fluctuaciones locales sugiere la existencia de una fuerte presión de selección hacia el mantenimiento de la diversidad (20).

2.RECONOCIMIENTO DE LO PROPIO.I.LA RESTRICCIÓN T.

2.1.Restrictión de la respuesta inmune por el CMH

El descubrimiento del CMH se relaciona con su intervención en el rechazo de trasplantes de órganos y tejidos. Gorer, en 1938 (24) pudo demostrar que el rechazo de un trasplante se debía a la presencia en el mismo de antígenos, que él denominaba factores isoantigénicos, los que, al estar presentes en el injerto y ausentes en el huésped, desencadenaban en éste una respuesta capaz de determinar la destrucción del injerto.

Muy pronto estos conceptos alcanzaron gran generalización, describiéndose en muchos vertebrados, incluyendo el hombre, una serie de antígenos que intervienen en el rechazo de tejidos, a los que se denominó antígenos mayores de histocompatibilidad (AMH) y a los genes que codifican para los mismos, genes de histocompatibilidad y luego CMH.

Posteriormente se comenzaron a describir numerosas funciones en las que intervenían estos genes, que, por su diversidad, conformaban un cuadro confuso.

El descubrimiento de la restricción de la respuesta inmune por el CMH permitió comenzar a comprender la interrelación de muchas de las funciones en que

intervienen estos genes, y determinò la formulaciòn de nuevas teorías para la interpretaciòn de muchos de los fenómenos inmunològicos.

En los vertebrados, la generaciòn de una respuesta inmune frente a un antígeno incluye la actividad coordinada de diversas células del sistema inmune. En la mayoría de los casos, es necesario que el antígeno sea procesado por los macrófagos u otras células presentadoras de antígenos y que éstos lo presenten a las células T colaboradoras en su superficie celular. Los linfocitos B productores de anticuerpos o los linfocitos T citotòxicos tienen a su cargo la actividad efectora directa, pero para que esta funciòn alcance niveles adecuados, es necesario que las células T colaboradoras interactúen con las células B o T citotòxicas, dando una señal amplificadora. La regulaciòn negativa de las respuestas inmunes està mediada por la interacciòn entre los linfocitos T supresores y las células T colaboradoras. Para que cualquiera de estas interacciones tenga lugar es necesario que los linfocitos T, a través de los receptores correspondientes, reconozcan con baja afinidad a los AMH expresados en la superficie de las células del sistema inmune. Este requerimiento de reconocimiento de los AMH por los linfocitos T se denomina restricciòn de la respuesta inmune por el CMH (Fig.4y5).

El fenómeno de la restricciòn fuè descubierto a partir de la comprobaciòn de la falta de efectividad de las respuestas inmunes cuando las células interactuantes no

comparten los AMH, lo que determinò que inicialmente se definiera la restricciòn T como el requerimiento de coincidencia en los AMH entre las cèlulas que colaboran para la generaciòn de una respuesta inmune. Posteriormente se pudo determinar que las cèlulas T pueden interactuar en forma colaborativa con otras cèlulas aún cuando no compartan los AMH con las mismas, pero siempre que durante su maduraciòn hayan estado en contacto con cèlulas tímicas que expresen esos AMH en la superficie celular. Describiremos brevemente los principales resultados experimentales que llevaron a formular los conceptos actuales en este àrea.

Las primeras demostraciones del requerimiento de precisas interacciones celulares para la generaciòn de respuestas inmunes fueron las presentadas por Claman y col. (25) y por Miller y Mitchel (27-28), quienes estudiaron las condiciones en que se podía reconstituir la capacidad de respuesta de síntesis de anticuerpos frente a un antígeno en animales letalmente irradiados o timectomizados. Estos investigadores pudieron comprobar que la transferencia de cèlulas esplènicas a dichos ratones, era capaz de reconstituir una respuesta adecuada, mientras que ello no era posible a través de la transferencia de cèlulas tímicas o de médula òsea separadamente. Sin embargo, el trasplante conjunto de cèlulas de estos òrganos, determinaba la apariciòn de la capacidad de sintetizar anticuerpos específicos. Estos autores sugirieron que las cèlulas de

médula ósea podrían ser precursoras de las células productoras de anticuerpos y que las células linfoides emergentes del timo cumplirían funciones auxiliares, cooperando ambas en forma sinérgica para producir una respuesta frente al antígeno. Posteriormente, Katz y col. (28-29) demostraron que la activación de las células B requería, además del encuentro con el antígeno, de la interacción de las células T colaboradoras con los antígenos MHC propios expresados por los linfocitos B. Los mismos autores demostraron (29) que en este tipo de interacción se requería la identidad de la región I del CMH. Paralelamente, Rosenthal y Sevach (30), trabajando con cobayos, presentaron evidencias que sugerían que para obtener una respuesta proliferativa normal *in vitro* de linfocitos T purificados derivados de animales inmunizados, era necesario enfrentarlos con el antígeno en presencia de células accesorias (macrófagos) y que éstas derivaran de animales portadores del mismo H-2 que los linfocitos inmunes. Al bloquear la interacción entre las células T y las células accesorias con un antisuero anti-CMH, pudieron demostrar formalmente la participación de los productos génicos del CMH expresados en la superficie celular en estas interacciones (31).

Finalmente, fueron Zinkernagel y col. (1,32-33) quienes, estudiando las respuestas citotóxicas frente a infecciones virales, demostraron que la actividad citotóxica de las células T contra células infectadas por

el virus de la coriomeningitis murina estaba restringida por los antígenos codificados por las regiones K y D del CMH. Independientemente, Shreiner y col (34) demostraron que las células citotóxicas dirigidas contra células modificadas químicamente con trinitrofenoles, estaban también restringidas por el CMH. Fue claramente establecido que las células citotóxicas poseían especificidad tanto para el antígeno extraño como para el antígeno de histocompatibilidad propio expresado en la superficie celular. En efecto, cuando ratones de diferentes haplotipos eran infectados con virus, y luego se determinaba su capacidad citotóxica sobre fibroblastos de un determinado H-2, se verificaba que la lisis era llevada a cabo únicamente por aquellos linfocitos que compartían el H-2 con las células infectadas. Estos hallazgos se generalizaron rápidamente, determinándose que las respuestas citotóxicas frente a diversos virus (35-37), frente a distintos haptenes (38-39) y también frente a células que diferían en antígenos menores de histocompatibilidad y contra el antígeno H-Y del macho (40-42) estaban restringidas por el CMH.

2.2. Estructuras interactuantes en la restricción T.

Se plantearon en ese momento dos modelos de interacción celular que podían determinar el fenómeno de la

restricción de la respuesta inmune: las estructuras interactuantes podían ser dos estructuras iguales, es decir que la restricción ocurriera directamente por la interacción de los AMH expresados en la superficie de las células correspondientes; o bien que la restricción ocurriera a través de la interacción entre un receptor y un ligando. Cuando se demostró (43) que en un F1(AxB), las células T respondedoras frente a un antígeno podían ser separadas en dos subpoblaciones, una que respondía al antígeno presentado por células del haplotipo materno y otra que lo hacía en el contexto paterno, se interpretó que este resultado indicaría la existencia de una relación ligando-receptor entre las células interactuantes, ya que las células T demostraban ser portadoras de estructuras alélicamente excluidas que, de acuerdo a los postulados de Burnet, deberían ser receptores y no AMH. Esta hipótesis fue luego confirmada experimentalmente por distintos autores (44-45). Swierkiosz y col. (45), por ejemplo, cultivaron células T de un F1(AxB) sobre monocapas de macrófagos de la cepa A a los que se había acoplado un antígeno. Estudiaron entonces la capacidad de las células T que quedaron adheridas a la monocapa de colaborar con linfocitos B inmunes de cada una de las cepas parentales. Comprobaron que estas células T preseleccionadas estaban marcadamente enriquecidas en su capacidad de colaborar con linfocitos B de la cepa a la cual pertenecían los macrófagos utilizados en la preselección.

El concepto de que la restricción de la respuesta inmune incluye la interacción entre un receptor en los linfocitos T y ligando (AMH) en las células auxiliares o las células efectoras correspondientes fué ampliamente aceptado, aún cuando la elucidación de la estructura química y la ubicación de los genes que codifican para el receptor T resultó sumamente difícil y sólo está siendo completada actualmente con el uso de las más complejas técnicas de la biología molecular (46).

2.3. Modelos de restricción T.

Se han elaborado diversas hipótesis que intentan explicar la restricción de las interacciones celulares por el CMH. Una de ellas, la hipótesis del reconocimiento dual, que surgió del análisis de la restricción en la interacción T-B, postula que los linfocitos T poseerían dos tipos de receptores, uno con especificidad para el reconocimiento de los antígenos de histocompatibilidad propios otro que permitiría el reconocimiento del antígeno convencional (47). Esta hipótesis, por lo tanto propone que una célula T colaboradora poseería un receptor para el reconocimiento de los AMH propios expresados, por ejemplo, en los linfocitos B, y otro receptor que reconoce al carrier del antígeno.

La segunda hipótesis, denominada "hipótesis de la modificación de lo propio" (48), elaborada principalmente a través del estudio de la actividad del sistema T citotóxico, propone que los linfocitos T poseen en su superficie celular un solo tipo de receptor, capaz de reconocer a los complejos antigénicos formados en la membrana celular por la asociación entre un antígeno convencional y los AMH propios. Es decir que en la membrana celular se formarían neoantígenos por la asociación de los antígenos convencionales con los AMH y que éstos serían las estructuras reconocidas por el receptor T.

Estas hipótesis han sido discutidas y puestas a prueba en diferentes sistemas experimentales aunque no se han ofrecido hasta ahora pruebas definitivas que establezcan la validez de una u otra postulación.

2.4. Rol del timo en el aprendizaje de la discriminación propio-no propio.

Los experimentos con quimeras desarrollados por Zinkernagel y col. (47,49) y Bevan y col. (50-51) permitieron comprender mejor el fenómeno de la restricción de la respuesta inmune. Una quimera, o un animal quimérico, es un individuo en el cual coexisten células de orígenes diferentes. Para desarrollar estos trabajos se utilizaron

dos tipos de quimeras: las quimeras por irradiación y las quimeras tímicas. En el primer caso se irradia a los huéspedes y se los reconstituye con médula ósea proveniente de animales de otro H-2. Las quimeras tímicas se logran por irradiación y timectomía; luego se injerta epitelio tímico de animales de otro H-2 y se repuebla con médula ósea del H-2 original del huésped, lográndose así quimeras en las que el epitelio tímico no comparte los AMH con el resto de las células del individuo.

Los experimentos desarrollados en quimeras por irradiación indicaron que, de alguna manera no conocida, los AMH expresados en ciertas células radioresistentes del huésped, determinaban la especificidad de la restricción de las células T que maduraran en el mismo. Cuando se estudió la respuesta inmune de quimeras (AxB)→A es decir, huéspedes A irradiados y reconstituidos con médula ósea de animales (AxB), se observó que únicamente se podían obtener respuestas T citotóxicas frente a células del haplotipo A portadoras del antígeno.

Por otra parte, cuando se estudiaron animales A timectomizados e irradiados, reconstituidos con médula ósea y timo (AxB), se obtuvieron respuestas citotóxicas frente a células blanco de los haplotipos A y B. Es decir, la porción radioresistente del epitelio tímico sería la que determinaría la especificidad de la restricción de las células T maduras. Además, linfocitos T

de quimeras por irradiación A→(AxB) fueron capaces de producir lisis específica de células blanco de los haplotipos A y B, indicando que la capacidad de reconocer un H-2 como propio es independiente de los AMH expresados por las células T.

Estos trabajos permitieron definir el rol del timo en lo que se llamó el **aprendizaje de lo propio**, es decir, en la determinación de la especificidad en el reconocimiento de los AMH propios, indicando que la capacidad interactiva de los linfocitos T poseería cierta plasticidad, pudiendo ser modificada por el entorno en el que éstos se hubieran diferenciado, fenómeno que se denominó diferenciación adaptativa (52). Actualmente se supone (53) que el repertorio de los receptores de los linfocitos T emergentes de la médula ósea posee especificidades que abarcan el reconocimiento de cualquier AMH de la especie. En el timo, por procesos de selección negativa o positiva, se expandirían preferencialmente los clones con receptores con baja afinidad hacia los AMH propios expresados en el epitelio tímico, por lo cual la mayoría de los linfocitos T poseerá receptores capaces de reconocer con baja afinidad los AMH propios. La colaboración entre las diversas células del sistema inmune tiene como requisito la interacción entre estos receptores T con baja afinidad y los AMH propios expresados en las células correspondientes, es decir, está restringida por los AMH.

Algunos datos experimentales sugieren la existencia de procesos extra-tímicos (interacción post-tímica con células linfohematopoyéticas) (54), que también influirían en la determinación de la restricción y formarían parte de los procesos de maduración de las células T. Finalmente, datos experimentales muy recientes sugieren que en la médula ósea ocurrirían también procesos de maduración que determinarían la especificidad de los receptores para el reconocimiento de los AMH propios antes del pasaje de las células T por el timo (55).

En resumen, a través de numerosos trabajos realizados en los años 70 se demostró la existencia de interacciones celulares del tipo ligando-receptor entre los linfocitos T colaboradores y las células E, los linfocitos T citotóxicos y las células blanco, los linfocitos T colaboradores las células accesorias presentadoras de antígenos, todas ellas restringidas por los antígenos de clase I ó II del CMH. Estas interacciones restringidas implican el reconocimiento de los antígenos de histocompatibilidad propios por los linfocitos T, capacidad que sería adquirida principalmente en el timo y parcialmente en la periferia, independientemente del H-2 de las células e independientemente también de la adquisición de especificidad para un antígeno convencional.

2.5. Genes de respuesta inmune.

Los genes de clase II del CMH que codifican para los antígenos Ia fueron descubiertos por McDevitt y col (56) cuando intentaba mapear el locus que determinaba en distintas cepas de ratones, altas y bajas respuestas frente a ciertos polipéptidos. Pero durante mucho tiempo se consideró que existían genes, denominados Ir, que regulaban la respuesta inmune y que estaban ligados al CMH, aunque no pertenecían al mismo. Actualmente se ha establecido (48,57-58) que los genes de respuesta inmune SON los genes de clase II del CMH que codifican para los antígenos Ia. En la actualidad, por lo tanto, se acepta que los distintos alelos de los genes Ia determinan la alta o baja respuesta frente a cada antígeno, aunque solamente existen postulaciones acerca de los mecanismos que determinan esta regulación.

Las hipótesis que intentan explicar estos mecanismos pueden reunirse en dos grandes grupos. La hipótesis de la selección determinante (59-60), propone que los antígenos convencionales se asocian, en la membrana celular de los macrófagos o células presentadoras de antígenos, con los AMH propios, formando complejos (neoantígenos) que serán reconocidos por el receptor del linfocito T. En los animales no respondedores a un cierto antígeno, la asociación de éste con los AMH propios no

ocurriría o bien ocurriría con muy baja eficiencia, por lo que el reconocimiento por el receptor T no podría producirse, aún cuando este receptor estuviera presente en el repertorio T del organismo.

La segunda hipótesis, llamada de la delección clonal, propone que el repertorio de los receptores T estaría incompleto, con diferentes "huecos" para cada haplotipo (61-63). La ausencia o la falta de funcionalidad de ciertos receptores T en una cepa dada determinaría que la misma manifieste baja respuesta para ciertos antígenos convencionales.

Esta hipótesis tiene en cuenta que algunos receptores T dirigidos hacia antígenos convencionales vistos en el contexto de los AMH propios, es decir dirigidos hacia los antígenos convencionales expresados en la membrana celular en asociación con los AMH propios, pueden tener reactividad cruzada con ciertos antígenos propios. Como estos antígenos propios también se expresarían en la membrana celular en asociación con los AMH propios, en cada cepa serían diferentes los receptores T con reactividad cruzada hacia los antígenos propios. Los "huecos" en el repertorio se producirían por selección somática, positiva o negativa según diferentes autores, que determinaría la no expresión de aquellos receptores con reactividad frente a lo propio, evitando así la aparición de fenómenos de autoreactividad patológicos. Esto determinaría que cada cepa tenga diferentes "huecos" en su repertorio T, y, por lo tanto, baja respuesta frente a

diferentes antígenos.

Estas dos hipótesis son actualmente objeto de investigación sin que ninguna de ellas haya sido probada o descartada en forma definitiva.

3. ENSAYOS EXPERIMENTALES PARA LA DETERMINACION DE LOS NIVELES NORMALES DE RECONOCIMIENTO DE LOS AMH PROPIOS

3.1. Cultivo mixto de linfocitos singeneico.

Se denomina cultivo mixto de linfocitos singeneico (CMLS) a la proliferación in vitro de linfocitos T estimulados por células autólogas o singeneicas. Este tipo de proliferación ha sido descrito en diversas especies (hombre, ratón, conejo, cobayo), exhibiendo características que permiten encuadrarla como una respuesta inmune, ya que posee memoria y especificidad (64).

El CMLS se desarrolla generalmente enfrentando una población linfoide T respondedora y una población estimuladora singeneica o autóloga pretratada con mitomicina-C o irradiada para evitar su proliferación (Fig.6).

La mayoría de los autores acepta actualmente (65-67) que la presencia de antígenos Ia caracteriza a la población estimuladora y que la respuesta proliferativa sería una respuesta a la estimulación determinada por los antígenos Ia propios sobre la población respondedora. En efecto, se ha demostrado que sueros anti-Ia bloquean la reacción de CMLS (65-69). Recientemente se ha sugerido que los antígenos K y D podrían también intervenir en la

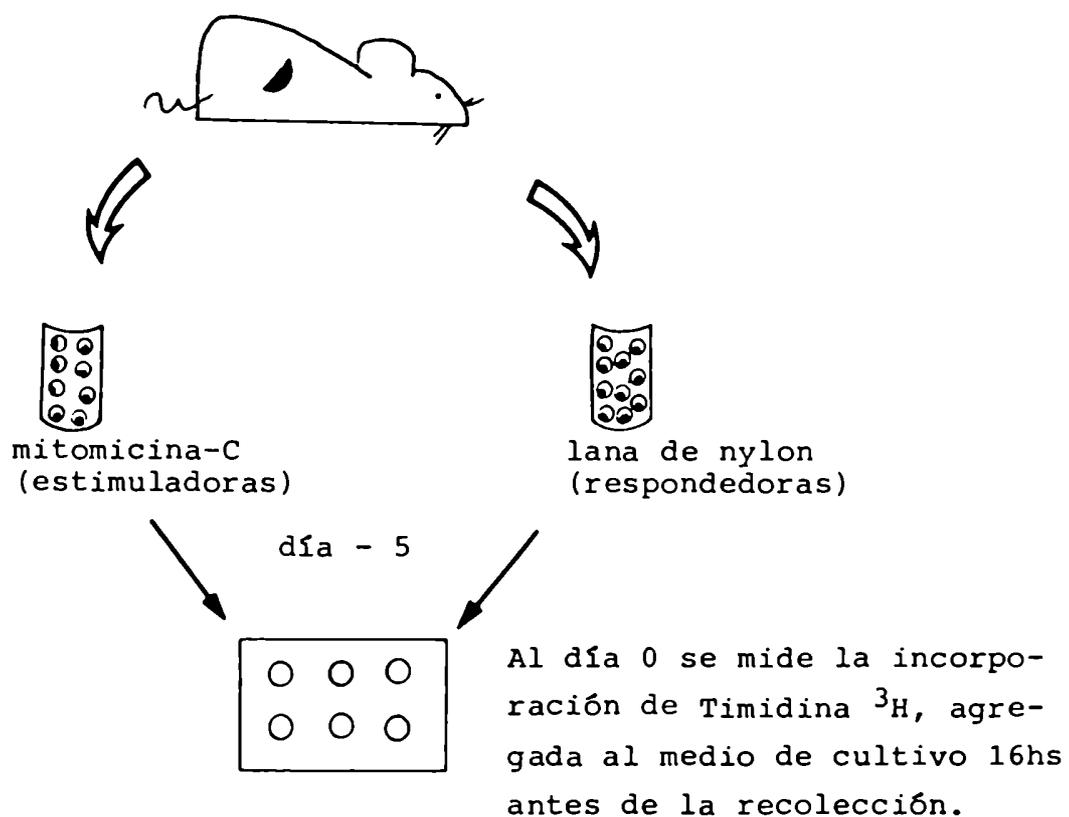


Figura 6: ensayo de CMLS. Se determina la proliferación de células T autólogas o singeneicas estimuladas por poblaciones esplénicas totales.

activación de los linfocitos T en las reacciones de CMLS (69).

Las células B, los macrófagos y las células dendríticas son portadores de antígenos Ia, y se supone que éstas últimas serían las principales estimuladoras de la proliferación de células autólogas in vitro (70).

Sin embargo, se ha postulado (71-72) que la reacción de CLMS se debería a la proliferación linfocitaria determinada por la presencia en el medio de cultivo de determinantes antigénicos heterólogos, fundamentalmente los presentes en el suero bovino fetal (SBF) utilizado normalmente en los cultivos. Esta postura es discutida por los autores de trabajos en los que se demuestra la proliferación de células autólogas o singeneicas en ausencia de SBF, utilizando suero de ratón singeneico para complementar el medio de cultivo (68-69,73).

Las células respondedoras del CMLS, como ha sido demostrado en estudios con anticuerpos monoclonales, corresponden a una población T, Lyt-1⁺ (74).

El significado biológico de esta proliferación autorreactiva es actualmente tema de intenso análisis. Se ha determinado que la respuesta T frente a antígenos convencionales in vitro requiere la intervención de células T autorreactivas, ya que la eliminación de estas células autorreactivas por exposición a bromodeoxiuridina y luz, determina la abrogación de la respuesta inmune, tanto

primaria cuanto secundaria, frente a distintos antígenos solubles (75-76). Algunos autores consideran, en atención a estos resultados, que el CMLS representa una activación policlonal de linfocitos T antígeno-específicos, portadores de receptores para antígenos Ia propios (76).

Rock y col. (77) y Zauderer y col. (78) han observado en animales inmunizados con antígenos proteicos, un incremento en la proporción de células T autorreactivas. Células primadas por un antígeno convencional pueden ser secundariamente activadas, en ausencia de dicho antígeno, por los antígenos I-A propios, aunque la respuesta es mayor en presencia del antígeno convencional. Se ha postulado así que estas células, inducidas durante una respuesta inmune, podrían proliferar frente a antígenos autólogos de una manera inespecífica respecto del antígeno inmunizante. Más aún, se han podido recuperar células T autorreactivas después de una inmunización in vivo y posterior reestimulación con células accesorias singeneicas. Estas células T presentaban actividad colaboradora inespecífica, facilitando la proliferación y producción de anticuerpos de células B antígeno-específicas.

Se han descrito además otras funcionalidades en las células estimuladas en un CMLS. Diversos autores han descrito la capacidad de linfocitos T humanos activados en CMLS de suprimir reacciones mediadas por linfocitos T y B (79-82). Smith y Knowlton (79) determinaron que la

eliminación por exposición a bromodeoxyuridina y luz de la población respondedora frente a concanavalina-A, determina también la eliminación de las células respondedoras del CMLS. Coincidentemente, Sanake y Green (80) demostraron, utilizando la misma técnica, que la eliminación de las células autorreactivas elimina también una sub-población de células supresoras que resulta activada por exposición a concanavalina-A.

En el ratón también ha sido descrita la capacidad supresora de células activadas en CMLS sobre reacciones T citotóxicas y respuestas B in vitro (82-83). La actividad de estas células supresoras estaría restringida por la región I-A del CMH (83). No se han detectado antígenos I-J en la superficie de estas células. Los autores de estos trabajos postulan que las mismas podrían no ser supresoras directas sino que, dado su fenotipo, podrían identificarse como células colaboradoras que inducirían la activación de los sistemas supresores.

En síntesis, el cultivo de linfocitos T con células no-T autólogas o singeneicas determina la proliferación de células T colaboradoras y supresoras, así como la secreción de factores inmunorregulatorios (85). Las células T así activadas participan en las respuestas inmunes frente a antígenos convencionales.

El CMLS de células de animales con

predisposición para contraer enfermedades autoinmunes (BxSB, MRL, NZB) es deficiente (85-86). En el hombre, se observa una disminución en el CMLS (autólogo), en las enfermedades asociadas a desórdenes autoinmunes, como lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren's, mononucleosis infecciosa y artritis reumatoidea (85). Más aún, 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 CMH propios (87).

A pesar de la subsistencia de numerosos interrogantes, estos datos experimentales permiten suponer que las células T autorreactivas que proliferan en el CMLS participarían in vivo en los circuitos regulatorios que operan en las respuestas inmunes normales.

3.2. Reacciones de injerto contra huésped singéneo.

La proliferación de linfocitos T inducida por células singéneas o autólogas normales ha sido descrita también en ensayos in vivo. La inoculación de linfocitos en la almohadilla plantar de huéspedes singéneos induce un pequeño pero significativo aumento de peso del nódulo linfático que drena dicha región. Esta reacción ha sido denominada reacción de injerto contra huésped singéneo (GvH singéneo).

Se han descrito diversas situaciones

experimentales o naturales que determinan el aumento de esta forma de reactividad frente a lo propio. Carnaud y col. (88) y Small y col. (89) observaron que la inoculación de esplenocitos provenientes de animales timectomizados determinaba mayores aumentos de peso en los nódulos linfáticos regionales. El pretratamiento de los huéspedes o de los animales dadores del injerto con ciclofosfamida determina importantes aumentos en las reacciones de GvH singeneico (90). Otros autores compararon la capacidad de inducir GvH singeneico de esplenocitos de animales jóvenes y adultos envejecidos, encontrando que únicamente éstos últimos determinaban reacciones de GvH singeneico detectables (91). El pretratamiento del injerto con suero anti- θ y complemento, ensayada en los dos últimos casos, eliminò la capacidad de las células esplénicas de determinar estas reacciones.

Tanto el envejecimiento, como el tratamiento con ciclofosfamida han sido relacionados con la aparición de síntomas autoinmunes. En el primer caso (92), estos síntomas se presentarían por disfunción de los mecanismos de regulación y en el segundo caso por eliminación de ciertas subpoblaciones celulares, probablemente supresoras, que se hallarían en activa división (93).

4. RESPUESTA FRENTE A ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD NO PROPIOS

4.1. Alorreactividad T.

Se denomina alorreactividad T a la respuesta inmune desarrollada por los linfocitos T hacia los AMH no propios.

Los linfocitos T alorreactivos poseen receptores que reconocen a los diferentes antígenos de histocompatibilidad de la especie, es decir a los diferentes alelos de los loci del CMH.

En cada individuo, las poblaciones de linfocitos T que reaccionan frente a cada haplotipo no propio son poblaciones separadas, es decir, no existirían superposiciones importantes entre ellas (94-95).

Los linfocitos T alorreactivos poseen ciertas características que los diferencian de las poblaciones de linfocitos T que responden frente a antígenos convencionales .

En primer lugar, la frecuencia de los linfocitos T alorreactivos que responden frente a cada haplotipo no propio es muy alta, ya que del 3 al 6% de los linfocitos T del individuo presenta reactividad contra cada haplotipo no propio, resultando así su frecuencia de

cien a mil veces superior a la frecuencia de células T con especificidad para un determinado antígeno convencional (96-98). Esta frecuencia extremadamente alta de los linfocitos T alorreactivos determina, como fuera sugerido muy tempranamente por Simonsen (99), la alta inmunogenicidad de los antígenos de histocompatibilidad.

Otra característica exclusiva de esta población linfoidea es la ausencia de modificaciones en la frecuencia de linfocitos reactivos a un haplotipo dado por inmunización in vivo con los correspondientes antígenos de histocompatibilidad no propios (99-100).

Estas observaciones llevaron a la suposición de que prácticamente todas las células T poseerían receptores con especificidad hacia un antígeno de histocompatibilidad alogeneico. Es decir, se propuso que las poblaciones T alorreactivas y las reactivas hacia antígenos convencionales estarían superpuestas.

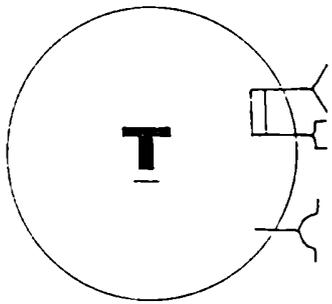
En base a esta hipótesis se elaboraron distintos modelos que proponen que las células T poseerían dos receptores separados, uno con especificidad hacia un antígeno convencional y otro con especificidad hacia un aloantígeno (101); o bien que las células T poseerían receptores con reactividad tanto hacia un aloantígeno como hacia el antígeno convencional visto en el contexto de los antígenos de histocompatibilidad propios. Es decir que un mismo receptor tendría afinidad hacia un aloantígeno y

hacia un antígeno convencional (102-103) (Fig. 7).

La hipótesis de la superposición entre las poblaciones T alorreactivas y aquellas reactivas frente a antígenos convencionales en el contexto de los antígenos de histocompatibilidad propios fue objeto de intenso análisis, debido a las importantes implicancias teóricas que derivan de la misma. Wilson y col (104), utilizando poblaciones de linfocitos T de rata enriquecidos en su reactividad hacia un cierto haplotipo no propio, determinaron que las mismas poseían también actividad T colaboradora con especificidad hacia glóbulos rojos de carnero (GRC), y que este nivel de actividad era comparable con el de una población normal, no preseleccionada.

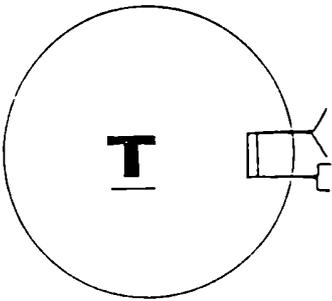
Otros autores estudiaron la capacidad alorreactiva de células citotóxicas específicas para un virus (provenientes de animales inmunizados con dicho virus), observando que también poseían capacidad citotóxica frente a células alogeneicas normales, no infectadas por el virus, y de diferentes haplotipos (105,106).

En nuestro laboratorio se pudo demostrar (107) que durante el curso de una inmunización con un antígeno convencional (GRC) y como consecuencia de la proliferación de los linfocitos reactivos a dicho antígeno, se producían modificaciones (aumentos) de los niveles de alorreactividad. Además, en estos animales inmunizados a repetición con GRC, se pudo detectar la presencia de



anti- AMH propio
anti- antígeno convencional

anti-AMH no propios.



Un mismo receptor T poseería reactividad frente a un antígeno convencional y los AMH propios, y frente a un AMH no propio.

Figura 7 : modelos que explican la superposición entre las poblaciones T alorreactivas y las reactivas frente a antígenos convencionales. Ambos modelos están elaborados en base a la suposición de que el receptor T reconoce separadamente a los AMH propios y a los antígenos convencionales.

anticuerpos antiidiotípicos con especificidad hacia los receptores alorreactivos propios, anticuerpos que probablemente intervinieran en la regulación de los aumentos alorreactivos observados en etapas posteriores.

Estudios de reclonado extensivo de células específicas para haptenes sugieren fuertemente que un mismo clon de células T podría proliferar in vitro tanto frente a un antígeno convencional en el contexto de los AMH propios, cuanto frente a un AMH no propio (108-110).

Estos trabajos coinciden en la conclusión de que cada célula T poseería tanto receptores para antígenos convencionales cuanto receptores para AMH no propios, aunque no se ha demostrado aún si la capacidad de reconocer ambos tipos de antígenos deriva de la presencia de dos tipos de receptores en una misma célula, o de un receptor con reactividad cruzada para ambos.

4.2.Reacción de injerto contra huésped.

Cuando se injertan células linfoides T alogeneicas en un animal parcial o totalmente inmunoincompetente, las células injertadas desarrollan una respuesta inmune frente al huésped denominada reacción de injerto contra huésped (GvH). Esta reacción se debe a la estimulación de los linfocitos T del injerto por los aloantígenos del huésped; la inmunoincompetencia del mismo

determina su falta de respuesta y permite la producción de daño sobre los tejidos -principalmente linfomiéloides- por parte del injerto (111).

Este tipo de reacciones ocurre en forma característica durante los trasplantes humanos de médula ósea. En este caso, los pacientes deben ser inmunosuprimidos para evitar el rechazo de la médula alogéneica que puede diferir del huésped en alguno de sus antígenos de histocompatibilidad. Las reacciones de GvH se producen debido a la presencia de células T en el material injertado.

Los procesos patológicos que derivan de la inoculación de células linfoides alogéneicas por vía sistémica se denominan enfermedad secundaria, e incluyen variados síntomas de supresión patológica, como pancitopenia acompañada de anemia aplástica e hipogamaglobulinemia (112-115). Estos síntomas caracterizan a la llamada enfermedad aguda de GvH. Otro resultado posible del injerto de linfocitos alogéneicos es el desarrollo de una enfermedad crónica de GvH, que incluye hiperplasia linfoide, hipergamaglobulinemia, y la aparición de autoanticuerpos y lesiones patológicas con reminiscencias de lupus eritematoso y otros tipos de colagenopatias (113-115).

Existen diferentes métodos experimentales para desencadenar reacciones de GvH, que permiten una buena

cuantificación de la alorreactividad T. En los mismos, la inmunoincompetencia de los huéspedes deriva de su pretratamiento con irradiación o drogas inmunosupresoras, de su inmadurez inmunológica por tratarse de huéspedes recién nacidos, o de su condición semihistocompatible con el injerto cuando se utilizan huéspedes F1 e injertos de células parentales.

Tanto la enfermedad de GvH crónica como la aguda pueden ser reproducidas experimentalmente injertando en forma e.v., por ejemplo, esplenocitos o linfocitos ganglionares parentales en huéspedes F1, siendo indispensable la presencia de linfocitos T en el injerto para desencadenar estos procesos patológicos. El tipo de enfermedad desarrollada parece relacionarse con la activación de diferentes sub-poblaciones de linfocitos T del injerto al encontrarse frente a los antígenos de histocompatibilidad del huésped. La activación de células T $\text{Lyt-1}^{+}, \text{2}^{-}$ (colaboradoras) desencadena una enfermedad de GvH crónica, mientras que la activación sucesiva de células $\text{Lyt-1}^{+}, \text{2}^{-}$ y, en una segunda etapa, la de células supresoras ($\text{Lyt}^{+} \text{2,3}$), determinaría las dos fases que caracterizan a la enfermedad aguda: una primera (corta) de activación y una segunda fase supresora en la cual las células efectoras parecen ser los linfocitos T alorreactivos del injerto (113-115). Además, se ha determinado (116) que diferencias en distintas regiones del H-2 entre dador y huésped se asocian con la aparición de uno u otro tipo de enfermedad.

Cuando las diferencias entre dador y huésped corresponden a los antígenos de clase II (diferencias en antígenos Ia), la reacción de GvH adquiere las características de una enfermedad estimuladora (GvH crónico), mientras que para desencadenar una reacción aguda deben existir diferencias en los antígenos de clase I (K o D), y en los de clase II o antígenos Ia simultáneamente. La existencia de diferencias en antígenos de clase I exclusivamente no es suficiente para determinar reacciones de GvH de cierta intensidad .

En las reacciones de GvH locales, determinadas por ejemplo por trasplantes de piel, se pone claramente de manifiesto la actividad citotóxica desarrollada por los linfocitos T alorreactivos del dador. Estas características de las reacciones de GvH se relacionan con las observadas en reacciones alorreactivas in vitro. Existen dos tipos de reacciones in vitro que reflejan la activación de distintas poblaciones de linfocitos T alorreactivos: el cultivo mixto de linfocitos alogeneico (CMLA) y las reacciones de citotoxicidad mediada por linfocitos T. El CMLA representa la rama aferente de la reacción, expresada fundamentalmente por la proliferación de linfocitos T colaboradores frente a los antígenos Ia no propios (111). Las reacciones de citotoxicidad permiten, en cambio, poner en evidencia la rama efectora de la reacción de los linfocitos T frente a los aloantígenos. Las células T citotóxicas responden primariamente frente a los antígenos K y D, es decir frente a los antígenos de clase I. Para que se desarrolle una

reacción citotóxica importante es necesaria también la activación de las células colaboradoras correspondientes (111), resultado que correlacionaría con la necesidad de diferencias en los antígenos de clase I y II para el desencadenamiento de una reacción de GvH sistèmica aguda.

Ford y Simonsen (117) desarrollaron un ensayo de tipo local para cuantificar los niveles de alorreactividad T. El mismo consiste en la inoculación de células inmunocompetentes de animales de una determinada cepa A en una de las almohadillas plantares de un híbrido F1 entre esa misma cepa y una segunda cepa B, al que llamaremos F1(AxB) (Fig.2). Este híbrido, como expresa tanto los antígenos de histocompatibilidad de tipo A como los B, no puede reconocer como extraños a los antígenos de histocompatibilidad del injerto B; en cambio, las células T del injerto reconocen como extraños a los antígenos de histocompatibilidad del huésped, desencadenándose una reacción local de GvH. Estas reacciones se pueden cuantificar determinando el aumento de peso de los gánglios poplíteos derecho e izquierdo, que drenan las almohadillas plantares respectivas. Se compara así el aumento de peso del ganglio poplíteo correspondiente a la almohadilla plantar inoculada con células alogeneicas y el contralateral no inoculado, o inoculado con células singeneicas al huésped (células del híbrido F1 en este caso). Una de las ventajas importantes de este método es

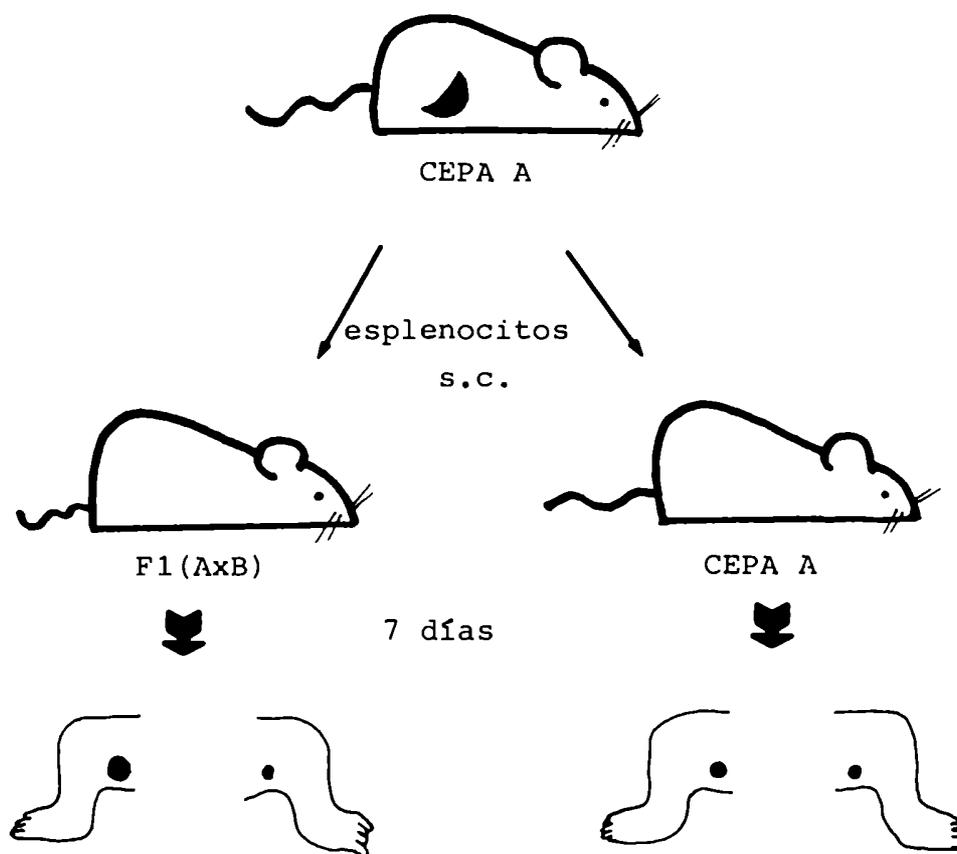


Figura 8 : Reacción local de GvH . Se inoculan esplenocitos de una de las cepas parentales en la almohadilla plantar de un F1. Siete días más tarde se determina el aumento de peso del ganglio drenante por comparación al contralateral no inoculado.

que no es necesario inmunosuprimir al huésped, pudiéndose determinar así los niveles normales de alorreactividad dador-huésped.

La intensidad de las reacciones de GvH depende de la disparidad entre los antígenos de histocompatibilidad del dador del receptor, pero se ha determinado que pequeñas diferencias en los AMH desencadenan en algunos casos grandes respuestas de GvH. En particular, se ha observado que las respuestas más fuertes son las determinadas por alelos del H-2 relacionados estrechamente entre sí, incluyendo a veces diferencias en solo un codón de un locus del CMH (118).

A pesar de que en las reacciones de GvH el fenómeno predominante es el ataque alorreactivo de los linfocitos T del injerto a un huésped que no puede responder al mismo, en ciertos casos se ha verificado la existencia de fenómenos de activación de células B del huésped, así como el desarrollo en éste de factores inmunorregulatorios como anticuerpos antiidiotípicos y células T supresoras (112,119-125). Desarrollaremos este último aspecto ya que se relaciona con los resultados que describiremos más adelante.

4.3. Resistencia frente a un injerto contra huésped.

Para provocar un GvH letal en híbridos F1 por inoculación de linfocitos parentales, se necesitan altas dosis de linfocitos T. Los huéspedes irradiados, en cambio, se tornan sensibles frente a la inoculación de bajas dosis de células T parentales (126). Existe por lo tanto, un mecanismo radiosensible que protege a los adultos F1 normales del ataque aloagresivo.

En híbridos F1 no irradiados se puede inducir la aparición de niveles importantes de protección frente al ataque de células parentales alorreactivas, a través de la inmunización previa por vía e.v. con bajas dosis de células parentales. Los animales así pretratados se recuperan rápidamente de los síntomas determinados por la reacción de GvH y adquieren un estado de resistencia **específica** frente a posteriores injertos de linfocitos de la misma cepa parental, aunque su sensibilidad frente al injerto de células provenientes del otro tipo parental no se modifica (120-121) (Fig.9). Este efecto depende de la presencia de células T en el injerto y no se produce si se utilizan poblaciones de células T parentales desprovistas por selección negativa de las células T que poseen receptores para el haplotipo del otro padre del huésped F1. Es decir, si se inmuniza un híbrido F1(AxB) con linfocitos de la cepa parental B previamente depletados de actividad anti-A, los huéspedes F1 no muestran protección frente al GvH de

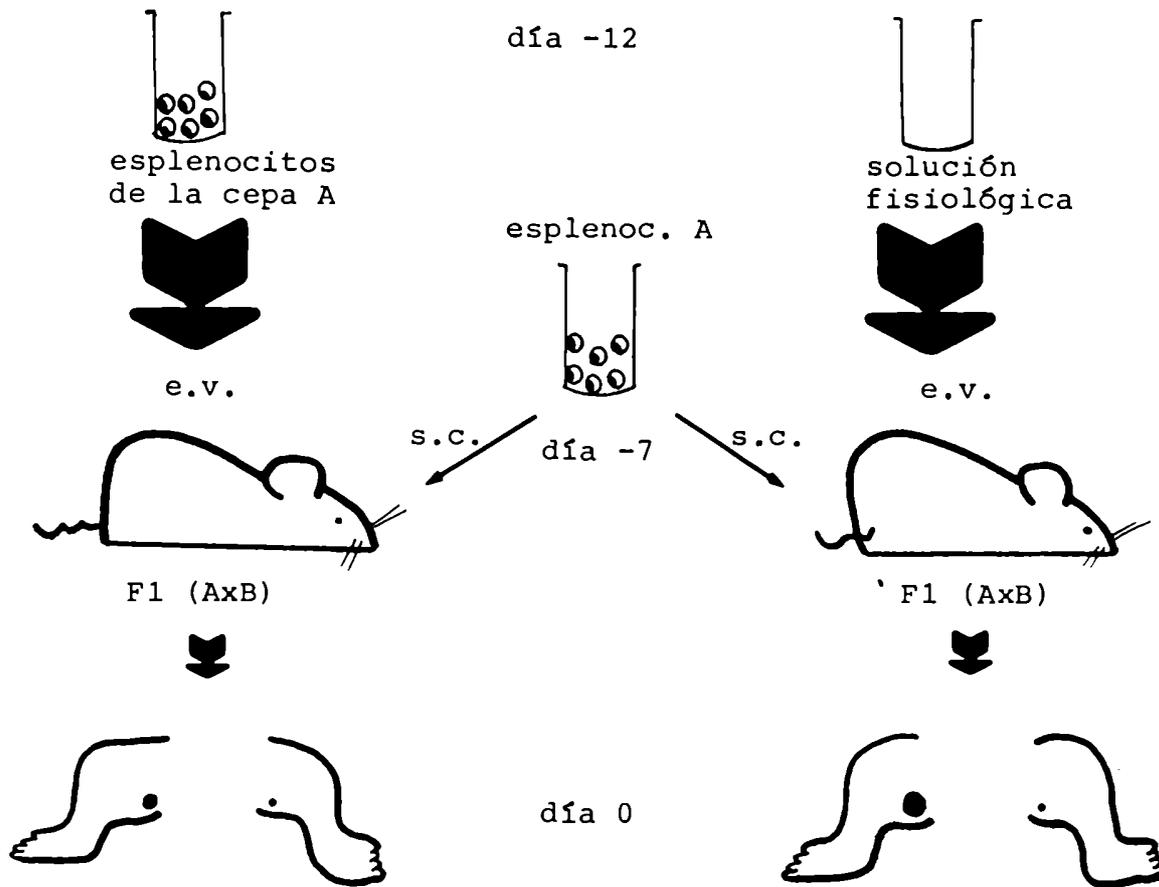


Figura 9 : inducción de protección frente al GvH local por inoculación e.v. previa de esplenocitos de la misma cepa parental.

poblaciones normales de células B.

Por otra parte, las células parentales, entre las cuales hay linfocitos T con receptores alorreactivos dirigidos hacia cualquier haplotipo no propio, es decir, hacia cualquier combinación de alelos del CMH no propios, pueden inducir protección en un F1 entre esa cepa parental y una tercera cepa de distinto haplotipo.

Se ha determinado que este mecanismo de resistencia frente a las reacciones de GvH depende de las células T del huésped, y que puede ser transferido a otros animales receptores mediante pasaje de células T esplénicas (121).

Estos resultados indican que el efecto protector de las células parentales estaría relacionado con el hecho de que dichas células son portadoras de receptores alorreactivos específicos, frente a los cuales el huésped montaría una respuesta anti-anti-H-2 propio. Trabajos recientes demostraron que linfocitos T de un F1 activados in vitro por estimulación frente a esplenocitos de una de las cepas parentales, poseen capacidad citotóxica específica frente a blastos de cualquier H-2, pero portadores de receptores alorreactivos frente a la cepa sensibilizante (123).

Coincidentemente, la inoculación de recién nacidos F1 con bajas dosis de células de uno de los padres, determina la tolerancia de los adultos inmunizados

frente a células del haplotipo parental inmunizante, derivando así en la extrema sensibilidad de los mismos frente a reacciones de GvH desencadenadas por linfocitos de dicha cepa parental (124).

El estado de protección se desencadena muy rápidamente: animales irradiados un día después de la inoculación de las células parentales desarrollan igualmente la resistencia frente al GvH (125). En base a estos resultados, los autores proponen que las células emergentes después de la inmunización se comportarían como una población preexistente y con memoria inmunológica.

Wilson y col. (120-125) postulan que los clones celulares que participan en la protección frente al GvH, que son clones con actividad hacia los receptores T de alta afinidad dirigidos hacia los AMH propios de origen parental, formarían parte de los mecanismos normales que aseguran la tolerancia frente a lo propio. De acuerdo a esta hipótesis, en el timo surgirían habitualmente clones de células T con receptores de alta afinidad hacia los antígenos de histocompatibilidad propios, cuya actividad sería regulada por los clones de células T con receptores anti-anti-H-2 propio. Estos clones, que serían los mismos que se replican frente a la inoculación e.v. de células parentales, intervendrían entonces en la regulación de los niveles normales de autorreactividad.

4.4. Antígenos menores de histocompatibilidad.

El rechazo de un tejido alogeneico ocurre fundamentalmente cuando dador y huésped difieren en sus AMH. Pero existen otros genes que codifican para antígenos denominados antígenos menores de histocompatibilidad (AmH), que también participan en estas reacciones aunque determinando rechazos mas lentos (127). Estos antígenos no están codificados en el CMH sino en diferentes cromosomas. Su papel en el rechazo de trasplantes de órganos humanos es de importancia (128).

En el ratón existen por lo menos treinta AmH (129). Entre ellos, el denominado Mls ha atraído largamente la atención de los inmunólogos. El locus Mls está situado en el cromosoma 1 del ratón (130) y se caracteriza por determinar respuestas proliferativas intensas en CMLA entre poblaciones celulares que no difieren en sus AMH. También pueden determinar reacciones de GvH de intensidad similar a los AMH. Los antígenos Mls se pueden detectar en macrófagos y linfocitos T.

Se han descrito cuatro alelos de este locus: Mls_a, Mls_b, Mls_c y Mls_d (131). En ensayos de CMLA los alelos b y c estimulan debilmente la proliferación de los linfocitos T que difieren en este locus. Los alelos a y d, en cambio, son altamente estimulatorios en estos ensayos. Esta unidireccionalidad, que caracteriza a la respuesta frente a este locus, se observa también en reacciones de

GvH. Se ha determinado que la frecuencia de los linfocitos T reactivos frente a estos alelos altamente estimuladores es muy alta, mayor aún que la frecuencia de linfocitos T reactivos frente a los AMH no propios (132).

Las respuestas inmunes frente a los AmH están restringidas por el CMH (40-42), de la misma manera que la respuesta frente a cualquier antígeno convencional. En el caso de los antígenos Mls, se ha observado que clones de células T no muestran tal restricción (134-135). Se ha determinado además, que las reacciones frente a los antígenos Mls se pueden bloquear con anticuerpos anti-Ia propio, aunque el producto del locus Mls sería diferente a los antígenos Ia (132,136). En este sentido, un dato obtenido recientemente reviste gran interés. Janeway y col. (137) observaron que las células presentadoras de antígenos de las cepas que poseen alelos estimuladores del locus Mls son más eficientes en la presentación de un antígeno que aquellas portadoras de alelos no estimulatorios del locus Mls. Esto podría deberse a que estas células expresan más antígenos Ia en la superficie celular, o bien a que la presencia de los alelos estimulatorios aumenta la probabilidad de interacción entre los antígenos Ia propios y los receptores correspondientes en las células T.

5. CIRCUITOS INMUNORREGULATORIOS T DEPENDIENTES.

El estudio de los mecanismos de regulación de la respuesta inmune, especialmente el de la supresión T, ha dado lugar a la elaboración de complejos modelos de circuitos inmunorregulatorios, que incluyen la existencia de diferentes niveles de supresión y contrasupresión, en cada uno de los cuales participarían células T con diferentes funciones. Cada nivel de supresión contaría con un tipo celular capaz de recibir una señal externa al circuito supresor e inducir el disparo o comienzo del mismo (célula inductora). Otra subpoblación celular sería la encargada de transducir o transmitir el mensaje anterior y, finalmente, existiría un tipo celular efector directo de la supresión sobre las células blanco correspondientes. Las células T inductoras actuarían además negativamente sobre las células que producen el mensaje inicial, que serían externas al circuito, constituyendo así un sistema retroalimentado (Fig. 10).

De acuerdo a los modelos más aceptados, existirían por lo menos tres niveles de regulación actuantes. Hablaremos con más detalle de algunas de las características propuestas para estos sistemas, basándonos principalmente en los trabajos del grupo de Gershon, Green y col. (138-150).

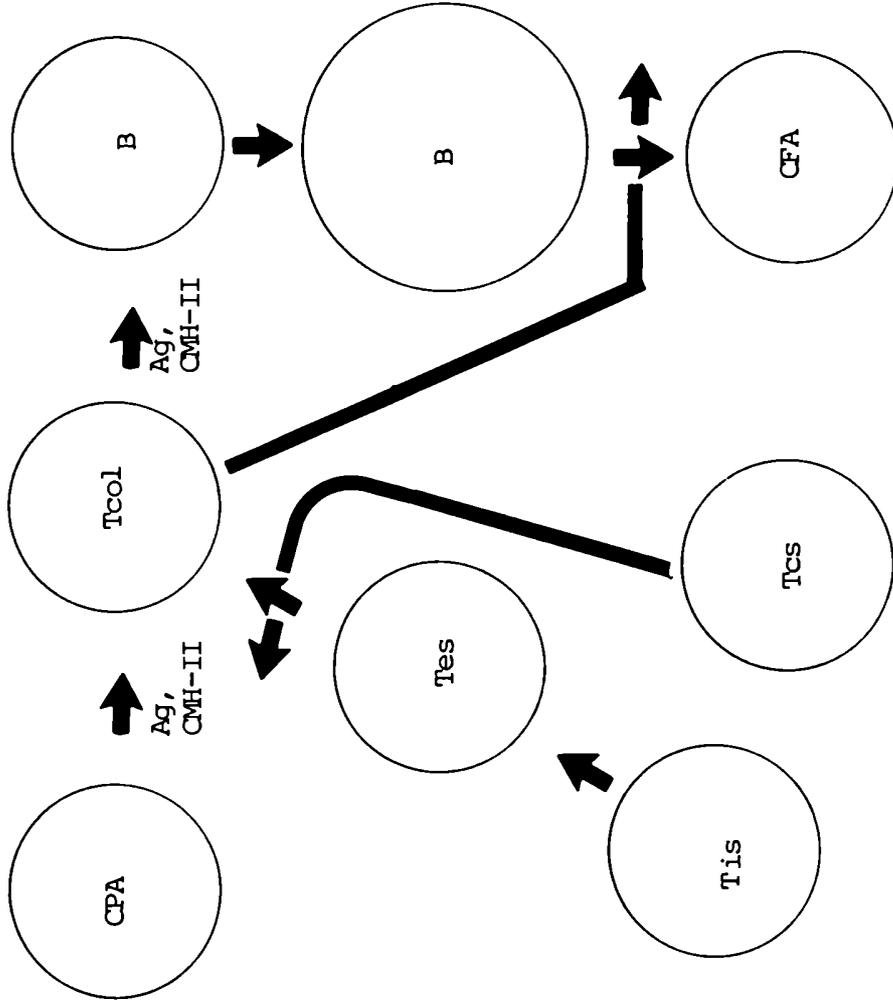


Figura 10 : interacciones celulares inmunorregulatorias. Se incluyen en el esquema los tipos celulares y las interacciones aceptadas por la mayoría de los autores. CPA: célula presentadora de antígenos. Tcol: linfocito T colaborador. B: linfocito B. CFA: célula formadora de anticuerpos. Tis: linfocito T inductor de la supresión. Tes : linfocito T efector de la supresión . Tcs: linfocito T contra-supresor.

5.1. Nivel 1 de supresión.

Cuando la llegada de un antígeno perturba la homeostasis del sistema, una serie de interacciones celulares determina la aparición de una respuesta. Por ejemplo el antígeno es presentado por los macrófagos a las células T colaboradoras y éstas activan a los linfocitos B específicos para la producción de los anticuerpos correspondientes. Paralelamente, se produciría la activación del nivel 1 de supresión. Se ha propuesto (138) que las células B activadas por el antígeno, interactuarían con un tipo de células T, portadoras del antígeno I-J (139), que corresponderían a las células inductoras del nivel 1 de supresión. Estas células interactuarían con las células transductoras de manera antígeno específica. Los autores de estos trabajos proponen que esta interacción estaría restringida por genes ligados a la región V_H es decir, por los genes que codifican para la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (140-141). Esto significaría que, para que las células inductoras y las transductoras del nivel 1 de supresión puedan interactuar, deberían compartir los mismos alelos en estos genes. Otros autores proponen, en cambio, que la interacción entre las células inductoras y transductoras del nivel 1 de supresión estaría restringida por el CMH, y que el determinante antigénico I-J no estaría codificado en una región I-J del CMH sino que resultaría de la asociación entre la cadena antígeno-específica y la cadena $E\beta$ de los antígenos I-E

portados por el factor inductor de la supresión (18).

5.2. Contrasupresión.

La contrasupresión ha sido definida como la actividad que interfiere con el nivel 1 de supresión, determinando la aparición de inmunidad en forma dominante (142).

En el circuito contrasupresor participarían también varias sub-poblaciones celulares, portadoras de marcadores antigénicos característicos (17). Las células efectoras de la contrasupresión han sido caracterizadas en bazo de animales hiperinmunizados (143), y se pueden generar in vitro cultivando bazo de recién nacidos, animales envejecidos, y animales autoinmunes por timectomía y tratamiento con activadores policlonales de células B (17, 143-145).

La contrasupresión actuaría en diversas situaciones en las que, después de un periodo de supresión, se restablece la respuesta inmune en forma dominante (17, 146). Los primeros estadios post-natales, las infecciones parasitarias, ciertos tumores, y los traumas severos, serían algunas de las situaciones que, al incluir un estado de supresión generalizado, probablemente debido a la activación del nivel 1 de supresión, requerirían la activación del circuito contrasupresor para restablecer la respuesta inmune normal. Se postula también que la

localización de ciertas respuestas inmunes, como las respuestas focalizadas en las placas de Feyer, la piel, y la médula ósea, podrían estar mediadas por la contrasupresión. En todos estos casos, sería importante que la respuesta inmune local pueda actuar, aún cuando se mantiene el estado de supresión sistèmica, impidiéndose de esta manera la aparición de fenómenos autoinmunes (146).

5.3. Nivel 2 de supresión.

La existencia de un segundo nivel de supresión, actuante sobre el circuito contrasupresor, ha sido descrito in vitro, a través del cultivo conjunto de células adultas y neonatales (147). En efecto, mientras que el cultivo de células esplénicas de ratones adultos normales da origen a la aparición de una fuerte actividad supresora (149), el cultivo de células de recién nacidos (animales de 1 a 2 días), produce actividad contrasupresora dominante (144). Cuando se desarrollan cultivos conjuntos de esplenocitos adultos y perinatales no se observa esta actividad contrasupresora, dependiendo este fenómeno de la presencia en los cultivos de una pequeña sub-población de células T adultas.

5.4.Ontogenia de los circuitos T inmunorregulatorios.

Estos complejos circuitos inmunorregulatorios se desarrollarían en los estadios perinatales del ratón de acuerdo a un programa que parecería estar definido ontogenéticamente (150). En efecto, antes del nacimiento, las células esplénicas embrionarias parecen tener un alto potencial supresor, que no puede ser contrabalanceado por células contrasupresoras. Las células esplénicas de ratones recién nacidos poseen también una alta capacidad supresora, pero ésta puede ser inhibida por contrasupresión. Entre el 1^{er} y 2^{do} día de vida, la supresión desaparece, instalándose en el bazo una clara actividad contrasupresora. La eliminación por antisueños de esta última permite recuperar la capacidad supresora de las primeras horas; más aún, si los animales son timectomizados durante el primer día de vida, no se observa la aparición de actividad contrasupresora (17).

Estos resultados parecerían indicar que los diferentes niveles regulatorios aparecerían en forma sucesiva; la supresión generalizada de la etapa embrionaria sería contrabalanceada por la aparición de la contrasupresión.

El nivel 2 de supresión aparecería alrededor del día 8 de vida y jugaría un papel importante en el proceso de maduración normal de la respuesta inmune, ya que la introducción prematura de esplenocitos adultos (que

incluyen células supresoras del nivel 2), bloquea el desarrollo de la respuesta inmune normal (151). El tratamiento de las células adultas con un antisuero específico para las poblaciones T pertenecientes al nivel 2 de supresión (F7D5), elimina su capacidad de perturbar el desarrollo de la respuesta inmune de los recién nacidos (17).

Experimentos de timectomía temprana sugieren también que el nivel 2 de supresión tendría un importante rol dentro de los procesos de maduración de la respuesta inmune normal. Smith y col. (148) observaron que animales timectomizados al 3^{er} día de vida y tratados con activadores policlonales, desarrollan una severa patología autoinmune. En cultivos de células de estos animales, se desarrollan células supresoras del nivel 1 y células contrasupresoras, pero no así células del nivel 2 de supresión (148).

La aparición sucesiva de los diferentes circuitos de supresión y contrasupresión sería, de acuerdo con estos resultados, un requisito para el desarrollo de la respuesta inmune normal. Como hemos explicado, el pasaje prematuro de células de animales adultos a ratones recién nacidos es capaz de producir perturbaciones en el desarrollo de la respuesta inmune. El pasaje de células de tipo adulto de la madre al feto a través de la lactancia ocurre en forma normal, como se detallará más adelante. Estos resultados parecen sugerir que las células que pasan

de la madre a los hijos durante la lactancia podrían jugar un papel importante en la determinación de las características, niveles o especificidades de los circuitos inmunorregulatorios de los hijos.

6. RECONOCIMIENTO DE LO PROPIO II . RED DE IDIOTIPOS-ANTIIDIOTIPOS

6.1. La teoría de la red.

Uno de los mecanismos fundamentales de regulación de la respuesta inmune, la red de idiotipos-antiidiotipos, incluye una de las formas principales de reconocimiento de lo propio que tienen lugar como parte del funcionamiento normal del sistema inmune.

La teoría de la red (2), formulada por Jerne en 1974, proponía que el sistema inmune podía considerarse como una red de idiotipos interactuantes. De acuerdo con esta hipótesis, todas las inmunoglobulinas normales de cada individuo expresan dos tipos de sitios de interacción con otros elementos del sistema inmune: los paratopos, o sitios de combinación con los determinantes antigénicos convencionales; y los denominados determinantes idiotípicos, es decir, los determinantes antigénicos conformados por las estructuras que adopta la región variable de las inmunoglobulinas para cada anticuerpo en particular (Fig.11).

El conjunto de los idiotopos de una inmunoglobulina se denomina su idiotipo. El idiotipo de las inmunoglobulinas resulta antigénico para el individuo que

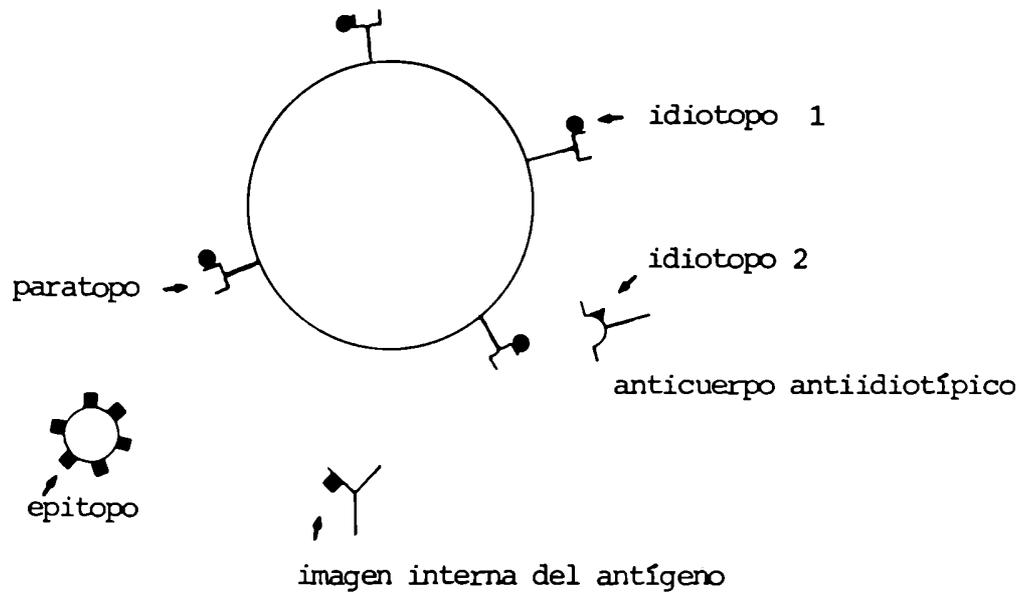


Figura 11: interrelación entre epitopos, idiotopos y paratopos. Los paratopos son los sitios de combinación con los determinantes antigénicos (epitopos) y se expresan en los receptores de las células T,B y en los anticuerpos antígeno-específicos. A su vez estos receptores y anticuerpos tienen sus propios determinantes antigénicos (idiotipos), frente a los cuales se elaboran anticuerpos antiidiotípicos. Un anticuerpo con otra especificidad puede portar un idiotopo similar al epitopo natural, denominándose entonces imagen interna del antígeno.

las produce, por lo que el mismo sintetiza anticuerpos específicos para esos determinantes idiotípicos. A esos anti-anticuerpos se los denomina anticuerpos antiidiotípicos (152).

Jerne postuló que en el conjunto de las inmunoglobulinas de un individuo tendrían representación idiotopos con reactividad cruzada hacia la mayoría o todos los epitopos naturales. Estos idiotopos, que representarían al conjunto de todos los determinantes antigénicos naturales o experimentales, son denominados dentro de esta teoría "imágenes internas" del antígeno. El otro postulado central de la teoría de Jerne indica que para cada anticuerpo (Ab_1), que posee su propio conjunto de idiotopos (es decir su idiotipo particular), existe un anticuerpo complementario Ab_2 , con especificidad hacia dicho idiotipo y que también poseerá su propio conjunto de idiotopos. Los determinantes idiotípicos de Ab_2 serán reconocidos también por anticuerpos específicos denominados Ab_3 , que serán portadores de sus propios determinantes idiotípicos, etc.

Visto así el sistema inmune como una red de idiotipos y antiidiotipos interactuantes, Jerne propuso que, en un animal no inmunizado, esta red de anticuerpos complementarios estaría en equilibrio, el que sería modificado o roto por la entrada de un antígeno. La instalación original de la red idiotípica para cada antígeno estaría relacionada con la existencia, para cada antígeno natural, de una imagen interna del mismo,

representada, como hemos explicado, por los idiotopos de las inmunoglobulinas con reactividad cruzada hacia los epitopos naturales. El estado de equilibrio postulado estaria basado en la supresión o control negativo ejercido por las inmunoglobulinas antiidiotipicas (Ab₂) sobre los linfocitos con especificidad para las inmunoglobulinas correspondientes (Ab₁), y la activación o control positivo ejercido por las inmunoglobulinas de tipo Ab₁ sobre los linfocitos portadores de inmunoglobulinas antiidiotipicas Ab₂. Es decir que las inmunoglobulinas de tipo Ab₁ actuarian como supresoras de la actividad de los linfocitos portadores de las imágenes internas del antígeno y como estimuladoras de los correspondientes linfocitos antiidiotipicos.

La llegada de un antígeno rompería el equilibrio de este sistema, fundamentalmente porque eliminaría del mismo una apreciable cantidad de inmunoglobulinas del tipo Ab₁ antígeno-especificas. El secuestro de estas inmunoglobulinas determinaría la expansión del clon de células portadoras de la imagen interna del antígeno, lo cual determinaría a su vez un aumento de las inmunoglobulinas con receptores especificos, es decir Ab₁. Esto determinaría la expansión del clon de linfocitos Ab₁, lo cual a su vez determinaría la ampliación del clon productor de Ab₂, etc,etc, derivando finalmente en un nuevo estado de equilibrio, en el cual el número de células linfoides portadoras de

inmunoglobulinas Ab sería diferente (mayor) del inicial.

1

Posteriormente se ha demostrado (17,138,142,153) que no solo las células B y los anticuerpos correspondientes interactúan en forma de red idiotípica, sino que también las células T, tanto las colaboradoras como las supresoras, participan en los circuitos inmunorregulatorios a través de interacciones de tipo idiotípico, regulando a través de las mismas la proliferación de clones de linfocitos portadores de los idiotipos correspondientes.

La teoría de Jerne ha constituido un aporte fundamental al desarrollo de los conocimientos actuales de la inmunología, aunque algunos de sus postulados básicos hayan sido revisados posteriormente (154-158). Así, la suposición de que serían las imágenes internas de los antígenos más que los antígenos mismos (o sus paratopos) los que intervendrían en el establecimiento del nivel "inicial" de células Ab, se encuentra actualmente en revisión (158). Se ha demostrado también que las interacciones bidireccionales entre idiotipos y antiidiotipos pueden ser estimulatorias o inhibitorias en ambos sentidos, dependiendo de las condiciones en que se produzcan (156-158), ya que la inmunización con anticuerpos antiidiotípicos puede determinar tanto la supresión como la estimulación de los clones portadores de los determinantes idiotípicos correspondientes.

6.2. Determinantes antigénicos privados y públicos.

Los trabajos clásicos en este área estudiaban el efecto de la inmunización con anticuerpos antiidiotípicos xenogéneos o alogéneos (157-158). El desarrollo de las técnicas de síntesis de anticuerpos monoclonales (159) permitió el abordaje del estudio de la regulación de la síntesis de anticuerpos de un determinado idiotipo en sistemas singéneos. Estas técnicas permitieron determinar la existencia de ciertos patrones idiotípicos en la respuesta inmune.

Ciertos idiotipos, denominados determinantes idiotípicos privados o menores, se expresan en forma irregular y solo en algunos individuos de una cierta especie o cepa. Otros idiotipos aparecen regularmente y con alta frecuencia en los individuos de una cierta cepa o especie, y en algunos casos, hasta en diferentes especies (160-162). Las secuencias génicas que codifican para las especificidades recurrentes o públicas parecerían ser estables y transmisibles hereditariamente, ya que los miembros de una determinada cepa producen, con una cierta frecuencia propia, anticuerpos con determinado idiotipo frente a la inmunización con el antígeno correspondiente. Las especificidades idiotípicas privadas, en cambio, dependerían de mutaciones somáticas al azar en la zona hipervariable de los genes que codifican para las inmunoglobulinas. La respuesta frente a ciertos antígenos

consiste principalmente en anticuerpos con especificidades idiotípicas recurrentes, mientras que otras respuestas, especialmente las interacciones idiotípicas-antiidiotípicas entre diferentes poblaciones de células del sistema inmune, parecen depender fundamentalmente de la generación de mutaciones somáticas (157,160).

7. RELACION MATERNO-FETAL.

7.1. Inmunología de la preñez.

El desarrollo de un feto semi-alogeneico en el útero materno constituye uno de los fenómenos fascinantes y a la vez elusivos de la inmunología. Se han elaborado numerosas hipótesis que intentan explicar la ausencia de ataque alorreactivo materno al feto. Actualmente se ha comprobado que el feto expresa muy tempranamente sus AMH en la superficie de las células correspondientes (163), y que la madre durante la preñez elabora anticuerpos hacia los mismos (164-168). Por ello, las hipótesis que se estudian más activamente comprenden dos tipos de mecanismos que probablemente coexistan: se postula que la placenta actuaría como barrera selectiva impidiendo la entrada de anticuerpos y células maternas hacia el feto (165-170); y, por otra parte, que la respuesta de la madre frente al feto poseería las características de una respuesta facilitadora, mediada por la presencia de anticuerpos de tipo bloqueante y por complejos inmunes (171-173).

La respuesta materna frente al feto en desarrollo se expresa de diversas maneras (174-175): por el agrandamiento de los nódulos linfáticos drenantes del útero y la proliferación en ellos de células pironinofílicas en las áreas paracorticales (linfocitos T) y de células plasmáticas en el área medular (linfocitos B); por el

desarrollo de inmunidad celular contra los AMH y AmH de origen paterno; y por la presencia de anticuerpos hemoaglutinantes, leucoaglutinantes y linfocitotóxicos, entre otros. La inmunidad materna se detecta en multiparas, pero es de notar que los anticuerpos dirigidos contra los AH fetales de origen paterno no se detectan en el suero de los niños al nacimiento, mientras que anticuerpos similares resultantes de preinmunizaciones o preñeces previas son detectados en dicho suero.

En nuestro laboratorio hemos podido demostrar (176) que durante los primeros días de la preñez murina se detecta un aumento de los niveles alorreactivos maternos. Estos niveles alorreactivos aumentados fueron detectados en los ganglios para-aórticos que drenan el útero grávido hasta el tercer día de la preñez. Paralelamente se observó el desarrollo de una creciente actividad supresora que caracteriza los estadios posteriores de la preñez.

Diversos autores han demostrado, utilizando anticuerpos monoclonales, que la placenta actuaría como inmunoabsorbente de los anticuerpos maternos dirigidos hacia los AMH de origen paterno (167-170). Si hembras preñadas son inyectadas por vía e.v. con anticuerpos monoclonales anti-AMH de clase I del feto marcados con isótopos radioactivos, se observa una marcada toma de radioactividad en la placenta, comparada con la marca que incorpora la placenta de hembras preñadas con fetos de otro H-2. Estos anticuerpos serían digeridos intracelularmente y liberados en forma de fragmentos a la circulación materna.

Contrariamente, experimentos con anticuerpos dirigidos hacia los AMH de clase II indican que la placenta no actuaría como inmunoabsorbente frente a los anticuerpos dirigidos hacia los antígenos Ia del feto (170), aunque no se han investigado aún todas las especificidades.

En síntesis la preñez incluye un estado de respuesta inmune activo de la madre al feto, con la presencia de respuestas de tipo humoral y celular frente a antígenos fetales, incluyendo los AH de origen paterno. Sin embargo, existirían mecanismos de protección del feto, que asegurarían su sobrevivencia en el útero materno. Desde el punto de vista de nuestro trabajo, resulta especialmente importante discutir la posibilidad de que células y moléculas maternas, aún cuando estuvieran preseleccionadas negativamente en cuanto a la potencialidad de dañar al embrión, puedan atravesar la placenta y llegar al feto, pasando así a formar parte de la historia antigénica e idiopática del individuo.

7.1. Intercambio de células a través de la placenta.

Los sistemas circulatorios materno y fetal están separados por una barrera ininterrumpida, el trofoblasto de la placenta, a través de la cual se produce la diálisis de los fluidos sanguíneos correspondientes. El pasaje de células a través de la placenta está dificultado por la

estructura física de la misma (177). Las uniones de tipo "estrecho" entre las células de la capa trofoblástica, así como la existencia de una capa de fibrina en la interfase materno-fetal, colaboran en el control del intercambio celular, potencialmente dañino para el embrión semi-alogeneico. La sialomusina, rica en ácido neuramínico, que cubre las microvellosidades trofoblásticas en su polo apical (materno), conferiría a la superficie celular una alta carga eléctrica negativa que podría repeler a los linfocitos maternos. Estos también tienen su carga eléctrica negativa aumentada, probablemente por acción de la progesterona (178).

Sin embargo, durante la preñez normal, pequeñas cantidades de sangre fetal, incluyendo glóbulos rojos y leucocitos, entran en la circulación materna (179-180). Este pasaje determina que en la circulación materna se encuentre entre un 0.8 y un 0.14 % de células fetales (180).

El pasaje de células en sentido inverso, es decir, desde la madre hacia el feto, es materia de controversia (180-182) y aún de acuerdo a los autores que postulan su existencia, sería de un nivel mucho menor que el pasaje de células en sentido contrario. En efecto, cuando se inocularon glóbulos rojos marcados a futuras madres, identificándose luego dichas células en sangre del cordón umbilical, se pudo comprobar que sólo el 10% de los

fetos había recibido algún aporte de sangre materna (182). Otros autores (183), utilizando marcadores enzimáticos, determinaron que no existiría pasaje linfocitario de la madre al feto, dato que se verificó a través de la inoculación de células marcadas con fluoresceína a la circulación materna en distintos momentos de la gestación. En el mismo estudio se detectó, en cambio, el pasaje de glóbulos rojos de la madre al feto.

Existen por otra parte evidencias clínicas y experimentales del pasaje trasplacentario de células hacia el feto. Beer y Billingham (184) demostraron que era posible desencadenar reacciones de daño fetal característico de un ataque alorreactivo en experimentos desarrollados con ratas tratadas con ciclofosfamida y repobladas con médula ósea alogeneica. El 50% de las crías provenientes del apareamiento de estas quimeras con machos de la cepa original (huésped) sufrieron daño fetal, lo que sugiere que las células maternas quiméricas habrían atravesado la placenta y desarrollado un ataque alorreactivo hacia la cría histoincompatible. La mayoría de los sobrevivientes resultaron tolerantes a los injertos de piel de la cepa dadora de la quimera. La inducción de daño fetal también ha sido posible a través del pretratamiento de la madre con antígenos paternos y por inmunización de la misma con linfocitos singeneicos inmunes al padre (179).

En nuestro laboratorio se ha reproducido el modelo de inducción de daño fetal inmunizando a las futuras

madres con células o tumores de origen paterno (185) y aún con tumores no relacionados (186). En estos experimentos se ha podido correlacionar una mayor incidencia de daño fetal con un mayor nivel alorreactivo T esplénico de la madre hacia los antígenos de histocompatibilidad del padre (185,187). Más aún, cuando se prefirieron hembras que habían sido inmunizadas con un antígeno convencional (glóbulos rojos de carnero) en forma repetitiva, lo que determinó aumentos en los niveles de alorreactividad T de dichas hembras, también se logró la inducción de daño fetal en las crías en combinaciones de cepas que diferían en sus AMH y con diferentes dosis de inmunización en cada cepa(188).

En el hombre se han informado algunos casos de inducción materna de daño fetal que incluyen síntomas de GvH, con un caso extremo de quimerismo a nivel de cromosomas sexuales (189). Recientemente se ha determinado por tipificación de HLA la presencia de linfocitos T y B maternos en niños que sufren una inmunodeficiencia severa combinada (190). Algunos autores correlacionan el pico de leucemias que se observa en niños de alrededor de los dos años de edad, con el pasaje trasplacentario de linfocitos maternos y la reacción crónica de GvH determinada por la presencia de los mismos en la circulación del infante (191).

En conclusión, el pasaje de células a través de

la placenta en condiciones normales no ha sido demostrado claramente, pero si en condiciones experimentales o patológicas.

7.2. Pasaje a través de la lactancia.

Además de la conocida transmisión pasiva de inmunidad humoral principalmente bajo la forma de inmunoglobulina A (Ig A) y otros agentes, hay evidencias clínicas y experimentales de que a través de la leche materna se pueden transmitir también células con competencia inmunológica.

Se sabe ya hace mucho tiempo que el calostro y la leche de muchos mamíferos contiene muchos leucocitos (de 1 a 4×10^6 células por mililitro, dependiendo de la especie). La mayoría de estas células son macrófagos, aunque también se encuentra una cantidad considerable de linfocitos que alcanzan el 10% del total de células, incluyendo igual proporción de linfocitos T y B (193). Se calcula que durante la segunda semana de vida, un niño lactante incorpora 10^8 células viables por día a través de la leche materna (194).

Se ha determinado que estas células son inmunológicamente activas en cuanto a la capacidad de proliferación frente a mitógenos, la respuesta en ensayos de cultivo mixto alogeneico, y la producción de

anticuerpos in vitro (192-194). Sin embargo, estudios comparativos de la respuesta inmune de los linfocitos de la leche y sangre periférica, han puesto en evidencia que los linfocitos T y B presentes en el calostro y la leche habrían sido seleccionados en cuanto a su especificidad de respuesta (194). En efecto, los linfocitos B de la leche sintetizan preferentemente anticuerpos contra microorganismos habituales en el tracto digestivo y respiratorio, careciendo en cambio de algunas especificidades presentes en los linfocitos de sangre periférica de los mismos individuos. Actualmente se supone que las células plasmáticas observadas en las glándulas mamarias durante la preñez tardía y durante el post-parto en el calostro y la leche, se originan a partir de células precursoras sensibilizadas en el tejido linfoideo asociado al intestino, secretando inmunoglobulinas cuya especificidad está así dirigida principalmente hacia los microorganismos relacionados al tracto intestinal (195). El transporte de células desde las placas de Peyer hacia las glándulas mamarias ha sido demostrado con técnicas de marcación celular con isótopos radioactivos (196). Durante el desarrollo de las glándulas mamarias se observa una marcada afluencia de células productoras de IgA. La administración de hormonas lactogénica a hembras vírgenes determina también la aparición de estos linfocitos en la glándula mamaria (197). En conejos en los que se realizaron trasplantes autólogos de glándula mamaria en la cámara anterior del ojo y se administraron hormonas

lactogénicas, se observó la migración de linfocitos B productores de IgA a dichos trasplantes (198). No se conocen los mecanismos que median la colonización de la glándula mamaria. Strober y col (199) han sugerido que la presencia de linfocitos T colaboradores específicos para la producción de IgA podría determinar la expansión preferencial de linfocitos B de la población circulante en las áreas submucosales como las glándulas mamarias.

Las IgA de la leche materna parecen reflejar directamente la exposición que ha sufrido la madre a distintos antígenos a través del tracto intestinal. Por ejemplo, la presencia de altos niveles de IgA hacia componentes de la leche bovina correlaciona con los niveles de ingesta de leche de la madre (200). Se ha determinado también que en mujeres expuestas a *E.coli* y *Vibrio cholerae* se encuentran normalmente anticuerpos hacia las toxinas correspondientes, mientras que en mujeres no expuestas a estos agentes infecciosos no se detectan los anticuerpos específicos (201-202). Las Ig de la leche poseen además algunas especificidades que no se observan en el intestino, incluyendo especialmente Ig presentes en las secreciones salivares (193).

Los linfocitos T de la leche y el calostro presentarían también cierta selección en su repertorio de especificidades. Se destaca en este sentido la ausencia de citotoxicidad frente a células portadoras de los antígenos

de histocompatibilidad de origen paterno, aunque la respuesta proliferativa frente a dichas células es semejante a la respuesta de los linfocitos de sangre periférica de la misma madre (202).

El pasaje de estas células maternas a la circulación de los recién nacidos a través de la leche ha sido comprobada en forma directa. En experimentos con linfocitos marcados, se determinó primero que la marca se recuperaba principalmente en las placas de Peyer, indicando a éstas como principal vía de acceso de dichas células a la circulación de los recién nacidos (203). Recientemente (204), utilizando técnicas de marcado de células con isotiocianato de fluoresceína o rodamina y observación microscópica y citofluorimétrica, se ha determinado que por lo menos el 0,1% de las células de la leche materna ingresan al lactante, observándose las en distintos órganos y en sangre periférica. Los autores de este trabajo estiman que durante la primer semana de vida de los ratones los lactantes podrían incorporar alrededor de 10^4 células maternas.

Durante la primera semana de vida de los ratones, la acidez estomacal y la actividad enzimática son bajas (205-206): el pH del estómago de la rata al nacer es de 6.6 y se ha determinado que permanece por encima de 5.0 hasta tres semanas después del nacimiento. Se ha establecido además que la leche de rata posee una alta capacidad de buffer. La actividad péptica detectada en el

estómago de ratas lactantes es escasa hasta las dos semanas de vida. Estudios realizados en niños lactantes demostraron que las condiciones gástricas pueden ser no perjudiciales para la supervivencia de células en ese medio (207-208). Aunque el pH del jugo gástrico 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, declinando recién después de un período postprandial de 3 horas.

Existen considerables evidencias de que las células maternas aportadas a través de la lactancia sobreviven y funcionan durante varias semanas (209-210). En experimentos en que se utilizaron ratas nodrizas alogeneicas y semi-alogeneicas para alimentar a las crías, se pudo inducir en las mismas tolerancia hacia el H-2 de estas nodrizas, observándose también la adquisición por parte de la cría inmunológicamente inmadura de capacidad para rechazar injertos de piel alogeneica de 3^{ros} no relacionados. Mas aún, los linfocitos que pasan a través de la leche reconocen como extraños los antígenos de histocompatibilidad de origen paterno de la cría, declarándose entonces una enfermedad de GvH, letal en ciertas combinaciones de dador-huesped (203,211).

En el hombre, más del 10% de los linfocitos de sangre periférica de los recién nacidos tienen el HLA de la madre. En niños alimentados con nodrizas, se ha comprobado que estos linfocitos pueden transferirse al recién nacido a

través de la leche materna (212).

7.3. Influencia materna sobre el desarrollo de la respuesta inmune de la cría.

En las primeras etapas de la vida post-natal de los mamíferos, en las que el sistema inmune es aún inmaduro, los linfocitos y anticuerpos que recibe a través de la placenta y de la leche materna tienen un papel muy importante en la defensa frente a las infecciones (213-214).

Pero, además de este papel transitorio, los antígenos e inmunoglobulinas maternas pueden influir en forma permanente en la expresión del repertorio inmune de los hijos. Durante un largo período se relacionó dicha influencia exclusivamente con la instalación de tolerancia frente a determinados antígenos. En efecto, la administración de antígenos (215-217), o de anticuerpos antiidiotípicos a recién nacidos (218-219) o durante la vida intrauterina (220-221), produce la supresión crónica de la respuesta inmune correspondiente.

Se postulan diferentes mecanismos para explicar la instalación de un estado de tolerancia por el contacto temprano con un antígeno; estas postulaciones, aunque en su mayoría provienen de estudios en los que se logra la

tolerancia frente a un antígeno no propio por administración intrauterina o perinatal, intentan también explicar los mecanismos por los cuales los individuos son tolerantes frente a los antígenos propios. Algunos autores sostienen que el contacto con un antígeno en ciertas circunstancias determinaría la pérdida o delección de algunos clones celulares, especialmente del repertorio T, que serían justamente los clones portadores de los receptores hacia esos antígenos. De esta manera se instalaría un estado de tolerancia frente a los mismos. Como hemos discutido anteriormente, esta delección clonal ocurriría en el timo, aunque se ha postulado que existirían también procesos de selección pretímica(49,54-55).

Otros autores (222-224) postulan que la tolerancia por contacto temprano con un antígeno dependería de la presencia de linfocitos T supresores, con especificidad hacia el antígeno o hacia el receptor antígeno-específico de los linfocitos inmunes correspondientes. Este tipo de mecanismo podría participar no sólo de la instalación de la tolerancia frente a un antígeno durante la maduración del sistema inmune, sino también, y quizás principalmente, como un mecanismo de vigilancia permanente capaz de actuar frente a clones con reactividad hacia lo propio que podrían emerger en etapas posteriores de la vida del individuo (224). Otro tipo de mecanismo propuesto enfatiza la posibilidad del bloqueo de los receptores del antígeno por antígenos monovalentes, no

inmunogénicos(225). Este tipo de bloqueo ha sido demostrado especialmente en el compartimiento B. Es probable que los distintos mecanismos propuestos participen en forma sinérgica en el mantenimiento de la tolerancia frente a los antígenos propios, controlando la aparición de reacciones autoinmunes de tipo patológico.

La tolerancia por administración temprana de anticuerpos antiidiotípicos podría instalarse a través de dos tipos de mecanismos. En primer lugar, los anticuerpos antiidiotípicos interactuarían directamente con los receptores de las células efectoras, por ejemplo, las precursoras de células B antígeno-específicas, desarrollándose entonces un estado de supresión T dependiente y no transferible por pasaje de células T o B (226). El segundo tipo de supresión derivaría de la capacidad de los anticuerpos antiidiotípicos de estimular la proliferación de células T supresoras (227), y sus características incluyen ser T dependiente y transferible por células T a animales normales.

Más recientemente se ha demostrado la posibilidad de activar clones silenciosos a través de este tipo de inmunizaciones. En efecto, la inmunización de la madre con inmunoglobulinas antiidiotípicas específicas para un idiotipo no habitual para la cepa, determinaría la aparición en la cría de anticuerpos con dicho idiotipo (228-229), posiblemente a través de la eliminación de la supresión actuante sobre las células sintetizadoras de los

mismos por una respuesta de la madre frente a la inmunización de carácter anti-antiidiotípico.

En los circuitos inmunoregulatorios que incluyen estas interacciones idiotípicas y anti-idiotípicas, intervienen no solamente células B y anticuerpos, como fuera inicialmente postulado por Jerne (2), sino también células T portadoras de receptores idiotípicos y anti-idiotípicos, con efectos centrales en la regulación de la respuesta inmune (17-18).

Estos datos indican que, a través de diferentes mecanismos actuantes sobre los distintos compartimientos inmunes, los antígenos y células maternas que pasan de la madre a los hijos podrían ejercer una importante influencia en el desarrollo de su respuesta inmune.

MATERIALES Y METODOS

1. ANIMALES

Se utilizaron ratones de las cepas endocriadas BALB/c, AKR/J, AKR.M y DBA/2. A partir de combinaciones de estas cepas se obtuvieron los siguientes híbridos de la primera generación: F1(BALB/cxAKR.M), F1(AKR.MxBALB/c), F1(BALB/cxAKR/J), F1(AKR/JxBALB/c), F1(BALB/cxDBA/2) F1(DBA/2xBALB/c). Por convención se nombra primero la cepa materna y luego la cepa paterna.

En los casos en que se indica, se procedió a amamantar las crías F1 con nodrizas de la cepa paterna. Para ello se colocaron las hembras preñadas a término en jaulas especiales sobre un estante intermedio con piso enrejillado, de manera tal de evitar el contacto directo de las crías recién nacidas con sus madres. Dentro de las 4hs posteriores al nacimiento, los F1 recién nacidos fueron colocados en jaulas de parturientas recientes de la cepa paterna (hembras de la cepa paterna cruzadas con machos singeneicos), a las cuales se retiraba la cría propia, lográndose así el amamantamiento de los F1 por madres nodrizas de la cepa paterna. En la nomenclatura habitual se denomina a las crías amamantadas por nodriza con el nombre de su cepa seguido por el subíndice f y el nombre de la cepa de la madre nodriza. Las combinaciones utilizadas fueron: F1(BALB/cxAKR/J) y el correspondiente
fAKR/J
recíproco F1(AKR/JxBALB/c) .
fBALB/c

Salvo cuando se indica, se utilizaron animales adultos de ambos sexos entre 8 y 24 semanas de vida.

Todos los animales provenían del bioterio de la Sección Leucemia Experimental, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina.

2. PREPARACION DE LAS SUSPENSIONES CELULARES.

Los trozos de bazo o ganglios, según se indique, fueron pasados por mallas de alambre fino formando suspensiones en medio de cultivo MEM (Gibco). Estas suspensiones fueron luego pasadas a través de aguja finas dos o tres veces para mejorar la separación de las células. Las suspensiones celulares fueron centrifugadas a 900xg durante 8 minutos, ajustándose la concentración celular contando las células vivas por el método de exclusión por Azul Tripán y descartando los glóbulos rojos mediante tinción con Cristal Violeta. Cuando las suspensiones celulares se utilizaron para inocular animales en la almohadilla plantar o por vía e.v., las concentraciones celulares se ajustaron de manera tal que la dosis celular a inocular correspondiera a volúmenes de 0.05ml.

3. REACCION DE INJERTO CONTRA HUESPED.

3.1. Ensayo local de Ford y Simosen (117)

Ratones F1 adultos fueron inoculados en la almohadilla plantar derecha por via sub-cutánea con suspensiones celulares de bazo provenientes de animales de cada una de las cepas parentales. Se utilizaron en cada caso tres dosis de células parentales.

Siete días más tarde se procedió al sacrificio de los animales, disecando cuidadosamente los ganglios popliteos derecho e izquierdo, que fueron luego secados y pesados en una balanza Mettler, con una precisión de 0.01mg.

Se determinó la diferencia de peso entre cada par de ganglios como una medida de la capacidad alorreactiva de la cepa dadora frente a los antígenos de histocompatibilidad heredados por el F1 a partir de la otra cepa parental.

Los grupos estudiados fueron :

1. Niveles de alorreactividad T de esplenocitos de la cepa BALB/c en huéspedes F1(BALB/cxAKR/J) y F1(AKR/JxBALB/c).
2. Niveles de alorreactividad T de esplenocitos de la cepa AKR/J en huéspedes F1(BALB/cxAKR/J) y F1(AKR/JxBALB/c).

3. Niveles de alorreactividad T de esplenocitos de la cepa BALB/c en huéspedes F1(BALB/cxAKR.M) y F1(AKR.MxBALB/c).

4. Niveles de alorreactividad T de esplenocitos de la cepa AKR.M en huéspedes F1(BALB/cxAKR.M) y F1(AKR.MxBALB/c).

5. Niveles de alorreactividad T de esplenocitos de la cepa BALB/c en huéspedes F1(BALB/cxDBA/2) y F1(DBA/2xBALB/c).

6. Niveles de alorreactividad T de esplenocitos de la cepa DBA/2 en huéspedes F1(BALB/cxDBA/2) y F1(DBA/2xBALB/c).

4.INDUCCION DE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS T CON RECEPTORES PARA LOS AMH PROPIOS DE ORIGEN MATERNO Y PATERNO.

4.1.Supresión de reacciones de GvH local por inoculación e.v. de esplenocitos de la cepa parental.

De acuerdo con los trabajos de Wilson y col.(120-125) la inoculación e.v. de dosis bajas de esplenocitos o timocitos de una de las cepas parentales en un F1, determina en éste la inducción de la expansión clonal de células T con capacidad para reaccionar frente a los receptores T alorreactivos de la misma cepa parental inoculada.

Para estudiar comparativamente la inducción de

estos clones en los F1 híbridos recíprocos, se inocularon diferentes dosis de esplenocitos de cada cepa parental en forma e.v. y, cinco días más tarde, se desencadenó en estos animales una reacción de GvH local con esplenocitos de la misma cepa parental utilizada para inducir la protección. Siete días más tarde se determinaron las diferencias de peso de los ganglios poplíteos inoculados y sin inocular en los animales pretratados y en los controles.

Se estudió la modificación de los niveles de GvH local (% de supresión) por inoculación de diferentes dosis de esplenocitos e.v. de una cepa parental en los siguientes grupos experimentales:

1. Huéspedes F1(BALB/cxAKR/J) y F1(AKF/JxBALB/c) protegidos con diferentes dosis de esplenocitos BALB/c y desafiados con esplenocitos de la misma cepa parental.

2. Huéspedes F1(BALB/cxAKR.M) y F1(AKR.MxBALB/c) protegidos con diferentes dosis de esplenocitos BALB/c y desafiados con esplenocitos de la misma cepa.

5. REACCIONES DE GvH LOCAL SINGENEICO ENTRE F1 IDENTICOS Y RECIPROCOS.

5.1. Ensayo local.

Ratones híbridos F1 fueron inoculados en la almohadilla plantar derecha por vía subcutánea con suspensiones celulares de bazo provenientes de animales híbridos idénticos y de F1 recíprocos. Salvo en el caso en que se realizaron curvas de dosis respuesta, la dosis utilizada fue de 10×10^6 esplenocitos.

Siete días más tarde los animales fueron sacrificados, diseccionándose cuidadosamente los ganglios poplíteos derecho e izquierdo, que luego fueron secados y pesados en una balanza Mettler con una precisión de 0.01mg, estableciéndose la diferencia de peso entre cada par de ganglios como una medida del nivel de reconocimiento de los AH propios del híbrido dador y el híbrido receptor enfrentados mutuamente.

Los grupos estudiados fueron :

1. Esplenocitos de híbridos F1 (BALB/c x AKR/J) y F1 (AKR/J x BALB/c) en huéspedes F1 (BALB/c x AKR/J).
2. Esplenocitos de híbridos F1 (BALB/c x AKR/J) y F1 (AKR/J x BALB/c) en huéspedes F1 (AKR/J x BALB/c).
3. Esplenocitos de híbridos F1 (BALB/c x AKR.M) y F1 (AKR.M x BALB/c) en huéspedes F1 (BALB/c x AKR.M).
4. Esplenocitos de híbridos F1 (BALB/c x AKR.M) y F1 (AKR.M x BALB/c) en huéspedes F1 (AKR.M x BALB/c).
5. Esplenocitos de híbridos F1 (DBA/2 x BALB/c) y

F1(BALB/cxDBA/2) en huéspedes F1(DBA/2xBALB/c).

6. Esplenocitos de híbridos F1(DBA/2xBALB/c) y F1(BALB/cxDBA/2) en huéspedes F1(BALB/cxDBA/2).

5.2. Pretratamiento del injerto con mitomicina-C.

Para investigar la participación del injerto en las reacciones de GVH singéneico determinadas por la inoculación de células del híbrido recíproco se realizaron ensayos pretratando las células del injerto con mitomicina-C (Sigma) en concentraciones de $33 \mu\text{g/ml}$ cada 10^7 células durante 45 minutos a 37 grados C. Los esplenocitos se lavaron luego tres veces con medio de cultivo, con incubaciones intermedias de 5 minutos.

Se estudiaron las siguientes combinaciones de cepas :

1. Esplenocitos de híbridos F1(BALB/cxAKR/J) pretratados con mitomicina-C en huéspedes F1(AKR/JxBALB/c).

2. Grupo control: esplenocitos de F1(BALB/cxAKR/J) sin pretratamiento en huéspedes F1(AKR/JxBALB/c).

3. Esplenocitos de híbridos F1(AKR/JxBALB/c) pretratados con mitomicina-C en huéspedes F1(BALB/cxAKR/J).

4. Grupo control: esplenocitos de F1(AKR/JxBALB/c) sin pretratar en huéspedes F1(BALB/cxAKR/J).

5.3. Pasaje de células por columna de lana de nylon (230).

Con la finalidad de obtener poblaciones celulares enriquecidas en células T, se filtraron suspensiones esplénicas a través de columnas de lana de nylon. La lana fue prelavada en ClH 0.1N por ebullición durante 30 minutos y enjuagada luego por pasaje por agua bidestilada durante 5 días, con dos cambios diarios de agua. Se secó luego el material durante 2 días en estufa a 37 grados C. La lana fue peinada hasta eliminar todos los nudos. Como soporte de las columnas se utilizaron jeringas de 10ml que se llenaron hasta el nivel de los 7ml con 0.7g de lana de nylon. Las columnas se equilibraron luego con RPMI 1640 suplementado con 5% de SBF y se incubaron durante 1 hora a 37 grados C.

8

Los esplenocitos, (10⁸ en un volumen de 2ml), se depositaron en el tope de la columna y ésta fue incubada durante 45 minutos a 37 grados C, agregándose 2ml de medio de cultivo en pequeñas alícuotas para evitar la desecación.

Las células no adherentes a la lana de nylon fueron eluidas con 10ml de medio de cultivo a una velocidad de flujo de una gota cada 10 segundos.

Estas células no adherentes fueron utilizadas para desencadenar reacciones de GvH singéneico entre híbridos idénticos y recíprocos. Se comparó la actividad de

un inóculo normal de 10×10^6 esplenocitos totales con la actividad de un inóculo de 2×10^6 esplenocitos enriquecidos en células T. lo que corresponde a la cantidad de esplenocitos que se eluyen de una columna a partir de 10×10^6 células sembradas.

Los grupos estudiados fueron :

1. Injerto de esplenocitos no adherentes a lana de nylon de híbridos F1 (AKR/JxBALB/c) en huéspedes F1 (BALB/cxAKR/J).

2. Grupo control: injerto de esplenocitos totales de híbridos F1 (AKR/JxBALB/c) en huéspedes F1 (BALB/cxAKR/J).

5.4. Reacciones de GvH singeneico entre híbridos idénticos y recíprocos amamantados por nodrizas de la cepa paterna.

Se desarrollaron reacciones de GvH singeneico utilizando como injerto esplenocitos de híbridos F1 amamantados por nodrizas de la cepa paterna. En la almohadilla plantar contralateral se inocularon esplenocitos del híbrido idéntico al huésped o bien esplenocitos del híbrido idéntico al dador.

Los grupos estudiados fueron :

1. En huéspedes F1 (BALB/cxAKR/J), en la almohadilla plantar

derecha, injerto de esplenocitos F1(BALB/cxAKR/J) .
fAKR/J
Injerto contralateral: F1(BALB/cxAKR/J).

2. En huéspedes F1(BALB/cxAKR/J), en la almohadilla plantar
derecha, injerto de esplenocitos F1(AKR/JxBALB/c) .
fBALB/C
Injerto contralateral: F1(BALB/cxAKR/J).

3. En huéspedes F1(AKR/JxBALB/c), en la almohadilla plantar
derecha, injerto de esplenocitos F1(BALB/cxAKR/J) .
fAKR/J
Injerto contralateral: F1(AKR/JxBALB/c).

4. En huéspedes F1(AKR/JxBALB/c), en la almohadilla plantar
derecha, injerto de esplenocitos F1(AKR/JxBALB/c) .
fBALB/c
Injerto contralateral: F1(BALB/cxAKR/J).

6. CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS SINGENEICO .

Los cultivos se llevaron a cabo en microplacas de fondo redondo. La población respondedora consistió en 8×10^5 esplenocitos F1 enriquecidos en células T por pasaje a través de columnas de lana de nylon como se ha descrito (ver punto 5.3). La población respondedora estuvo representada en cada caso por 5×10^5 esplenocitos del híbrido idéntico o del recíproco, pretratados con mitomicina-C (ver punto 5.2.)

Todos los cultivos se desarrollaron en medio

RPMI 1640 (Gibco Lab.) suplementado con 10% de SBF (Gibco Lab), 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol (Sigma), glutamina 2mM (Sigma) y antibióticos, manteniéndose en estufa de 37 grados C en atmósfera húmeda y gaseada con 5% de CO₂ durante 5 días. 16 horas antes de la recolección se agregó en cada pozo 1 μ Ci de timidina ³H (actividad específica 2001mM, New England Nuclear, USA). La recolección se llevó a cabo en forma automática sobre papel Watman GF/A, que se colocó luego en viales con líquido de centelleo. La radioactividad se midió en un contador de centelleo líquido Packard 3002.

6.1. CMLS entre híbridos idénticos y recíprocos.

Desarrollamos ensayos de CMLS utilizando como poblaciones estimuladoras esplenocitos del F1 idéntico o del F1 recíproco respecto de la población respondedora.

Los grupos estudiados fueron:

1. Esplenocitos no adherentes a lana de nylon del F1 (AKR/JxBALB/c) frente a esplenocitos totales de híbridos F1 (AKR/JxBALB/c) pretratados con mitomicina-C.

2. Esplenocitos no adherentes a lana de nylon del F1 (AKR/JxBALB/c) frente a esplenocitos totales de híbridos F1 (BALB/cxAKR/J) pretratados con mitomicina-C.

3. Control a : esplenocitos F1 (BALB/c x AKR/J) pretratados con mitomicina-C.

4. Control b : esplenocitos F1 (AKR/J x BALB/c) pretratados con mitomicina-C.

5. Control c : esplenocitos no adherentes a lana de nylon del F1 (AKR/J x BALB/c).

6.2. Ensayos de CMLS entre F1 normales y F1 amamantados por nodrizas de la cepa paterna.

Estudiamos los niveles de proliferación determinados por el enfrentamiento in vitro de esplenocitos de F1 normales no adherentes a lana de nylon con poblaciones esplénicas totales del F1 idéntico normal, el F1 idéntico amamantado por nodriza, el F1 recíproco normal y el F1 recíproco amamantado por nodriza.

Como población respondedora se utilizaron en todos los casos esplenocitos no adherentes a lana de nylon del F1 (AKR/J x BALB/c); las poblaciones estimuladoras, pretratadas con mitomicina-C, fueron:

1. Esplenocitos del F1 (AKR/J x BALB/c).

2. Esplenocitos del F1 (BALB/c x AKR/J).

3. Esplenocitos del F1 (AKR/J x BALB/c) .
f BALB/c

4. Esplenocitos del F1 (BALB/c x AKR/J) .
fAKR/J

Se llevaron a cabo controles cultivando células respondedoras y células estimuladoras, como en el punto anterior.

7. CRECIMIENTO DE TUMORES LINFOIDEOS DE ORIGEN PARENTAL EN F1 RECÍPROCOS.

Dos leucemias de tipo linfóideo, la leucemia L15 y la leucemia LB fueron inoculadas en forma de suspensiones celulares por vía s.c. en animales F1 recíprocos para los cuales una de las cepas parentales correspondía a la cepa de origen del tumor. Los animales quedaron en observación diaria hasta su muerte y se determinó en cada caso la curva de crecimiento tumoral por medición de los diámetros mayor y menor con calibre, y el porcentaje de mortalidad acumulativo. Como en todos los casos la mortalidad fue del 100%, se calcularon los promedios de días de supervivencia.

Linfoma AKR (L15).

De origen espontáneo en la cepa AKR/J, se mantiene por pasaje subcutáneo en animales de la cepa de origen. Actualmente se utilizan pasajes entre el 180 y el 190.

Leucemia BALB/c (LB).

Leucemia linfóidea de origen espontáneo en la

cepa BALB/c de nuestro laboratorio. Mantenido por pasaje subcutáneo en animales de la cepa de origen. Actualmente se utilizan pasajes entre el 50 y el 90.

Ambos tumores crecen in situ hasta alcanzar gran tamaño y en la autopsia se encuentra infiltración leucémica en nódulos linfáticos, bazo e hígado.

8. PLANTEO EXPERIMENTAL Y ESTADÍSTICO.

En todos los casos en los que se compararon parámetros experimentales en pares de F1 recíprocos, grupos de ratones de los correspondientes F1 recíprocos fueron incluidos en cada ensayo, de manera de comparar la respuesta de los híbridos recíprocos en las mismas condiciones experimentales. Se utilizaron además, en cada experimento, ratones de la misma edad y sexo.

En los estudios estadísticos se utilizó el test "t" de Student.

RESULTADOS

1. REACCIONES DE INJERTO CONTRA HUESPED LOCAL DE ESLENOCITOS DE LAS CEPAS PARENTALES FRENTE A HIBRIDOS F1 RECIPROCOS.

Se estudiò la capacidad de desencadenar reacciones locales de GvH por parte de esplenocitos de las dos cepas parentales sobre los hibridos reciprocos correspondientes.

Cuando se comparò la capacidad de desencadenar reacciones de GvH de cada una de las cepas parentales en los pares de hibridos correspondientes, se pudieron detectar diferencias significativas en la reactividad frente a los F1 reciprocos de por lo menos una de las cepas parentales en cada par de hibridos. Estas diferencias se observaron en combinaciones de cepas que diferian tanto en sus AMH como en los AmH y también en una combinación de cepas que no diferian en sus AMH sino solamente en los AmH, incluyendo el locus Mls.

1.1.a. Reacción de GvH con esplenocitos BALB/c en hibridos F1(BALB/cxAKR.M) y F1(AKR.MxBALB/c).

Como puede observarse en la Tabla 1 y Figura 12, cuando se utilizaron dosis de $2, 4$ y 10×10^6 esplenocitos para desencadenar las reacciones de GvH local en los huéspedes F1(BALB/cxAKR.M) y F1(AKR.MxBALB/c), se

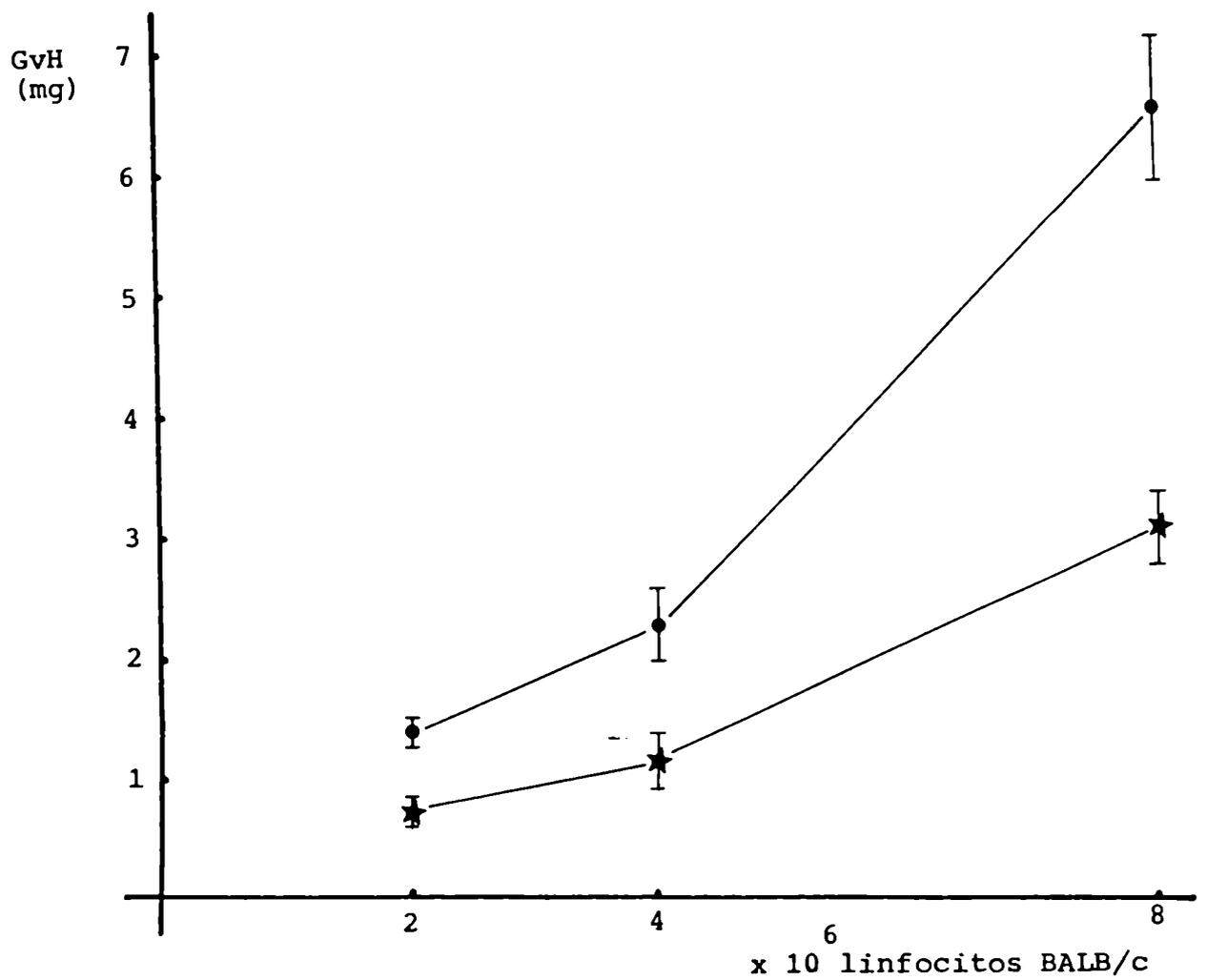


Figura 12 : Reacción de GvH con linfocitos BALB/c en huéspedes F1(BALB/c x AKR.M)★ y F1(AKR.M x BALB/c)●

TABLA 1

REACCIONES LOCALES DE GvH EN HIBRIDOS F1 RECIPROCOS. Injerto de esplenocitos BALB/c en F1 (BALB/cxAKR.M) y F1 (AKR.MxBALB/c).

Dosis de esplenocitos BALB/c	a GvH en H U E S F E D E S		pb
	F1 (AKR.MxBALB/c)	F1 (BALB/cxAKR.M)	
⁶ 2x10	1.36±0.14 (8)	0.72±0.14 (12)	<0.001
⁶ 4x10	2.24±0.31 (6)	1.14±0.25 (6)	<0.02
⁶ 8x10	6.40±0.60 (9)	3.10±0.30 (10)	<0.001

a: diferencia de peso de los ganglios popliteos derecho e izquierdo siete días después de la inoculación de esplenocitos BALB/c en la almohadilla plantar derecha. Expresado como promedio en mg ± ES (número de animales).

b: calculado por el "t" de Student.

observaron diferencias significativas ($p < 0.001$ y $p < 0.02$) en los valores de GvH local de los huéspedes F1 recíprocos, siendo mayor la reactividad de GvH en los híbridos F1(AKR.MxBALB/c) que en sus recíprocos F1(BALB/cxAKR.M).

1.1.b.Reacción de GvH de esplenocitos AKR.M en híbridos F1(BALB/cxAKR.M) y F1(AKR.MxBALB/c).

Se ensayaron las dosis de 2.5, 5 y 10×10^6 esplenocitos de la cepa AKR.M en los híbridos recíprocos F1(BALB/cxAKR.M) y F1(AKR.MxBALB/c). En ninguna de las dosis ensayadas se encontraron diferencias significativas en los valores de GvH local. Los resultados se observan en la Tabla 2.

1.2.a.Reacción de GvH con esplenocitos BALB/c en híbridos F1(BALB/cxAKR/J) y F1(AKR/JxBALB/c).

La inoculación de 2 y 4×10^6 esplenocitos de la cepa BALB/c en la almohadilla plantar de híbridos F1(BALB/cxAKR/J) y F1(AKR/JxBALB/c) determinó reacciones de GvH significativamente mayores en el segundo híbrido ($p < 0.001$). Dosis mayores (10×10^6 esplenocitos BALB/c), determinaron niveles de GvH similares, con diferencias no significativas (NS) entre ambos híbridos (Tabla 3 y Figura 13)

TABLA 2

REACCIONES LOCALES DE GvH EN HIBRIDOS F1 RECIPROCOS. Injerto de esplenocitos AKR.M en F1(BALB/cxAKR.M) y F1(AKR.MxBALB/c).

Dosis de esplenocitos AKR.M	a GvH en H U E S P E D E S		pb
	F1 (AKR.MxBALB/c)	F1 (BALB/cxAKR.M)	
2x10 ⁶	1.68±0.26 (8)	2.10±0.19 (8)	NS
5x10 ⁶	3.62±0.24 (9)	3.84±0.48 (8)	NS
10x10 ⁶	4.92±0.48 (10)	5.39±0.49 (8)	NS

a:diferencia de peso de los ganglios popliteos derecho e izquierdo siete días después de la inoculación de esplenocitos AKR.M en la almohadilla plantar derecha. Expresado como promedio en mg±ES (número de animales)

b:calculado por el "t" de Student.

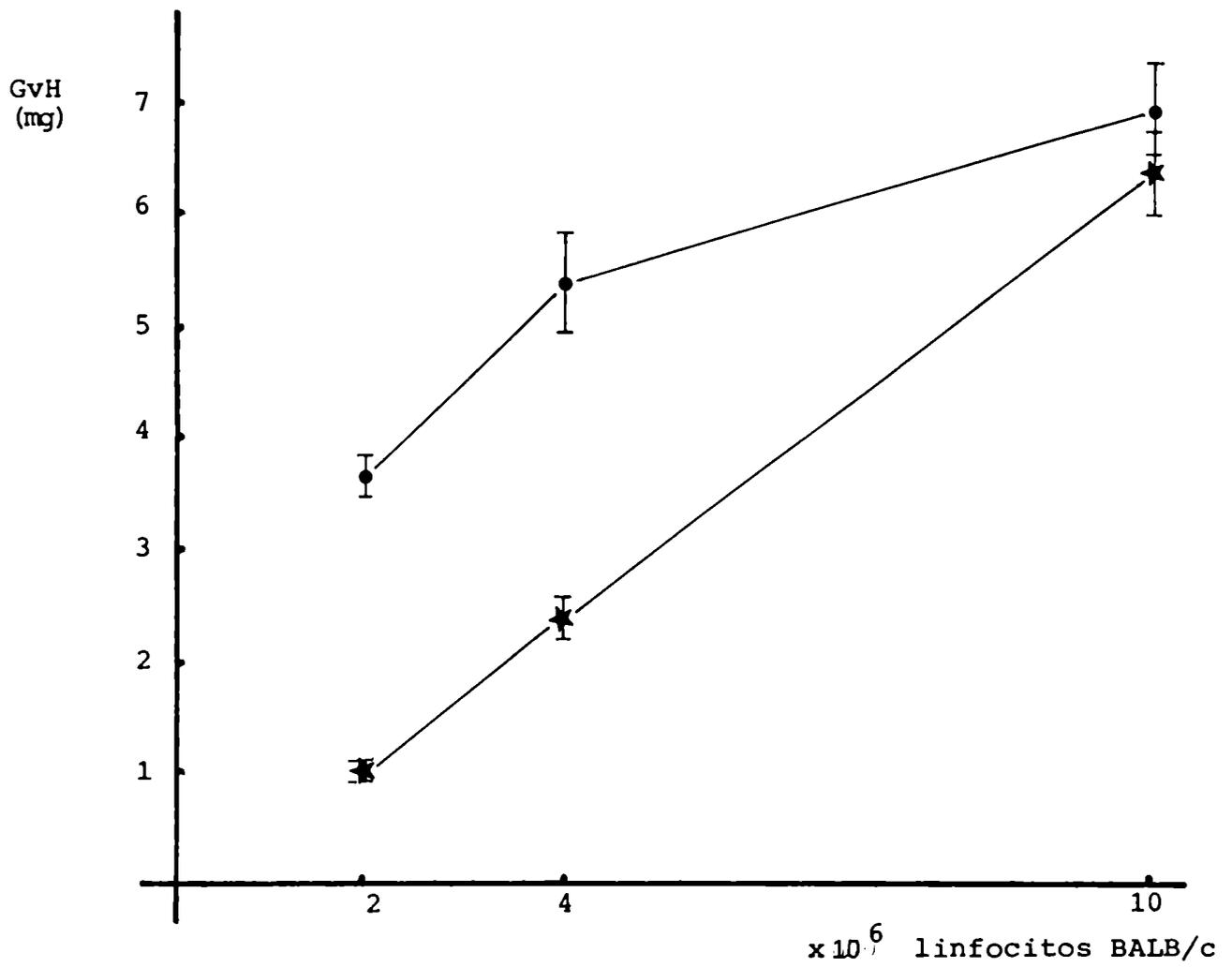


Figura 13 : Reacción de GvH con esplenocitos BALB/c en huéspedes F1(BALB/cxAKR/J) ★ y F1(AKR/JxBALB/c) ●

TABLA 3

REACCIONES LOCALES DE GvH EN HIBRIDOS F1 RECIPROCOS. Injerto de esplenocitos BALB/c en F1 (BALB/cxAKR/J) y F1 (AKR/JxBALB/c).

Dosis de esplenocitos BALB/c	a		b
	GvH en F1 (AKR/JxBALB/c)	H U E S P E D E S F1 (BALB/cxAKR/J)	
⁶ 2x10	3.6±0.16 (8)	1.01±0.08 (7)	<0.001
⁶ 4x10	5.38±0.46 (8)	2.37±0.20 (8)	<0.001
⁶ 10x10	6.95±0.43 (6)	6.4±0.37 (7)	NS

a: diferencia de peso de los ganglios popliteos derecho e izquierdo siete días después de la inoculación de esplenocitos BALB/c en la almohadilla plantar derecha. Expresado como promedio en mg ± ES (número de animales).

b: calculado por el "t" de student.

1.2.b.Reacción de GvH con esplenocitos AKR/J en híbridos F1(BALB/cx AKR/J) y F1(AKR/JxBALB/c).

Como puede observarse en la Tabla 4, los niveles de GvH local desencadenados por 2.5, 5 y 10×10^6 esplenocitos de la cepa AKR/J en los híbridos recíprocos entre esta cepa y BALB/c, fueron similares para ambos híbridos, obteniéndose valores de GvH que no diferían significativamente.

1.3.a.Reacción de GvH con esplenocitos BALB/c en híbridos F1(BALB/cxDBA/2) y DBA/2xBALB/c).

Los resultados pueden observarse en la Tabla 5 y en la Figura 14. En las tres dosis ensayadas, se obtuvieron valores de GvH significativamente mayores ($p < 0.001$) en los F1(DBA/2xBALB/c). En este caso, las cepas utilizadas como parentales difieren entre sí solamente en sus d a d AmH, incluyendo al locus Mls (BALB/c:H-2^b, Mls; DBA/2:H-2^d, Mls).

1.3.b.Reacción de GvH con esplenocitos DBA/2 en híbridos F1(BALB/cxDBA/2) y F1(DBA/2xBALB/c).

Como puede observarse en la Tabla 6, los valores de GvH determinados por la inoculación de esplenocitos de la cepa DBA/2, resultaron similares en los F1 recíprocos

TABLA 4

REACCIONES LOCALES DE GvH EN HIBRIDOS F1 RECIPROCOS. Injerto de esplenocitos AKR/J en F1(BALB/cxAKR/J) y F1(AKR/JxBALB/c).

Dosis de esplenocitos AKR/J	a		b P
	GvH en	H U E S P E D E S	
	F1 (AKR/JxBALB/c)	F1 (BALB/cxAKR/J)	
2.5x10 ⁶	0.66±0.17 (6)	1.06±0.26 (7)	NS
5.0x10 ⁶	1.38±0.32 (11)	1.55±0.26 (11)	NS
10x10 ⁶	2.12±0.83 (6)	1.43±0.36 (6)	NS

a:diferencia de peso de los ganglios popliteos derecho e izquierdo siete días después de la inoculación de esplenocitos AKR/J en la almohadilla plantar derecha. Expresado como promedio en mg ± ES (número de animales).

b:calculado por el "t" de Student.

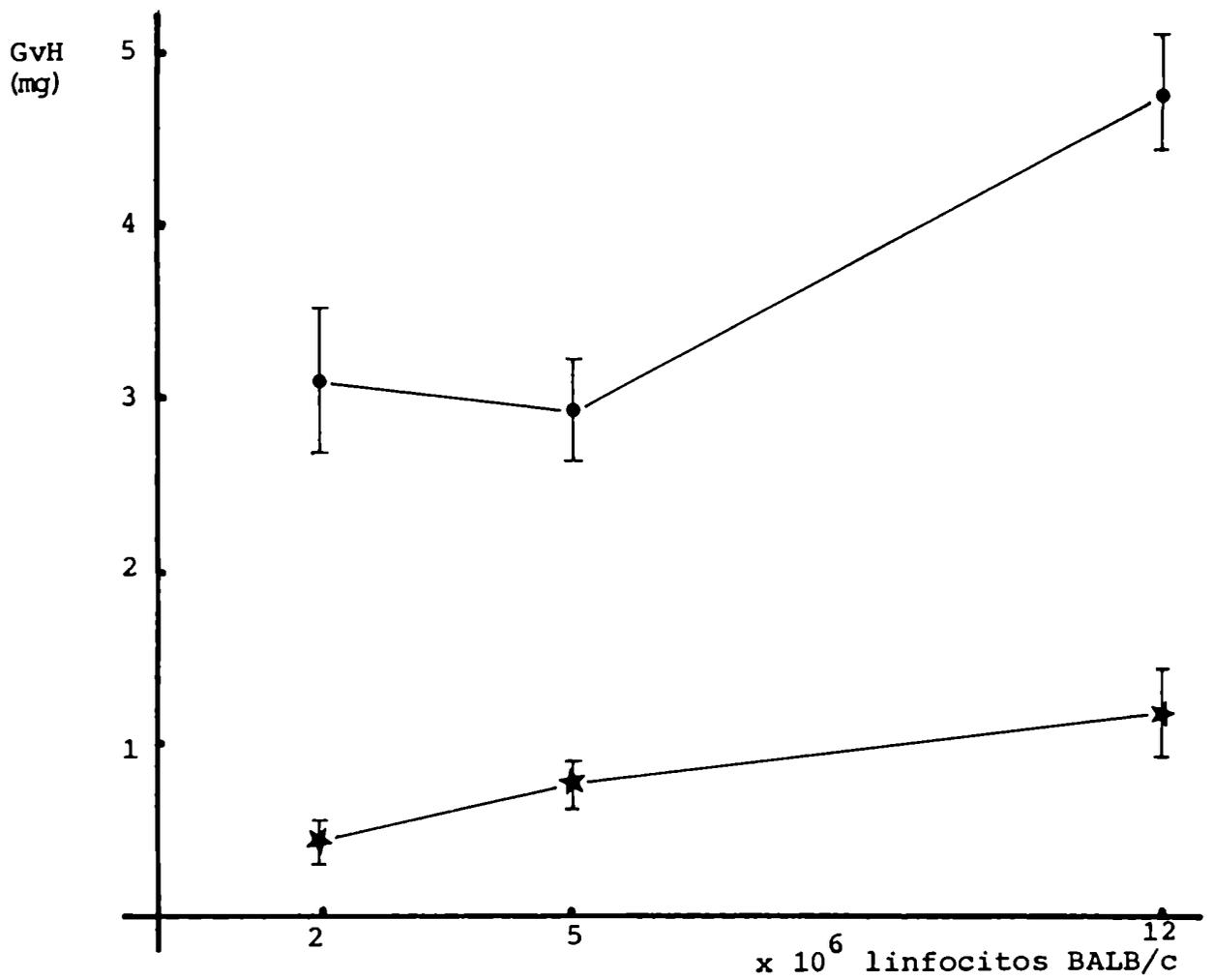


Figura 14 : Reacción de GvH con linfocitos BALB/c en huéspedes F1(BALB/c x DBA/2)★ y F1(DBA/2 x BALB/c)●

TABLA 5

REACCIONES LOCALES DE GvH EN HIBRIDOS F1 RECIPROCOS. Injerto de esplenocitos BALB/c en F1(BALB/cxDBA/2) y F1(DBA/2xBALB/c).

Dosis de esplenocitos BALB/c	a		b p
	GvH en F1 (DBA/2xBALB/c)	H U E S F E D E S F1 (BALB/cxDBA/2)	
2x10 ⁶	3.08±0.40 (9)	0.41±0.12 (8)	<0.001
5x10 ⁶	2.91±0.30 (8)	0.75±0.13 (8)	<0.001
12x10 ⁶	4.75±0.32 (8)	1.18±0.26 (9)	<0.001

a: diferencia de pesos de los ganglios popliteos derecho e izquierdo siete días después de la inoculación de esplenocitos BALB/c en la almohadilla plantar derecha. Expresado como promedio en mg + ES (número de animales).

b: calculado por el "t" de Student.

TABLA 6

REACCIONES LOCALES DE GvH EN HIBRIDOS FI RECIPROCOS. Injerto de esplenocitos DBA/2 en F1(BALB/cxDBA/2) y F1(DBA/2xBALB/c).

Dosis de esplenocitos DBA/2	a		b p
	GvH en F1 (DBA/2xBALB/c)	H U E S F E D E S F1 (BALB/cxDBA/2)	
2.5×10^6	0.25±0.12 (6)	0.22±0.09 (6)	NS
5×10^6	0.29±0.06 (8)	0.31±0.09 (8)	NS
10×10^6	0.49±0.11 (8)	0.55±0.08 (9)	NS

a: diferencia de peso de los ganglios popliteos derecho e izquierdo siete días después de la inoculación de esplenocitos DBA/2 en la almohadilla plantar derecha. Expresado como promedio en mg ± ES (número de animales).

b: calculado por el "t" de Student

F1(BALB/cxDBA/2) y F1(DBA/2xBALB/c). En ninguna de las dosis ensayadas se observaron diferencias significativas.

2. NIVELES DE PROTECCION FRENTE A GvH LOCALES DETERMINADOS POR LA INOCULACION E.V. DE LINFOCITOS PARENTALES.

Estudiamos la inducción de protección frente al injerto de esplenocitos de una cepa parental en los F1 recíprocos. La protección de los huéspedes se logra a través de la inoculación e.v. de esplenocitos de la misma cepa parental con la que se desencadenará posteriormente el GvH. Esta inmunización determina en los huéspedes la proliferación de clones de células T con actividad hacia los receptores T alorreactivos dirigidos hacia los AMH de la otra cepa parental del F1. Estos clones T, por lo tanto, tendrán capacidad de suprimir las reacciones de GvH desencadenadas en estos huéspedes con linfocitos de la misma cepa parental. Cuando estudiamos la inducción de protección en los pares de F1 recíprocos encontramos diferencias significativas en las combinaciones de cepas estudiadas.

2.1. Niveles de protección frente al GvH de esplenocitos BALB/c en híbridos F1(BALB/cxAKR/J) y F1(AKR/JxBALB/c).

La inoculación e.v. de esplenocitos BALB/c en huéspedes F1(BALB/cxAKR/J) y F1(AKR/JxBALB/c) determinó

que los valores de GvH desencadenados por esplenocitos de la misma cepa parental BALB/c disminuyera significativamente en ambos híbridos (Tabla 7, Fig 15). Los niveles de protección observados en ambos híbridos fueron significativamente diferentes, siendo mayores los observados en el híbrido F1(AKR/JxBALB/c); en este F1 todas las dosis de protección ensayadas determinaron disminuciones significativas sobre los valores de GvH control (sin protección). En el híbrido recíproco F1(BALB/cxAKR/J), la dosis de protección e.v. de 5×10^6 no determinó una disminución significativa sobre los niveles de GvH control, mientras que sí lo hicieron las dosis de 7.5 , 10 y 20×10^6 esplenocitos.

2.2. Niveles de protección frente al GvH de esplenocitos BALB/c en híbridos recíprocos F1(BALB/cxAKR.M) y F1(AKR.MxBALB/c).

La inoculación e.v. de esplenocitos BALB/c en híbridos F1(BALB/cxAKR.M) y F1(AKR.MxBALB/c) determinó una supresión significativa de la reacción de GvH desencadenada 5 días más tarde por esplenocitos de la misma cepa BALB/c. Se observaron diferencias significativas en los niveles de supresión del GvH determinados en los híbridos recíprocos (Tabla 8, Figura 16). En los F1(AKR.MxBALB/c), las dosis de 5 , 7.5 y 10×10^6 esplenocitos e.v. determinaron disminuciones significativas de los valores de GvH local

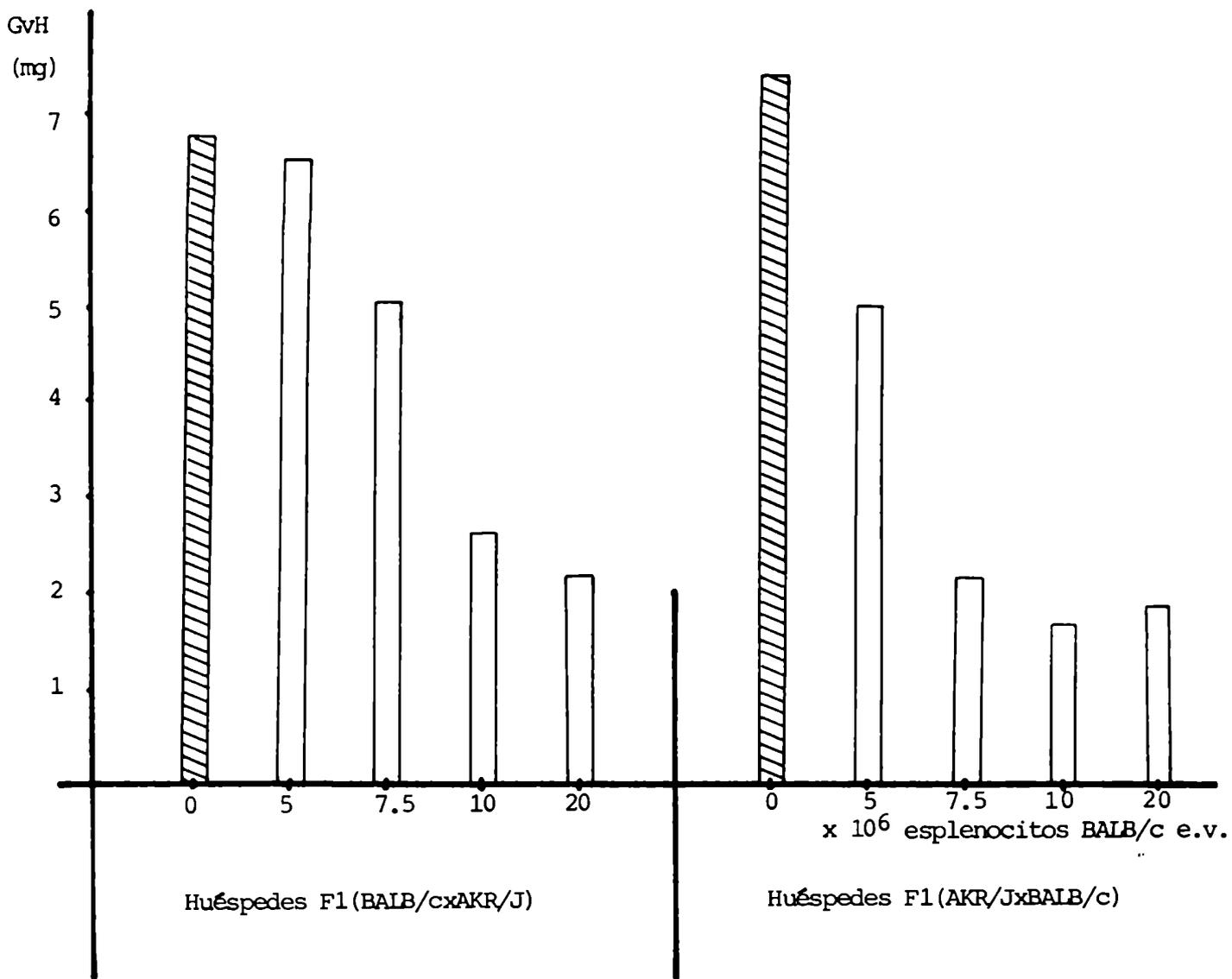


Figura 15 : inducción de protección frente al GvH de una cepa parental (BALB/c) por inoculación e.v. previa de esplenocitos de la misma cepa parental. Se graficaron los resultados de un experimento representativo.

TABLA 7

PROTECCION FRENTE AL GvH local POR INOCULACION E.V. DE ESPLENOCITOS PARENTALES. Inducción de protección frente al GvH local de BALB/c en F1(BALB/cxAKR/J) y F1(AKR/JxBALB/c) .

PRETRAT. BALB/c E.V.	a	b		p
		% de SUPRESION del GvH BALB/c en huéspedes F1(BALB/cxAKR/J) F1(AKR/JxBALB/c)		
5x10 ⁶		0±5%	45±9%	<0.001
7.5x10 ⁶	*	22±4%	75±8%	<0.001
10x10 ⁶		46±7%	74±9%	<0.01
20x10 ⁶		65±8%	75±6%	NS

*: NS respecto al control

a: dosis de esplenocitos de la cepa BALB/c inoculados en forma e.v. el día -5.

b: % de supresión±ES de las reacciones de GvH desencadenadas por 10x10⁶ esplenocitos BALB/c respecto del control sin protección. Los resultados son el promedio de tres experimentos en los que se utilizaron al menos 4 animales por grupo.

c: calculado por "t" de Student.

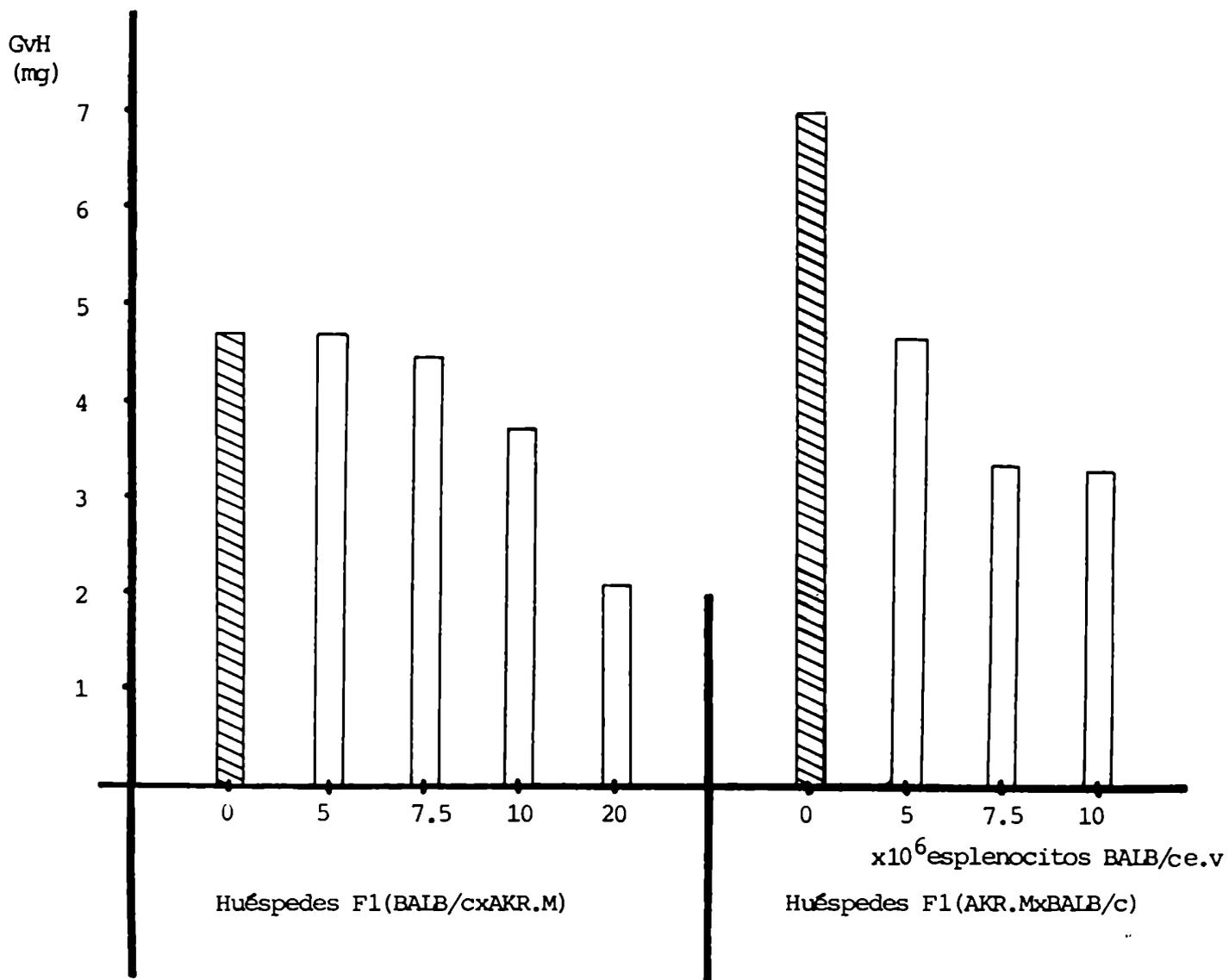


Figura 16 : inducción de protección frente al GvH de una cepa parental (BALB/c) por inoculación e.v. previa de esplenocitos de la misma cepa parental. Se graficaron los resultados de un experimento representativo.

TABLA 8

PROTECCION FRENTE AL GvH local POR INOCULACION E.V. DE
ESPLENOCITOS PARENTALES. Inducción de protección
frente al GvH local de BALB/c en F1(BALB/cxAKR.M) y
F1(AKR.MxBALB/c) .

PRETRAT. BALB/C E.V.	a	b		p
		% de SUPRESION del GvH BALB/c en huéspedes		
		F1(BALB/cxAKR.M)	F1(AKR.MxBALB/c)	
5x10 ⁶		0±3%	34±4%	<0.001
7.5x10 ⁶		0±4%	54±6%	<0.001
10x10 ⁶		20±7% *	56±9%	<0.01
20x10 ⁶		55±7%	ND	

*: NS respecto del control

a: dosis de esplenocitos de la cepa BALB/c inoculados en
forma e.v. el día -5.

b: % de supresión de las reacciones de GvH desencadenadas
por 10x10⁶ esplenocitos BALB/c respecto del control sin
protección. Los resultados son el promedio de tres experi-
mentos en los que se utilizaron al menos 4 animales por grupo.

c: calculado por "t" de Student.

(entre el 33 y el 58%). En el híbrido recíproco, en cambio, solamente una dosis de 20×10^6 esplenocitos por vía e.v. fue capaz de inducir una disminución significativa ($p < 0.001$, supresión del 53%) frente al GvH desencadenado por la cepa parental BALB/c.

3. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE TUMORES DE ORIGEN PARENTAL EN HÍBRIDOS RECÍPROCOS.

Estudiamos la cinética de crecimiento los índices de mortalidad determinados en pares de F1 recíprocos por el desarrollo de tumores de una de las cepas parentales. Pudimos determinar la existencia de diferencias significativas en los parámetros citados en uno de los tumores estudiados (LB), cuya cepa de origen, BALB/c, había mostrado diferencias significativas en los valores de GvH cuando se estudió su reactividad en el mismo par de híbridos recíprocos.

3.1.a. Crecimiento del linfoma LB en híbridos F1 (BALB/c x AKR/J) y F1 (AKR/J x BALB/c).

Como puede observarse en la Tabla 10, el tumor LB, originado en la cepa BALB/c, alcanzó tamaños significativamente mayores ($p < 0.001$) en los híbridos F1 (BALB/c x AKR/J) que en sus recíprocos F1 (AKR/J x BALB/c). Las curvas de mortalidad acumulativa (Tabla 9 y Figura 17)

TABLA 9

CRECIMIENTO DE TUMORES PARENTALES EN HIBRIDOS RECÍPROCOS.

Linfoma LB en F1(BALB/cxAKR/J) y F1(AKR/JxBALB/c).

DIA	H U E S P E D E S ^a		b p
	F1(AKR/JxBALB/c)	F1(BALB/cxAKR/J)	
6	110±30 ^c	115±58	NS
9	254±28	428±27	<0.001
12	524±33	642±19	<0.001
13	536±29	749±35	
14	599±57	NECROSIS	

6

a : Se inocularon 2×10^6 células de LB s.c. en el flanco derecho de 11 F1(AKR/JxBALB/c) y 15 F1(BALB/cxAKR/J).

b : calculado por el "t" de Student. NS=no significativo.

c : Se midieron los diámetros mayor y menor y se calculó el área. Expresado en $mm^2 \pm ES$.

TABLA 10

MORTALIDAD ACUMULATIVA DE F1 RECIPROCOS POR LINFOMAS DE UNA CEPA PARENTAL. Mortalidad de F1 (BALB/cxAKR/J) y F1 (AKR/JxBALB) inoculados con LB.

DIA	H U E S P E D E S a			
	F1 (AKR/JxBALB/c)		F1 (BALB/cxAKR/J)	
13			^b 1/15	^c 6%
14	2/11	18%	7/15	46%
15	3/11	27%	11/15	73%
16	4/11	36%	12/15	80%
17			14/15	93%
19	5/11	45%		
21	6/11	54%	15/15	100%
23	6/11	70%		
24	10/11	91%		
//				
32	11/11	100%		
	xmv: 20.45 ± 1.59		xmv: 15.2 ± 0.5 p < 0.01	

6

a : Se inocularon 2x10⁶ células de LB en 11 hembras hembras F1 (AKR/JxBALB/c) y 15 F1 (BALB/cxAKR/J)

b : animales muertos/total.

c : % de mortalidad acumulativa.

xmv : promedio de días de sobrevivida post-inoculación ± ES.
La significación se calculó por el "t" de Student.

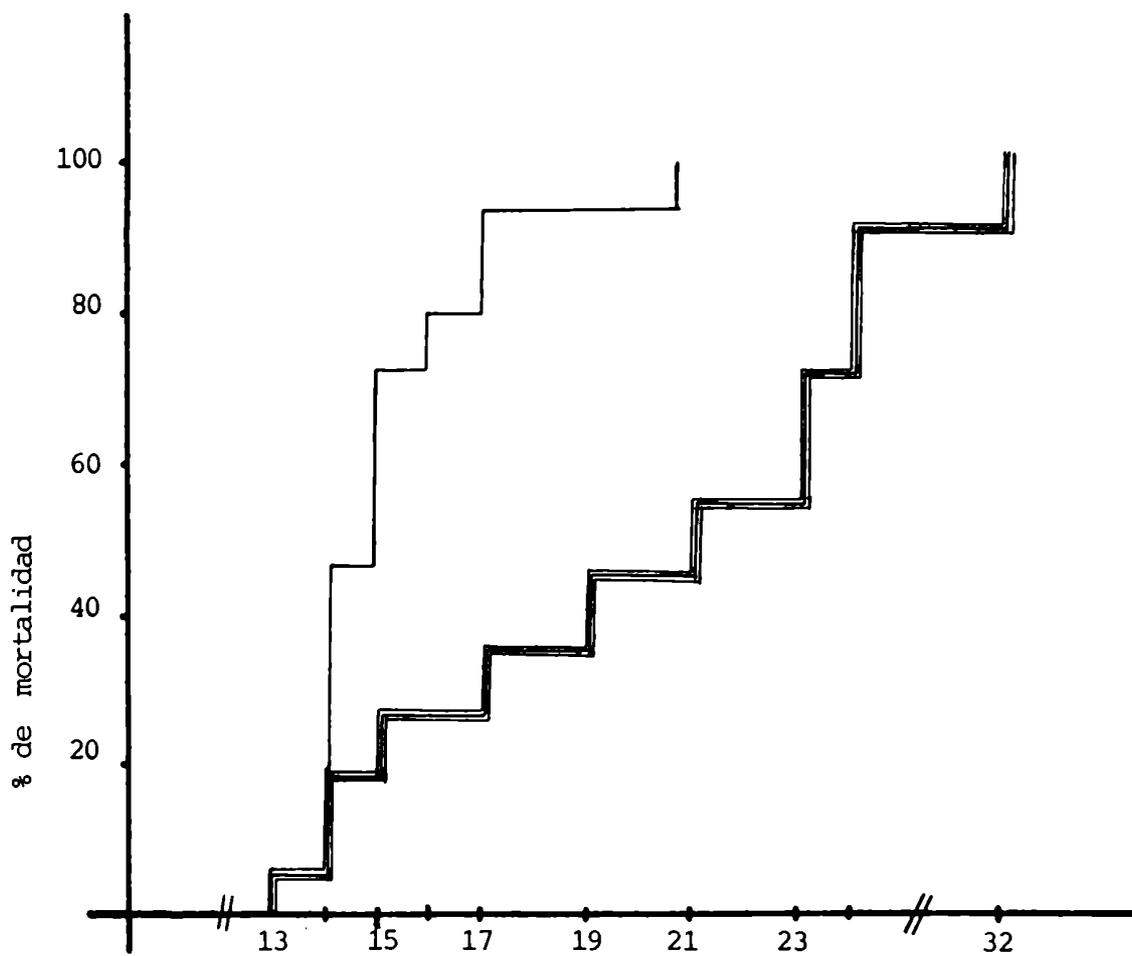


Figura 17 : % de mortalidad determinada por la inoculación de 2×10^6 células del tumor LB en F1(AKR/JxBALB/c) \equiv y en F1 (BALB/cxAKR/J) \blacksquare .

reflejaron también esta diferencia en el crecimiento tumoral, siendo significativamente mayor ($p < 0.01$) la mortalidad observada en los híbridos F1(BALB/cxAKR/J) que en los correspondientes recíprocos.

3.1.b.Crecimiento de tumores L15 en híbridos F1(BALB/cxAKR/J) y F1(AKR/JxBALB/c).

El crecimiento del linfoma L15, originado en la cepa AKR/J, no mostró diferencias significativas en los híbridos recíprocos estudiados (Tabla 11). Las curvas de mortalidad acumulativa de ambos híbridos (Tabla 12 y Figura 18) tampoco mostraron diferencias significativas.

4.REACCIONES DE GvH LOCAL SINGENEICO ENTRE HIBRIDOS IDENTICOS Y RECIPROCOS.

Cuando se desarrollaron ensayos de GvH local singeneico inoculando en la almohadilla plantar de adultos F1 esplenocitos del híbrido idéntico y del recíproco, se observó que, en las combinaciones de cepas estudiadas, los niveles de GvH singeneico determinados por el híbrido recíproco eran mayores que los determinados por el híbrido idéntico. Estas diferencias en los niveles de GvH local singeneico se observaron en combinaciones de cepas que diferían en sus AMH y en sus AmH (BALB/c y AKR.M; BALB/c y

TABLA 11

CRECIMIENTO DE TUMORES PARENTALES EN HIBRIDOS RECÍPROCOS.
 Linfoma L15 en F1 (AKR/JxBALB/c) y F1 (BALB/cxAKR/J).

DÍA	H U E S P E D E S ^a		b p
	F1 (AKR/JxBALB/c)	F1 (BALB/cxAKR/J)	
11	281±40 ^c	351±35	NS
12	339±33	499±37	40.05
13	310±33	461±32	NS
14	NECROSIS	561±50	
15		NECROSIS	

5

a: Se inocularon 10 células de L15 a.c. en el flanco derecho de 6 hembras de cada F1.

b: calculado por el "t" de Student.

c: Se determinó el diámetro mayor y el menor, y se calculó el área. Expresado en mm²±ES

TABLA 12

MORTALIDAD ACUMULATIVA DE HIBRIDOS RECIPROCOS POR LINFOMAS DE UNA CEPA PARENTAL. Mortalidad de F1(BALB/cxAKR/J) y F1(AKR/JxBALB/c) inoculados con L15.

DIA	H U E S P E D E S ^a	
	F1(AKR/JxBALB/c)	F1(BALB/cxAKR/J)
14	^b 2/6	^c 33%
15	3/6	50%
16		1/6 16%
17		2/6 33%
18	5/6 83%	4/6 66%
19	6/6 100%	
//		
24		6/6 100%
	xmv=16.33±0.91	xmv=19.50±1.45 NS

5

a :Se inocularon 10x10 células de L15 en 6 hembras de cada F1.

b :animales muertos/total.

c :% de mortalidad acumulativa.

xmv :promedio de días de sobrevivida post-inoculación±ES.
La significación se calculó por el "t" de Student.

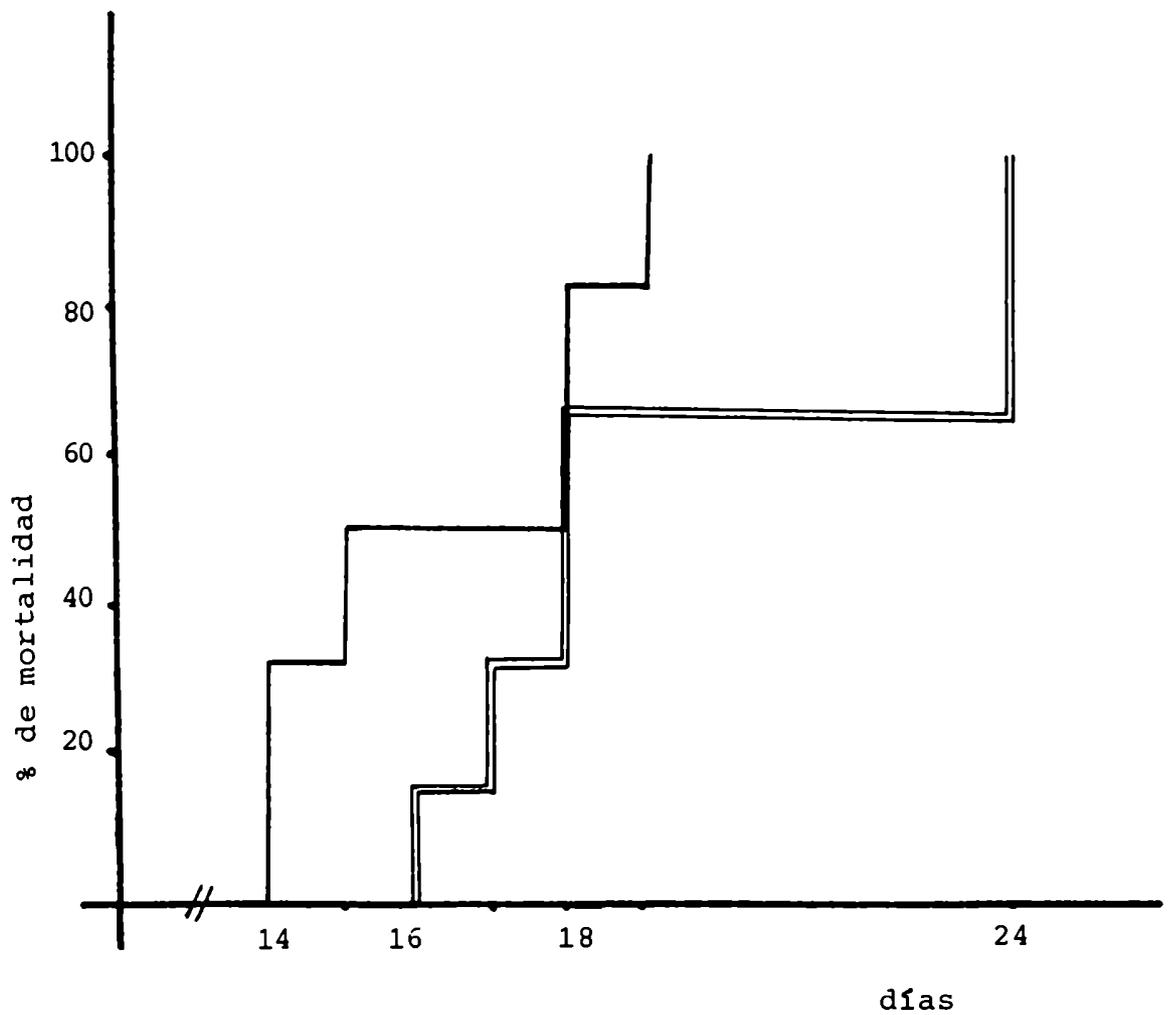


Figura 18 : % de mortalidad de F1(AKR/JxBALB/c) (—) y F1(BALB/cxAKR/J) (=) por inoculación de 10^6 células del tumor L15.

AKR/J), así como en una combinación de cepas que comparten los AMH pero difieren en los AmH, incluyendo al locus Mls (BALB/c y DBA/2). En este caso se obtuvieron diferencias significativas pero de menor magnitud.

4.1.Reacciones de GvH local singeneico entre híbridos idénticos y recíprocos que difieren en sus AMH y en sus AmH.

4.1.a.Reacciones de GvH local singeneico entre híbridos F1(BALB/cxAKR.M) y F1(AKR.MxBALB/c).

La inoculación de 10×10^6 esplenocitos F1(AKR.MxBALB/c) en huéspedes F1(BALB/cxAKR.M) determinó valores de GvH singeneico varias veces mayores que los determinados por la inoculación de la misma dosis de esplenocitos del híbrido idéntico (Tabla 13). La diferencia entre estos valores fue altamente significativa ($p < 0.001$). Del mismo modo, la inoculación de células esplénicas del híbrido F1(AKR.MxBALB/c) en el híbrido recíproco determinó valores de GvH singeneico varias veces mayores ($p < 0.001$) que los determinados por la inoculación de esplenocitos del híbrido idéntico F1(BALB/cxAKR.M) (Tabla 13).

TABLA 13

GvH LOCAL SINGENEICO ENTRE HIBRIDOS IDENTICOS Y RECIPROCOS.
 Combinaciones entre las cepas BALB/c y AKR.M.

a		b
DADOR	HUESPED	GvHFE
1.		
F1 (AKR.MxBALB/c) ---	F1 (AKR.MxBALB/c)	0.16±0.13 (10)
F1 (BALB/cxAKR.M) ---	F1 (AKR.MxBALB/c)	4.06±1.77 (8) **
2.		
F1 (BALB/cxAKR.M) ---	F1 (BALB/cxAKR.M)	0.36±0.17 (8)
F1 (AKR.MxBALB/c) ---	F1 (BALB/cxAKR.M)	1.49±0.19 (12) **

b

a : 10^{10} esplenocitos inoculados en la almohadilla plantar derecha de los huéspedes F1.

b : diferencia de peso entre los ganglios popliteos derecho e izquierdo expresado en mg+ES (número de animales).

** : $p < 0.001$ calculado por el "t" de Student.

4.1.b. Curvas de dosis respuesta de la reacción de GvH singeneico idéntico y recíproco en huéspedes F1(BALB/cxAKR.M).

En la Figura 19 y la Tabla 14 se describen los resultados de la inoculación de distintas dosis de esplenocitos de los híbridos idéntico y recíproco en huéspedes F1(BALB/cx AKR.M). Las diferencias en los valores de GvH singeneico fueron altamente significativas para las tres dosis estudiadas.

4.2.a. Reacciones de GvH singeneico entre híbridos F1(BALB/cxAKR/J) y F1(AKR/JxBALB/c).

Cuando se llevaron a cabo reacciones de GvH singeneico en huéspedes F1(BAL/cxAKR/J), el injerto de esplenocitos del híbrido recíproco F1(AKR/JxBALB/c) determinó valores de GvH singeneico varias veces mayores que los determinados por la inoculación de la misma dosis de esplenocitos del híbrido idéntico. Los resultados se exponen en la tabla 15. Las diferencias entre estos valores fueron altamente significativas ($p < 0.001$).

El injerto de esplenocitos del F1(BALB/cxAKR/J) y del F1(AKR/JxBALB/c) en huéspedes F1(AKR/JxBALB/c) arrojó diferencias similares, siendo los valores de GvH determinados por el híbrido recíproco al huésped mayores que los obtenidos por la inoculación del híbrido idéntico ($p < 0.001$) (Tabla 15).

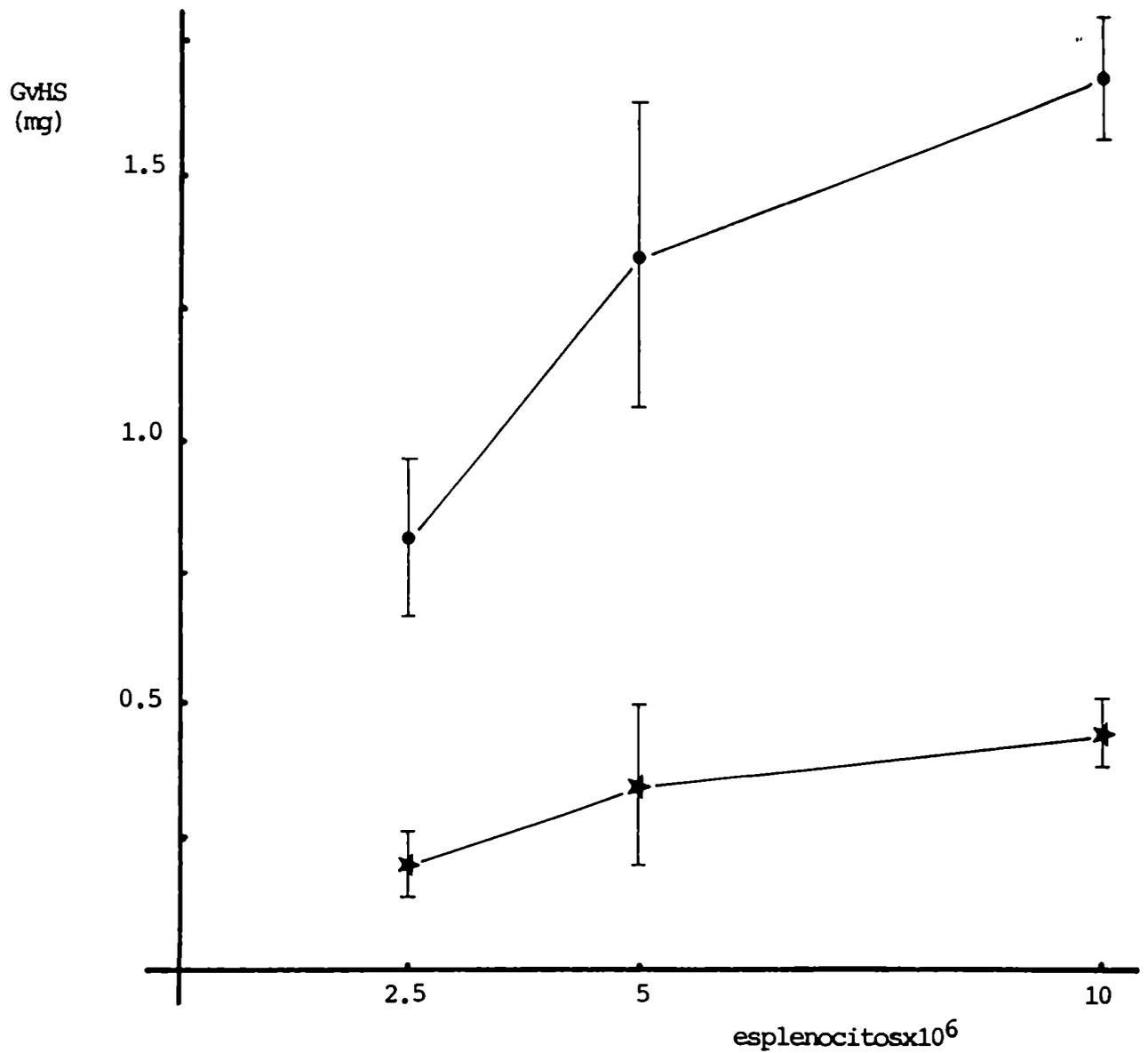


Figura 19 : Reacción de GvHS con esplenocitos F1(BALB/cxAKR/J) ★ y esplenocitos F1(AKR/JxBALB/c) ● en huéspedes F1(BALB/cxAKR/J).

TABLA 14

CURVA DE DOSIS-RESPUESTA DE LA REACION DE GvH SINGENEICO ENTRE HIBRIDOS IDENTICOS Y RECIPROCOS. Injerto de esplenocitos del F1 (BALB/cxAKR.M) del F1 (AKR.MxBALB/c) en huéspedes F1 (BALB/cxAKR.M)

DOSIS ^a	DADOR		P ^b
	F1 (BALB/cxAKR.M)	F1 (AKR.MxBALB/c)	
2.5x10 ⁶	0.20±0.06 ^c (8)	0.82±0.11 (9)	<0.001
5x10 ⁶	0.35±0.09 (8)	1.35±0.25 (9)	<0.001
10x10 ⁶	0.45±0.07 (8)	1.68±0.15 (8)	<0.001

a : dosis de esplenocitos inoculados en la almohadilla plantar derecha de los F1 indicados.

b : diferencia de peso entre los ganglios popliteos derecho e izquierdo a los 7 dias de la inoculación. Expresado en mg+ES (número de animales).

c : calculado por "t" de Student.

4.3.Efecto del pretratamiento del injerto de esplenocitos del híbrido recíproco con mitomicina-C.

Desarrollamos ensayos de GvH singéneico recíproco con esplenocitos pretratados con mitomicina-C para inhibir su proliferación. En las combinaciones de híbridos recíprocos estudiadas, se obtuvieron disminuciones significativas del GvH singéneico recíproco por este pretratamiento.

4.3.a. Injerto de esplenocitos F1(AKR/JxBALB/c) pretratados con mitomicina-C en huéspedes F1(BALB/cxAKR/J).

Los resultados se observan en la Tabla 15. El pretratamiento del injerto de esplenocitos F1(AKR/JxBALB/c) con mitomicina-C, determinó una disminución significativa ($p < 0.001$) en los valores de GvH singéneico en huéspedes recíprocos, cuando se comparó con el efecto determinado por la inoculación de esplenocitos sin pretratamiento. Cuando se comparó este valor de GvH singéneico con el determinado por la inoculación de la misma dosis de esplenocitos del híbrido idéntico, se obtuvieron diferencias NS.

4.3.b. Injerto de esplenocitos F1(AKR/JxBALB/c) pretratados con mitomicina-C en huéspedes F1(BALB/cxAKR/J).

En este caso el pretratamiento del injerto

TABLA 15

GvH LOCAL SINGENEICO ENTRE HIBRIDOS IDENTICOS Y RECIPROCOS.
Combinaciones entre las cepas BALB/c y AKR/J.

DADOR (a)	HUESPED	PRETRAT (b)	GvHSR (c)
1.			
F1 (BALB/cxAKR/J) → F1 (BALB/cxAKR/J)		--	0.60±0.11 (8)
F1 (AKR/JxBALB/c) → F1 (BALB/cxAKR/J)		--	3.13±0.42 (13) **
F1 (AKR/JxBALB/c) → F1 (BALB/cxAKR/J)		MITOM ^d	0.39±0.54 (12) **
F1 (AKR/JxBALB/c) → F1 (BALB/cxAKR/J)		L.NY. ^e	3.20±0.29 (6)
2.			
F1 (AKR/JxBALB/c) → F1 (AKR/JxBALB/c)		--	0.33±0.12 (6)
F1 (BALB/cxAKR/J) → F1 (AKR/JxBALB/c)		--	3.63±0.28 (8) **
F1 (BALB/cxAKR/J) → F1 (AKR/JxBALB/c)		MITOM	0.73±0.21 (7) **

6

- a : 10x10 esplenocitos inoculados en la almohadilla plantar derecha de los huéspedes F1.
- b : pretratamiento de los esplenocitos del dador.
- c : diferencia de peso entre los ganglios poplíteos derecho e izquierdo. Expresado en mg±ES (número de animales)
- d : Esplenocitos pretratados con mitomicina-C.
- e : esplenocitos no adherentes a lana de nylon. Se injertó 1/5 de la dosis habitual.
- ** : p<0.001 calculado por el "t" de Student.

reciproco con mitomicina-C determinò tambièn una disminuciòn muy significativa ($p < 0.001$) en los valores de GvH local singeneico reciproco (Tabla 15).

4.4.Reacciones de GvH local singeneico reciproco con poblaciones esplènicas enriquecidas en cèlulas T.

Quando se llevaron a cabo injertos de esplenocitos del hibrido reciproco con poblaciones celulares no adherentes a lana de nylon, es decir enriquecidas en cèlulas T, se pudo observar que las mismas poseian una alta capacidad de desencadenar reacciones de GvH local singeneico reciproco. En efecto, como puede verse en la Tabla 15, el injerto de 2×10^6 esplenocitos del F1 (AKR/JxBALB/c) no adherentes a la lana de nylon, es decir, el equivalente al nùmero de cèlulas no adherentes presentes en los inòculos de 10×10^6 esplenocitos totales, determinò valores de GvH singeneico semejantes (diferencias NS) respecto de dichos inòculos de esplenocitos totales y diferencias muy significativas respecto a los controles (10×10^6 esplenocitos del F1 idèntico al huèsped). Estos resultados indican que la reacciòn desencadenada por la inoculaciòn de esplenocitos del hibrido reciproco, dependeria de la proliferaciòn de las cèlulas T presentes en el injerto.

4.5.Reacciones de GvH local singeneico entre hibridos reciprocos en combinaciones de cepas que difieren solamente en sus AmH.

Las reacciones de GvH singeneico entre hibridos idénticos y reciprocos en las combinaciones de dos cepas que difieren unicamente en sus AmH, incluyendo el locus Mls, también mostraron diferencias significativas, aunque éstas fueron menores que las observadas cuando las reacciones se desarrollaron en combinaciones de cepas que diferian tanto en sus AMH cuanto en sus AmH.

4.5.a.GvH local singeneico entre los hibridos F1(BALB/cxDBA/2) y F1(DBA/2xBALB/c).

En la Tabla 16 se muestran los resultados de estos ensayos. En huéspedes F1(BALB/cxDBA/2), los valores de GvH local desencadenados por esplenocitos del hibrido reciproco fueron significativamente mayores ($p < 0.01$) que los correspondientes al hibrido idéntico.

En los huéspedes F1(DBA/2xBALB/c), las reacciones de GvH local también fueron significativamente mayores ($p < 0.001$) con injertos de esplenocitos del F1 reciproco que con esplenocitos del F1 idéntico.

TABLA 16

GvH LOCAL SINGENEICO ENTRE HIBRIDOS IDENTICOS Y RECIPROCOS.
Combinaciones entre las cepas BALB/c y DBA/2.

a	b
DADOR	HUESPED
	GVHFS
1.	
F1 (BALB/c x DBA/2) ---> F1 (BALB/c x DBA/2)	0.47+0.05 (8)
F1 (DBA/2 x BALB/c) ---> F1 (BALB/c x DBA/2)	0.66+0.08 (6) *
2.	
F1 (DBA/2 x BALB/c) ---> F1 (DBA/2 x BALB/c)	0.21+0.19 (7)
F1 (BALB/c x DBA/2) ---> F1 (DBA/2 x BALB/c)	2.00+1.08 (10) **

6

a : 10x10 esplenocitos inoculados en la almohadilla plantar derecha de los huéspedes F1.

b : diferencia de peso entre los ganglios popliteos derecho e izquierdo en mg+ES (número de animales).

* y ** : p<0.01 y p<0.001 calculados por el "t" de Student.

5. REACCIONES DE CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS SINGENEICO ENTRE HIBRIDOS F1 IDENTICOS Y RECIPROCOS.

5.1. Reacciones de cultivo mixto de linfocitos singeneico entre F1(AKR/JxBALB/c) y F1(BALB/cxAKR/J).

Se estudió la capacidad proliferativa de esplenocitos no adherentes a lana de nylon de híbridos F1, estimulados por poblaciones esplénicas totales de híbridos idénticos o recíprocos. La Tabla 17 muestra los resultados obtenidos.

Coincidentemente con lo observado en reacciones de GVH local singeneico entre híbridos idénticos y recíprocos, la proliferación celular observada cuando la población estimuladora derivaba de híbridos recíprocos a los correspondientes a la población respondedora, fué significativamente mayor ($p < 0.001$) que la obtenida por estimulación de los linfocitos T con esplenocitos del híbrido idéntico. Así, el índice entre la proliferación de células T de híbridos F1(AKR/JxBALB/c) estimuladas por esplenocitos de híbridos F1(BALB/cxAKR/J) y la proliferación frente a células del F1(BALB/cxAKR/J) osciló entre 2.9 y 2.4. Estos resultados indican claramente que los linfocitos T de ratones F1 reconocen de manera diferente a los esplenocitos provenientes de híbridos idénticos y de F1 recíprocos.

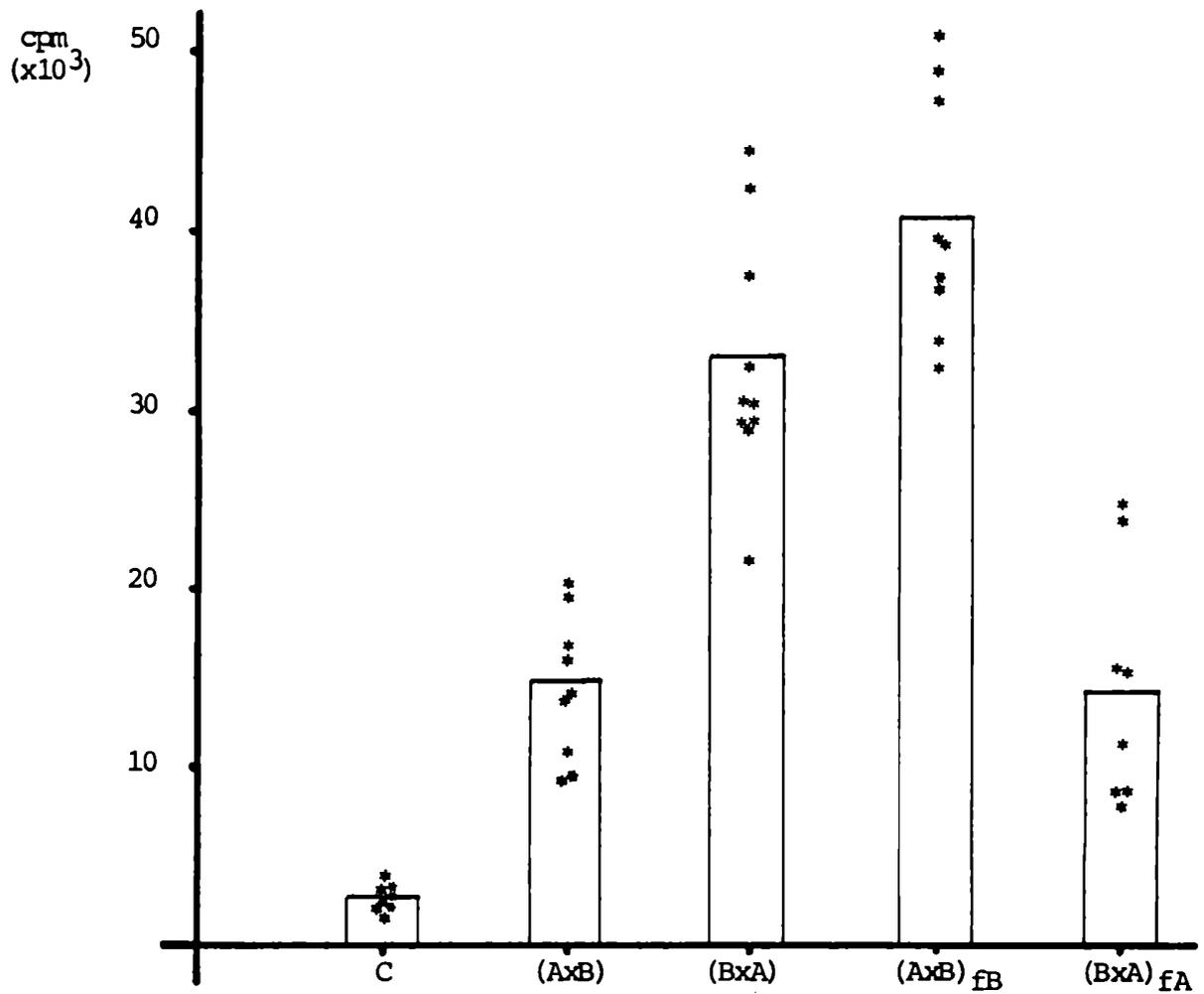


Figura 20 : proliferación en CMLS de linfocitos T F1(AKR/JxBALB/c) frente a esplenocitos totales de F1(AKR/jxBALB/c) (AxB); F1(BALB/cxAKR/J) (BxA); F1(AKR/JxBALB/c) fBALB/c (AxB) fB; F1(BALB/cxAKR/J) fAKR/J ((BxA) fA; sin estimular (C). Se grafican los resultados de un experimento.

TABLA 17

REACION de CMLS ENTRE F1 HIBRIDOS IDENTICOS Y RECIPROCOS.

Combinaciones entre las cepas BALB/c y AKR/J.

RESPONDEDORA (a)	ESTIMULADORA (b)	CPM (c)	INDICE (d)
A.			
F1 (AKR/JxBALB/c)	---	1.209±287 (6)	
F1 (AKR/JxBALB/c)	F1 (AKR/JxBALB/c)	4.884±238 (6)	
F1 (AKR/JxBALB/c)	F1 (BALB/cxAKR/J)	14.538±424 (7)	** 2.97
B.			
F1 (AKR/JxBALB/c)	---	1.405±350 (7)	
F1 (AKR/JxBALB/c)	F1 (AKR/JxBALB/c)	3.841±766 (8)	
F1 (AKR/JxBALB/c)	F1 (BALB/cxAKR/J)	3.200±988 (8)	** 2.13
C.			
F1 (AKR/JxBALB/c)	---	1.245± 540 (4)	
F1 (AKR/JxBALB/c)	F1 (AKR/JxBALB/c)	12.534±1.240 (9)	
F1 (AKR/JxBALB/c)	F1 (BALB/cxAKR/J)	30.540±2.060 (10)	** 2.4

A, B y C indican experimentos independientes. Las poblaciones estimuladoras tuvieron incorporaciones menores que 400cpm.

a : 8×10^5 esplenocitos T no adherentes a lana de nylon.

b : 4×10^5 esplenocitos pretratados con mitomicina-c.

c : incorporación de timidina-³H en cuentas por minuto+ES (número de cpm).

** : p<0.001

6. EFECTO DEL AMAMANTAMIENTO CON HEMBRAS DE LA CEPA PATERNA SOBRE LAS REACCIONES DE GVH SINGENEICO ENTRE HIBRIDOS IDENTICOS Y RECIPROCOS.

Para investigar una de las posibles vías a través de las cuales podría establecerse el efecto materno sobre los niveles de reconocimiento de lo propio por parte de la cría, desarrollamos ensayos de GVH local singeneico utilizando como dadores esplenocitos de F1 normales (inoculados en la almohadilla plantar izquierda) y de F1 amamantados desde el nacimiento por madres nodrizas de la cepa paterna (almohadilla plantar derecha). En las combinaciones de cepas estudiadas, los pesos de los ganglios poplíteos inoculados con cada uno de estos dos tipos de células resultaron significativamente diferentes, tanto cuando se compararon los valores de GVH singeneico entre híbridos idénticos, amamantados y normales, cuanto cuando se compararon los valores de GVH singeneico entre híbridos recíprocos.

6.1. Reacciones de GVH local singeneico de F1(AKR/JxBALB/c) en huéspedes F1(AKR/JxBALB/c). fBALB/c

Los datos experimentales pueden observarse en la Tabla 18.

En estos ensayos, cada huésped F1(AKR/JxBALB/c) ⁶ fue inoculado en la almohadilla plantar derecha con 10×10^6

esplenocitos del híbrido idéntico pero amamantado con hembras nodrizas de la cepa paterna BALB/c, es decir, F1(AKR/JxBALB/c) (Tabla 18.1.). Además, se inoculó en la almohadilla plantar izquierda de los mismos huéspedes, 10×10^6 esplenocitos del híbrido idéntico normal, F1(AKR/JxBALB/c). Las diferencias de peso entre los ganglios poplíteos izquierdo y derecho de los animales así inoculados fueron altamente significativas (5.91 ± 0.27 mg). Cuando huéspedes F1(AKR/JxBALB/c) fueron inoculados con esplenocitos de híbridos F1(AKR/JxBALB/c) en la almohadilla plantar derecha pero se injertaron esplenocitos del híbrido recíproco al huésped en la pata contralateral, las diferencias de peso entre los ganglios poplíteos fueron también importantes (1.2 ± 0.41 mg), pero significativamente menores que las del caso anterior ($p < 0.001$) (Tabla 18.2).

6.2. Reacciones de GvH local singéneo de F1(BALB/cxAKR/J) en huéspedes F1(BALB/cxAKR/J). fAKR/J

En este caso huéspedes F1(BALB/cxAKR/J) fueron inoculados en la almohadilla plantar derecha con esplenocitos del híbrido idéntico amamantado por hembras de la cepa paterna, es decir F1(BALB/cxAKR/J), y en la almohadilla plantar izquierda con esplenocitos del híbrido idéntico. Como se muestra en la Tabla 19.3, las diferencias de peso entre los ganglios poplíteos correspondientes

TABLA 18

GvH LOCAL SINGENEICO ENTRE HIBRIDOS F1 NORMALES Y AMAMANTADOS POR NODRIZAS DE LA CEPA PATERNA. Huéspedes F1(AKR/JxBALB/c) huéspedes F1(BALB/cxAKR/J).

I N J E R T O S (a)		
A.P. DERECHA	A.P. IZQUIERDA	GvHRS (b)
HUESPEDES F1(AxB)		
1. F1(AxB)fE	F1(AxB)	5.91±0.27 (10)
2. F1(AxB)fB	F1(BxA)	1.81±0.41 (8)
HUESPEDES F1(BxA)		
3. F1(BxA)fA	F1(BxA)	3.24±0.29 (6)
4. F1(AxB)fB	F1(AxB)	-1.80±0.27 (6)

A:cepa AKR/J; B:cepa BALB/c. El subíndice f indica amamantado por nodriza de la cepa que se nombra a continuación.

p<0.001 en 1vs2; 3vs4 y 1vs4; calculado por el "t" de Student.

6

- a : 10x10 esplenocitos del F1 que se indica inoculados en la almohadilla palntar derecha o izquierda.
- b : diferencia de peso entre los ganglios poplíteos derecho e izquierdo a los 7 días de la inoculación. Expresado en mg±ES(número de animales).

fueron altamente significativas (3.24 +0.29mg).

6.2. Reacciones de GvH local singeneico de F1(AKR/JxBALB/c) fAKR/J en huéspedes F1(BALB/cxAKR/J).

Ratones F1(BALB/cxAKR/J) fueron inoculados en la almohadilla plantar derecha con esplenocitos de híbridos F1(AKR/JxBALB/c) fAKR/J y en la almohadilla plantar contralateral con esplenocitos del F1(AKR/JxBALB/c), es decir el F1 normal recíproco al huésped. Los resultados, que se observan en la Tabla 19.4, mostraron que la proliferación determinada por esplenocitos del F1 recíproco normal fue significativamente mayor que la determinada por los esplenocitos del mismo tipo de F1 pero amamantado por nodriza de la cepa paterna. Esto determinó que los valores de GvH singeneico fueran, en este caso, negativos.

7. CULTIVO MIXTO SINGENEICO ENTRE HÍBRIDOS NORMALES E HÍBRIDOS AMAMANTADOS POR NODRIZAS DE LA CEPA PATERNA.

Se desarrollaron ensayos de CML singeneico enfrentando poblaciones celulares enriquecidas en células T de F1 normales con poblaciones esplénicas totales de híbridos idénticos y recíprocos amamantados con hembras de la cepa paterna. Los resultados, que figuran en la Tabla 19 y en la Figura 20, muestran que los niveles de estimulación de la proliferación T determinados por

TABLA 19

ENSAYO DE CMLS ENTRE HIBRIDOS NORMALES Y AMAMANTADOS POR NODRIZAS DE LA CEPA PATERNA. Combinaciones de las cepas BALB/c y AKR/J.

a	b	c
ESTIMULADORA	RESPONDEDORA	cpm
A.		
1. F1 (AKR/JxBALB/c)	F1 (AKR/JxBALB/c)	14.471±1.337 (9)
2. F1 (AKR/JxBALB/c) fBALB/c	F1 (AKR/JxBALB/c)	40.815±2.240 (9)
3. F1 (BALB/cxAKR/J)	F1 (AKR/JxBALB/c)	32.961±2.117 (10)
4. F1 (BALB/cxAKR/J) f(AKR/J)	F1 (AKR/JxBALB/c)	13.963±2.095 (8)
B.		
1. F1 (AKR/JxBALB/c)	F1 (AKR/JxBALB/c)	10.234±1.038 (8)
2. F1 (AKR/JxBALB/c) fBALB/c	F1 (AKR/JxBALB/c)	33.293±2.180 (8)
3. F1 (BALB/cxAKR/J)	F1 (AKR/JxBALB/c)	22.692±1.828 (9)
4. F1 (BALB/cxAKR/J) fAKR/J	F1 (AKR/JxBALB/c)	11.034±1.320 (9)

A y B son experimentos independientes. La incorporación de los controles de células estimuladoras fué menor que 500cpm y la de las poblaciones respondedoras fue menor que 2.600cpm. p<0.001 en 1vs2, 1vs3 y 2vs4; NS en 1 vs 4; exp.A, p<0.05 en 2 vs 3; exp.B, NS en 2 vs 3. Calculado por el "t" de Student.

5

- a : 4x10⁶ esplenocitos pretratados con mitomicina-c.
 b : 8x10⁵ linfocitos no adherentes a lana de nylon.
 c : incorporación de timidina H³. Expresado como cuentas por minuto+ES (número de pozos).

esplenocitos de F1 normales y de F1 amamantados por nodrizas fueron significativamente diferentes. Esto se verificó tanto en las respuestas frente a F1 idénticos cuanto en las respuestas frente a F1 recíprocos.

7.1. Reacción de CML singéneo de híbridos F1(AKR/JxBALB/c) frente a F1(AKR/JxBALB/c) y F1(BALB/cxAKR/J) fBALB/c fAKR/J.

En la Tabla 19 y la Figura 20 se pueden observar los resultados obtenidos. La proliferación de poblaciones esplénicas enriquecidas en células T de F1(AKR/JxBALB/c) fue significativamente mayor ($p < 0.001, 1vs2$) cuando se utilizaron como estimuladoras poblaciones esplénicas del F1 idéntico amamantado por nodriza que cuando fueron estimuladas por el F1 idéntico normal.

Si se compara la estimulación determinada por el híbrido recíproco normal y el recíproco amamantado por nodriza (3vs4), se observa que esta última es significativamente menor ($p < 0.001$).

Finalmente, la estimulación con el híbrido idéntico amamantado por nodriza, F1(AKR/JxBALB/c) fBALB/c fue mayor o igual que la determinada por el híbrido recíproco normal F1(BALB/cxAKR/J) ($p < 0.05$ o NS, 2vs3). De manera coincidente, la proliferación de células T del F1(AKR/JxBALB/c) frente a células del F1 idéntico normal y frente a esplenocitos del F1 recíproco amamantado por

fact

Each of these members of the
series

DISCUSSION

Hemos investigado la influencia materna en el reconocimiento de los antígenos de histocompatibilidad propios, utilizando como modelo experimental el estudio de respuestas inmunes hacia estos antígenos propios en híbridos F1 recíprocos adultos. Pudimos comprobar la existencia de diferencias significativas entre estos híbridos en las respuestas de alta afinidad hacia los antígenos de histocompatibilidad propios de origen materno y paterno. Determinamos también que las reacciones de reconocimiento de los AMH de clase II propios de baja afinidad entre F1 idénticos y F1 recíprocos resulta significativamente diferente. Finalmente, demostramos que el amamantamiento es uno de los vehículos a través de los cuales la madre ejercería su influencia en la expresión y/o el reconocimiento de lo propio en los F1 recíprocos.

Comenzamos este trabajo estudiando en forma comparativa las reacciones de GvH local inducidas por inoculación de esplenocitos parentales en pares de híbridos F1 recíprocos. En las tres combinaciones de cepas estudiadas observamos diferencias significativas en los niveles de GvH cuando los ensayos fueron desencadenados por esplenocitos de una de las cepas parentales (BALB/c). Así, en los ensayos en los que utilizamos como huéspedes los híbridos derivados de los cruzamientos entre ratones de las cepas BALB/c y AKR.M (H-2^d y H-2^m), las reacciones desencadenadas por esplenocitos BALB/c fueron

significativamente mayores ($p < 0.001$ y $p < 0.02$) en el F1(AKR.MxBALB/c) que en su recíproco F1(BALB/cxAKR.M) en las tres dosis ensayadas (Tabla 1 y Fig 12). En las combinaciones entre las cepas BALB/c y AKR/J, ($H-2^d$ y $H-2^k$) los niveles de GvH fueron significativamente mayores en el F1(AKR/JxBALB/C) que en su recíproco, para dos de las tres dosis ensayadas ($p < 0.001$) (Tabla 3 y Fig 13). En los ensayos con huéspedes F1(DBA/2xBALB/c) y F1(BALB/cxDBA/2) (ambos $H-2^d$, difieren solamente en AmH), las reacciones de GvH fueron significativamente mayores ($p < 0.001$) en el primero de los F1 en las tres dosis ensayadas (Tabla 5 y Fig.14).

En las condiciones experimentales utilizadas, las reacciones de GvH desencadenadas con esplenocitos de las cepas AKR.M, AKR/J y DBA/2 en los pares de híbridos recíprocos correspondientes, no arrojaron diferencias significativas (Tablas 2, 4 y 6). Estas cepas manifestaron tanto altas (AKR.M y AKR/J) como bajas (DBA/2) reactividades, indicando que la no detección de diferencias en las reacciones de GvH desencadenadas con estas cepas no estaría correlacionada con los niveles de reactividad de las cepas dadoras del injerto.

Comprobamos, por lo tanto, la existencia de diferencias en los niveles de GvH locales desencadenados por una de las cepas parentales en los híbridos recíprocos, tanto en combinaciones de cepas que difieren en sus AmH y en sus AmH como en una combinación de cepas parentales que

comparten sus AMH y difieren sólo en sus AmH, incluyendo el locus Mls. En estos ensayos de GvH local se cumplió el llamado efecto materno (231), es decir que los niveles de GvH fueron menores en el híbrido para el cual la cepa dadora coincidía con su cepa materna. En las tres combinaciones de cepas estudiadas, sólo una de las cepas parentales (BALB/c) mostró tales diferencias. Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores. Uphoff observó (230-233) diferencias significativas en la mortalidad de ratones F1 recíprocos, cumpliéndose el efecto materno, con injertos de médula ósea de la cepa RIII en combinaciones entre RIII y C57Bl (H-2^r y H-2^b), con DBA/2 en sus combinaciones con C57Bl, con BALB/c en los híbridos con C57BL, y en una combinación de dos cepas H-2^k. Morse y col. (234) encontraron diferencias significativas en los índices esplénicos y la mortalidad de los recién nacidos cuando injertaron esplenocitos de las cepas BALB/c y C57BL en los F1 correspondientes. Estos resultados indican que este efecto no quedaría restringido a la cepa BALB/c. No resulta claro, sin embargo, cuales son las características que determinan que una cepa ponga o no en evidencia la existencia de diferencias en las reacciones de GvH en los F1 recíprocos. Como hemos señalado, esto no parecería depender de la reactividad de las mismas y no dependería tampoco exclusivamente de la posesión de un determinado haplotipo. Nuestros datos y los reportados por estos autores sugieren

que esta capacidad podría estar relacionada con las características genéticas de las cepas, incluyendo tanto los AMH como los AmH por lo que, como ocurre con otros efectos maternos (235-237), sólo se manifestaría en algunas combinaciones de cepas.

Investigamos la inducción en los F1 recíprocos de respuestas regulatorias frente a los receptores T de alta afinidad hacia los AMH propios. Como explicáramos en la Introducción (página 40), Wilson y col. (120-125) demostraron que en los F1 se pueden expandir poblaciones de células T dirigidas hacia los receptores T parentales con reactividad hacia los AMH propios heredados a partir de la otra cepa parental, es decir clones anti-anti-H-2 propio. Estas poblaciones T regulatorias aparecen rápidamente en los híbridos por inoculación e.v. de células linfocíticas de las cepas parentales.

La expansión de estos clones se pone de manifiesto en ensayos de GVH, y puede ser cuantificada a través de la medición del grado de protección frente al injerto local o sistémico de linfocitos de la misma cepa parental inductora de la protección.

Estudiamos entonces la inducción de protección frente al GVH local en pares de híbridos recíprocos. Con bajas dosis de esplenocitos e.v. ($5, 7.5 \times 10^6$ esplenocitos), el porcentaje de supresión de las reacciones de GVH fué significativamente diferente en los híbridos

recíprocos. La inoculación de 5 a 20×10^6 esplenocitos BALB/c en los híbridos F1(AKR.MxBALB/c) y F1(AKR/JxBALB/c) determinó porcentajes significativos de supresión ($p < 0.001$). En los híbridos recíprocos en cambio fueron necesarias dosis de 10 y 20×10^6 esplenocitos BALB/c para desencadenar respuestas de protección significativas (Tablas 7 y 8, Figuras 15 y 16).

Es decir que, en las combinaciones de cepas estudiadas, las respuestas frente a los receptores T de alta afinidad hacia los AMH propios resultaron diferentes en los F1 recíprocos.

Se ha postulado que durante la vida del individuo, emergerían al azar clones portadores de receptores de alta afinidad frente a los AMH propios y que los clones T con reactividad hacia estos receptores anti-MHC propio evitarían la aparición de reacciones autoinmunes de tipo patológico (125,238). Nuestros resultados indican que los F1 recíprocos presentan diferencias significativas en estas respuestas regulatorias.

Las respuestas inmunes normales frente a antígenos convencionales tienen como requisito el reconocimiento de los AMH propios, como se pone de manifiesto en el fenómeno de la restricción T. Pero este reconocimiento de lo propio opera con baja afinidad. Para investigar este tipo de autorreactividad en los F1

recíprocos desarrollamos ensayos de GvH singéneico en los cuales comparamos la respuesta de un híbrido frente a la inoculación de esplenocitos del F1 idéntico del recíproco. El objetivo de estos ensayos fue investigar si un F1 es reconocido como propio de la misma manera por su híbrido idéntico que por su recíproco.

Las reacciones de GvH local singéneico fueron significativamente mayores cuando se desarrollaron entre F1 recíprocos que cuando el injerto derivaba de un F1 idéntico al huésped. Este hecho se comprobó en las combinaciones entre las cepas BALB/c y AKR.M (Tabla 13), BALB/c y AKR/J (Tabla 15) y en BALB/c con DBA/2 (Tabla 16). Los niveles de estas diferencias fueron menores en la última combinación de cepas, que difieren solamente a nivel de sus AmH.

Observamos además que incluso bajas dosis (2.5x10⁶) de esplenocitos del F1 (AKR.MxBALB/c) determinaban respuestas de GvH singéneico significativas en huéspedes recíprocos (Tabla 14, Figura 19), a diferencia de lo que normalmente ocurre en ensayos de GvH singéneico entre F1 idénticos o con cepas endocriadas.

Para analizar la participación del injerto en las reacciones de GvH singéneico entre híbridos idénticos y recíprocos, desarrollamos ensayos con esplenocitos pretratados con mitomicina-C. Este pretratamiento determinó que los valores de GvH entre híbridos recíprocos disminuyera significativamente respecto de los controles

sin pretratar (Tabla 15), lo que indicaría que las reacciones de GvH singeneico reciproco dependerian en gran parte de la proliferación de los esplenocitos del injerto. No puede descartarse, sin embargo, que la proliferación celular dependa en este caso de unas pocas vueltas de división de las células injertadas, que en los posteriores eventos proliferativos que determinan el aumento de peso de los ganglios participen también las células del huésped.

Con el objetivo de investigar las características fenotípicas de las células del injerto que participan en la reacción de GvH entre F1 reciprocos, desarrollamos ensayos con poblaciones esplénicas enriquecidas en células T por pasaje a través de lana de nylon. Los datos obtenidos (Tabla 15) sugieren que estas reacciones dependen de la presencia de células T en el injerto, coincidiendo con los requerimientos del GvH singeneico entre híbridos idénticos y el GvH alogeneico (64,111).

Los resultados obtenidos in vivo fueron claramente confirmados in vitro en ensayos de CML singeneico, en los que comparamos las respuestas proliferativas de poblaciones esplénicas enriquecidas en células T de un F1 frente a esplenocitos totales del híbrido idéntico y del reciproco. En la combinación de cepas utilizadas en estos ensayos (BALB/c y AKR/J), la proliferación de las células T del F1(AKR/JxBALB/c) fue

significativamente mayor ($p < 0.001$) cuando éstas fueron estimuladas por esplenocitos del híbrido recíproco que cuando proliferaron frente a células del F1 idéntico (Tabla 17), coincidiendo con los resultados obtenidos en los ensayos de GVH singéneo.

Estos resultados, que indican que tanto in vivo cuanto in vitro la proliferación de las células linfoides de un F1 es significativamente mayor frente al híbrido recíproco que frente al idéntico, confirman la existencia de diferencias en las poblaciones esplénicas de los híbridos recíprocos en cuanto a su capacidad de respuesta proliferativa en ensayos que se utilizan como indicadores de los niveles de reconocimiento de los antígenos Ia propios.

En síntesis, tanto en los ensayos que evalúan las respuestas de los F1 frente a células T con receptores de alta afinidad hacia antígenos de histocompatibilidad propios de origen materno y paterno, cuanto en los ensayos que permiten determinar los niveles de reconocimiento de lo propio con baja afinidad, se pone de manifiesto la existencia de diferencias en los híbridos F1 recíprocos.

Estas diferencias en las respuestas en las que se involucra el reconocimiento de lo propio podrían deberse a:

- 1) La existencia de diferencias cualitativas en la

expresión de los antígenos de histocompatibilidad propios de origen materno y/o paterno en los híbridos recíprocos.

2) Podrían existir diferencias cuantitativas en la expresión de estos antígenos propios.

y/o

3) La regulación del reconocimiento de los antígenos de histocompatibilidad propios de origen materno y paterno, podría tener diferentes niveles en los híbridos recíprocos.

Uphoff postuló (231-233) la existencia de diferencias cuantitativas y/o cualitativas en la expresión de los antígenos de histocompatibilidad en los F1 recíprocos. Esta autora propone que los antígenos de histocompatibilidad de origen paterno sufrirían una modificación en su expresión que determinaría un menor reconocimiento por parte de los receptores T alorreactivos maternos. Esta modificación tendría un valor adaptativo ya que aumentaría la probabilidad de sobrevivencia del híbrido semialogéneo en el útero, protegiéndolo de un posible ataque alorreactivo materno. Al considerar esta postulación debe tenerse en cuenta que la reactividad frente a los aloantígenos puede, y de hecho, suele ser mayor cuanto menores son las diferencias entre los AMH extraños y los propios. Según algunos autores (20,118) los receptores T alorreactivos habrían sido seleccionados para

distinguir pequeñas más que grandes diferencias. Por otra parte, los F1 reconocen como propios los antígenos de histocompatibilidad de la cepa paterna ya que no rechazan los injertos de piel de ninguna de las cepas parentales, por lo que las modificaciones cualitativas de los antígenos de histocompatibilidad de origen paterno podrían consistir exclusivamente en la aparición de nuevos determinantes antigénicos.

La existencia de modificaciones cuantitativas en la expresión de los antígenos de histocompatibilidad propios podría también dar cuenta de las diferencias encontradas en las respuestas de alta afinidad frente a los mismos. En efecto, la capacidad de las poblaciones esplénicas parentales de desencadenar una reacción de GvH en un F1 deriva del hecho de que estos injertos poseen clones portadores de receptores alorreactivos frente a la otra cepa parental del F1. Supongamos un par de híbridos recíprocos $F1(A \times B)$ y $F1(B \times A)$. En el híbrido $F1(A \times B)$, los antígenos de histocompatibilidad A, de origen materno para este híbrido, podrían tener, según esta propuesta, una expresión mayor que en su recíproco $F1(B \times A)$. Esto podría determinar que los niveles de proliferación de las células del injerto B, portadoras de receptores alorreactivos frente a A fueran mayores en este híbrido que en su recíproco, lo cual se manifestaría como una mayor reacción de GvH en el $F1(A \times B)$ que en el $F1(B \times A)$. Es decir que la reacción de GvH sería mayor en el híbrido para el cual la

cepa dadora coincidiera con la cepa materna, como indican nuestros datos experimentales de GvH local y los de otros autores en ensayos de GvH sistémico (231-234).

Las diferencias en los niveles de protección frente al GvH que hemos observado podrían explicarse también por este tipo de mecanismos. Los mayores niveles de GvH determinados en el híbrido cuya cepa paterna coincide con el injerto, F1(AxB) con injerto B en nuestro ejemplo, podrían explicarse, como acabamos de puntualizar, por una mayor proliferación de las células injertadas en este híbrido. Esta mayor proliferación de los linfocitos T alorreactivos del injerto podría desencadenar una mayor respuesta de protección por parte del huésped, que es el resultado observado.

Estos resultados podrían finalmente deberse a la existencia de diferencias en los niveles de regulación del reconocimiento con alta afinidad de los antígenos de histocompatibilidad propios. Cabe señalar que la existencia de diferencias cuantitativas en la expresión de los antígenos de histocompatibilidad propios podría implicar la existencia de diferencias en los niveles de regulación del reconocimiento de los mismos.

En nuestro laboratorio, estudiando los sistemas de regulación de la respuesta inmune operantes en recién nacidos, pudimos determinar la existencia de diferencias en la capacidad regulatoria de las poblaciones esplénicas de recién nacidos híbridos recíprocos (239). En efecto, los F1

recièn nacidos poseen clones con capacidad para suprimir respuestas alorreactivas maternas frente a los antígenos de histocompatibilidad propios de origen paterno. Los F1 recièn nacidos no demuestran, en las mismas condiciones experimentales, capacidad para suprimir respuestas alorreactivas paternas frente a los antígenos de histocompatibilidad propios de origen materno. Por el contrario, hemos podido detectar, en ciertas relaciones de células reguladoras a células efectoras, la existencia de clones con capacidad regulatoria positiva sobre estas reacciones paternas-anti-maternas. Esta diferencia en la capacidad regulatoria de los F1 recièn nacidos frente células portadoras de receptores T paternos-anti-maternos y maternos-anti-paternos, se confirmó en diferencias en la capacidad regulatoria de los recièn nacidos híbridos recíprocos, cada uno de los cuales posee clones con capacidad para regular negativamente la actividad de células poseedoras de los receptores maternos-anti-paternos correspondientes, y positivamente la actividad de células con receptores paternos-anti-maternos .

Es probable que estas diferencias en la capacidad regulatoria de las poblaciones esplènicas de los recièn nacidos afecten los niveles de regulaciòn del reconocimiento de lo propio de origen materno y paterno en los adultos, determinando las diferencias entre los F1 recíprocos que describimos en este trabajo.

Las reacciones de CML singeneico y GvH singeneico ponen de manifiesto el nivel de reconocimiento normal de los antígenos de clase II propios (65-67). En nuestro sistema experimental se compararon los niveles de proliferación determinados por el enfrentamiento tanto in vivo cuanto in vitro de células de híbridos idénticos y recíprocos. La intensa proliferación determinada por la interacción entre las células de los F1 recíprocos podría deberse también a la existencia de diferencias cuali o cuantitativas en la expresión de los AMH de clase II propios. El enfrentamiento de dos poblaciones linfoides con diferentes niveles regulatorios para el reconocimiento de los antígenos de histocompatibilidad propios de origen materno y paterno podría también determinar fenómenos proliferativos como el observado. Aunque estos ensayos no permiten asegurar que los mismos se deban exclusivamente al reconocimiento de AMH propios de clase II, ya que para ello se debería analizar el efecto del bloqueo de estas reacciones con los anticuerpos anti-Ia correspondientes, experimentos recientes llevados a cabo en nuestro laboratorio (240) confirman la existencia de diferencias en la regulación de las respuestas inmunes restringidas por el CMH entre los F1 recíprocos. Efectivamente, existen diferencias significativas en las respuestas de los F1 recíprocos en ensayos de hipersensibilidad retardada frente a antígenos convencionales presentados en el contexto de los AMH de una de las cepas parentales, es decir,

presentados por macrófagos de una de las cepas parentales. Esto indicaría que el reconocimiento de los antígenos convencionales en el contexto de los AMH de clase II propios sería diferente en los F1 recíprocos. Estos resultados, junto con los ensayos de CML singéneo, sugieren claramente que el reconocimiento de los AMH de clase II propios con baja afinidad sería diferente en los F1 recíprocos.

Estudiamos la cinética de crecimiento en híbridos recíprocos de tumores de estirpe linfóide originados en una de las cepas parentales. El tumor LB, surgido espontáneamente en ratones de la cepa BALB/c, mostró diferencias significativas en las curvas de crecimiento y de mortalidad cuando fué inoculado subcutáneamente en híbridos recíprocos entre las cepas BALB/c y AKR/J (Tablas 9 y 10, Figura 17). Tanto el crecimiento como la mortalidad resultaron mayores en el híbrido F1(BALB/cxAKR/J). Por el contrario, la leucemia L15, originada en la cepa AKR/J, no mostró diferencias significativas en su crecimiento en los mismos híbridos (Tablas 11 y 12, Fig.18).

En primer lugar, es llamativa la correlación de estos resultados con los relacionados a los ensayos de GVH de células parentales, ya que las diferencias en las curvas de mortalidad y crecimiento tumoral se observaron con la inoculación de una leucemia originada en la cepa BALB/c, que

también determinó diferencias en los niveles de GVH en los mismos F1 recíprocos.

Teniendo en cuenta que las cepas murinas son portadoras de diversos virus endógenos (241-242), y que algunos tumores, expresan antígenos virales como el antígeno de Gross (243), podría suponerse que el crecimiento diferencial de un tumor en los F1 recíprocos estuviera relacionado con la permisividad de cada F1 para la expresión viral. Se ha descrito la existencia de diferencias cuantitativas en la expresión viral en híbridos recíprocos entre cepas portadoras del virus de la leucemia murina y cepas no permisivas para la expresión del mismo (244). Sin embargo, estas diferencias se registraron solamente en ratones de 2 semanas de vida y por otra parte no siguen un patrón definido en relación al rol materno o paterno de la cepa portadora del virus. En las cuatro combinaciones de cepas a las que se refieren estos trabajos se observó una marcada disminución de la expresión viral respecto del homocigota portador (AKR/J), pero en dos casos la expresión fue mayor en los híbridos para los cuales la cepa portadora correspondía a la cepa materna (combinaciones entre AKR/J como portadora y B10.2D y C57B1/10), y en los otros dos casos examinados la expresión viral fue menor en los híbridos en los cuales AKR/J era la cepa materna (combinaciones entre AKR/J y las cepas BALB/c y B10.BR).

Por otra parte, Fisser y Grunwald (245)

determinaron que la inmunización de un híbrido con un tumor parental fué capaz de inducir en los huéspedes la producción de altos títulos de anticuerpos dirigidos hacia los AMH de clase I de las células parentales inmunizantes. En un sistema in vitro, Nakano y col. (246) demostraron que la estimulación de esplenocitos heterocigotas para el H-2 con células parentales homocigotas, inducía la generación de linfocitos T citotóxicos específicos hacia el H-2 parental, que sólo tienen actividad frente a células blanco homocigotas para el H-2. Las diferencias en el crecimiento y la mortalidad determinadas por la inoculación de tumores de origen parental, podría reflejar entonces diferencias en la capacidad de los F1 recíprocos de producir anticuerpos y/o células citotóxicas frente a las células tumorales que expresan el H-2 propio en forma homocigota.

Las leyes clásicas de trasplantes de tejidos establecen que los genes de histocompatibilidad se expresan en forma codominante, de manera tal que un híbrido no rechazará injertos derivados de cualquiera de sus dos cepas parentales (247-248). Los trabajos clásicos no permitían, sin embargo, establecer el grado de esta codominancia ni su regulación. Recientemente, O'Neill y Blanden (248-249) estudiaron la expresión génica de los AMH del ratón en animales homocigotas y heterocigotas mediante

técnicas de absorción cuantitativa de antisueros y técnicas de radioinmunoensayo. Utilizaron cepas congénicas para el H-2 K y el H-2 D y sus respectivos híbridos, 9 en total. Los datos experimentales obtenidos en estos ensayos demuestran que los niveles de expresión de los antígenos K y D en cada híbrido comparados con los niveles de expresión de los mismos en las respectivas cepas parentales, dependen de la composición alélica del F1, ya que algunos alelos tienden a dominar sobre otros. En cuatro híbridos diferentes, el alelo K^k estaba más expresado que el K^b , mientras que en otras combinaciones de H-2, el alelo D^d predominaba sobre el K^k y sobre el K^b . El alelo D^d mostró dominancia sobre D^k , mientras que no se encontraron evidencias de dominancia del alelo D^k . Los mismos autores estudiaron la expresión génica de las regiones K y D del CMH en dos combinaciones de cepas que eran recíprocas para dichos genes, no encontrando diferencias en los patrones de dominancia y recesividad de estos híbridos recíprocos para los genes de clase I del CMH. Los autores proponen entonces que la expresión cuantitativa de los genes de la región K-D no sería modificada por influencia materna, al menos en esta combinación de cepas. Como en estos trabajos no se han utilizado anticuerpos monoclonales, no es posible descartar la existencia de diferencias cualitativas en la expresión de los genes de la región K-D.

Recientemente se ha descrito un efecto de influencia materna en la expresión de un AMH relacionado

con los antígenos de clase I codificado por la región Qa-Tla, de funciones desconocidas. Este antígeno, denominado Mta se expresa en los híbridos solamente si estos han heredado por vía materna, un alelo permisivo de un gen mitocondrial (252). La presencia de mitocondrias maternas portadoras de estos genes permisivos en el citoplasma del óvulo, determina la expresión del antígeno Mta, haya sido éste heredado a partir de la madre o del padre. Aún cuando la cepa paterna posea los alelos de los genes mitocondriales que codifican para estos factores permisivos, el híbrido no expresará el antígeno Mta si la madre no los posee. Las cepas utilizadas en nuestros ensayos son todas no permisivas para la expresión de este antígeno (251-253).

Estos trabajos, si bien estudian la expresión de un antígeno de clase I, constituyen un antecedente de gran importancia, ya que demuestran la existencia de mecanismos complejos capaces de determinar la modificación de la expresión de los genes del CMH por influencia materna.

La expresión de los antígenos de clase II en la superficie celular está sujeta a modificaciones tanto cuali como cuantitativas (254). La glicosilación post-sintética de las cadenas α y β constituye el mecanismo más habitual de las modificaciones cualitativas (255). Existen incluso evidencias de la existencia de diferencias en los glicopéptidos de clase II codificados por los linfocitos B y los macrófagos (256). Actualmente se estudia

posibilidad de que estas diferencias cualitativas estén involucradas en modificaciones de la actividad funcional de las células portadoras de estos antígenos, si bien esta hipótesis no ha sido aún confirmada (255-257).

En cuanto a las modificaciones cuantitativas de la expresión de los antígenos de clase II, como explicáramos en la Introducción (pag.8), los antígenos Ia se componen de dos cadenas (y), y en los F1 se encuentran dímeros entre las cadenas codificadas por cada uno de los padres. Algunos alelos del H-2 determinan la falta de síntesis de una de las cadenas I-E, lo que motiva la no expresión de los antígenos correspondientes en la membrana citoplasmática. Esto se relaciona con la falta de respuesta frente a determinados antígenos por los individuos portadores de estos alelos del H-2. Es decir que uno de los mecanismos que intervienen en la regulación de la respuesta frente a ciertos antígenos por los genes de clase II depende de la expresión o no de los mismos. Como en los F1 se expresan las combinaciones interparentales (combinaciones trans) de estas cadenas de los antígenos I-E, esto agrega un factor más de variabilidad poblacional a la expresión de los mismos. No existen aún datos comparativos de la expresión y la asociación en la membrana celular de las cadenas y de los antígenos Ia en los F1 recíprocos.

Algunos autores han postulado que los antígenos

codificados por el locus Mls podrían modificar también la expresión cuantitativa o (más probablemente), podrían aumentar la probabilidad de interacción entre los antígenos Ia y los correspondientes receptores en los linfocitos T (137). Los F1 que hemos utilizado en nuestros ensayos, incluyendo las combinaciones entre cepas del mismo H-2, difieren a nivel del locus Mls. Las diferencias encontradas entre los F1 recíprocos derivados de las cepas BALB/c y DBA/2 podrían relacionarse con el hecho de que las mismas difieren a nivel de dicho locus.

Investigamos por último si el pasaje de células y moléculas a través de la leche materna constituiría uno de los medios a través de los cuales la madre ejercería su influencia en la determinación de la expresión o el reconocimiento de lo propio en los híbridos recíprocos. Elegimos como metodología el amamantamiento de los F1 recíprocos con nodrizas de la cepa paterna.

Estudiamos la capacidad de estos F1 amamantados por nodrizas de desencadenar reacciones de GVH singéneo idéntico recíproco, utilizando como control la inoculación en la almohadilla plantar contralateral de la misma dosis de esplenocitos de F1 amamantados normalmente. La inoculación de esplenocitos del F1(AKR/JxBALB/c) y del F1(BALB/cxAKR/J) ^{fBALB/c}, es decir híbridos amamantados _{fAKR/J}

por hembras de la cepa paterna, en sus respectivos F1 idénticos normales (F1(AKR/JxBALB/c) y F1 (BALB/cxAKR/J), determinó niveles de GvH singéneico altamente significativos ($p < 0.001$) (Tabla 18.1 y 3.). Es decir que el injerto de esplenocitos de híbridos amamantados por nodrizas de la cepa paterna en animales F1 idénticos normales determinó niveles de proliferación celular significativamente mayores que los inducidos por los F1 idénticos amamantados normalmente. Esta proliferación resultó mayor aún que la determinada por el F1 recíproco normal (Tabla 18.2). Coincidentemente, el injerto de células esplénicas del F1(AKR/JxBALB/c) en huéspedes $fBALB/c$ recíprocos normales determinó niveles muy bajos de GvH, siendo la proliferación observada menor aún que la determinada por el híbrido normal idéntico al huésped (Tabla 18.4).

En conclusión, los ensayos de GvH singéneico entre híbridos normales y amamantados con nodrizas de la cepa paterna indican que el amamantamiento es capaz de inducir intensas modificaciones en el reconocimiento de lo propio.

Estudiamos también el efecto del amamantamiento en ensayos de CML singéneico. Los resultados fueron concordantes con los obtenidos in vivo. En efecto, la proliferación de poblaciones T de F1(AKR/JxBALB/c) fué significativamente menor ($p < 0.001$) frente a la estimulación con esplenocitos idénticos normales que frente

a esplenocitos del F1 (AKR/JxBALB/c) (Tabla 19,1vs2
fBALB/c
y Fig 20). Más aún, la proliferación determinada por el
F1(BALB/cxAKR/J) fuè menor o igual que la observada con el
F1(AKR/JxBALB/c) (Tabla 19,2vs3 y Fig.20).

fBALB/c
Estudiamos también la capacidad de estimulación
de esplenocitos del F1(BALB/cxAKR/J) sobre linfocitos
fAKR/J
T del F1(AKR/JxBALB/c). Los niveles de proliferación
alcanzados en este caso fueron similares (diferencias NS) a
los determinados por la estimulación con el híbrido
idèntico normal F1(AKR/JxBALB/c) y fueron
significativamente menores ($p < 0.001$) que los determinados
por el híbrido recíproco normal F1(BALB/cxAKR/J) (Tabla 19,
1vs4 y 3vs4 y Fig 20).

En síntesis, en los ensayos in vitro la
estimulación determinada por esplenocitos de híbridos
idènticos amamantados por nodrizas de la cepa paterna,
resultò similar a la determinada por esplenocitos del
híbrido recíproco, y significativamente diferente a la
determinada por los híbridos idènticos amamantados
normalmente.

Se puede concluir que, tanto in vivo cuanto in
vitro, los F1 adultos normales reconocen de diferente
manera a los F1 idènticos amamantados normalmente y a los
F1 idènticos amamantados por nodrizas de la cepa paterna.
Los F1 normales reconocen también de diferente manera a los
F1 recíprocos normales y a los F1 recíprocos amamantados

por nodrizas. Es decir que el reconocimiento entre F1 idénticos entre F1 recíprocos es modificado significativamente por el amamantamiento con nodrizas de la cepa paterna.

Estos resultados sugieren además que el amamantamiento podría intervenir en la determinación de las diferencias entre los F1 recíprocos.

El hecho de que estos ensayos se realizaron con híbridos de 8 a 32 semanas de vida, sugiere que estos efectos maternos se mantendrían en forma estable durante por lo menos una parte muy importante de la vida adulta de los F1.

Estas modificaciones determinadas por el amamantamiento podrían derivar de distintos efectos maternos, similares a los que podrían determinar las diferencias entre los F1 recíprocos que describimos en este trabajo. Así, los cambios en el reconocimiento entre los F1 idénticos recíprocos amamantados podrían derivar de modificaciones cualitativas en la expresión de los AMH propios determinadas por el amamantamiento; o bien de cambios en los niveles de células con capacidad para regular la expresión y/o el reconocimiento de los AMH propios en los F1. Ambas modificaciones podrían ser detectadas en los ensayos de CML singéneo, ya que las poblaciones estimuladoras pueden, aún cuando estén

pretratadas con mitomicina-C, ejercer actividad regulatoria, como se ha demostrado (258). La primera hipótesis implicaría que las células y moléculas que pasan de la madre al feto durante la lactancia, pudieran determinar cambios **cualitativos permanentes** en la expresión de los genes del CMH. Si bien esta hipótesis no puede ser descartada, resulta más probable que la madre intervenga en la determinación de los niveles de células con capacidad para regular la expresión y/o el reconocimiento de los antígenos de histocompatibilidad propios.

El aporte materno a través de la lactancia ocurre en etapas claves de la maduración del reconocimiento de lo propio y del establecimiento de los circuitos inmunorregulatorios (150,229). Recientemente se ha demostrado que la introducción de células de animales adultos en etapas tempranas de la vida extra-uterina puede determinar modificaciones en la maduración de la respuesta inmune de los individuos. Así, la introducción prematura de esplenocitos o timocitos de animales adultos que cuentan entre sus células regulatorias con linfocitos del nivel 2 de supresión, bloquea el desarrollo de la respuesta inmune normal (17,151). La inoculación intrauterina o en el recién nacido de anticuerpos antiidiotípicos (o células productoras de los mismos) puede determinar la activación o la inactivación de la síntesis de los anticuerpos correspondientes (216,229). Es posible pues postular que los anticuerpos y las células maternas, entre las que se encuentran linfocitos T y B pero también una gran

proporción de macrófagos que expresan antígenos de clase II, presentes durante momentos claves de la maduración de la respuesta inmune, puedan influir en los niveles de regulación de la expresión y/o el reconocimiento de lo propio de los hijos.

Durante los últimos años se ha demostrado que la respuesta inmune no depende exclusivamente de la composición génica del individuo, sino también de su historia antigénica, incluyendo su contacto con diversos idiotipos (259,260). Nuestros datos experimentales demuestran que el pasaje de células y moléculas de la madre al hijo podría tener un lugar de suma importancia dentro de dicha historia antigénica ya que si la lactancia, sea cual fuere el mecanismo involucrado, interviene en la determinación de los niveles de reconocimiento de los AMH propios de origen materno paterno, influirá en la determinación de los niveles de respuesta inmune frente a cada uno de los componentes del universo antigénico. Una influencia materna de esta naturaleza podría introducir un nuevo nivel de variabilidad poblacional que se sumaría al determinado por el polimorfismo de los genes de respuesta inmune.

RESUMEN

A lo largo de este trabajo hemos observado que:

1) Existen diferencias en los niveles de GvH local de por lo menos una de las cepas parentales en híbridos F1 recíprocos, tanto en combinaciones de cepas que difieren en sus AMH y sus AmH cuanto en cepas que sólo difieren a nivel de sus AmH.

2) La protección desencadenada por la inoculación e.v. de células de una de las cepas parentales resultó significativamente diferente en los F1 recíprocos, indicando que los mismos difieren en los niveles de las respuestas regulatorias frente a receptores T de alta afinidad dirigidos hacia los AMH propios.

3) El crecimiento del tumor linfóide LB y la mortalidad determinada por el mismo en F1 recíprocos entre la cepa originaria del tumor y una cepa alogénea, fueron significativamente diferentes.

4) En ensayos de GvH singéneo observamos que los niveles de proliferación celular fueron mayores cuando las células injertadas derivaban del híbrido recíproco al huésped, que cuando el injerto provenía de un F1 idéntico al receptor. Los ensayos de GvH singéneo recíproco desarrollados con inóculos enriquecidos en células T arrojaron resultados

similares, mientras que el pretratamiento de los injertos con mitomicina-C abrogó el aumento de peso de los ganglios poplíteos, sugiriendo que los altos niveles de GvH singeneico observados dependerían de la proliferación de las células T del injerto.

5) En ensayos de CML singeneico también se verificó que la proliferación de linfocitos T de un F1 es significativamente mayor frente a la estimulación por esplenocitos del F1 recíproco que frente a esplenocitos del F1 idéntico, confirmando que en los ensayos utilizados para evaluar el nivel de reconocimiento con baja afinidad de los AMH de clase II propios, un F1 reconoce de diferente manera al híbrido idéntico que al recíproco.

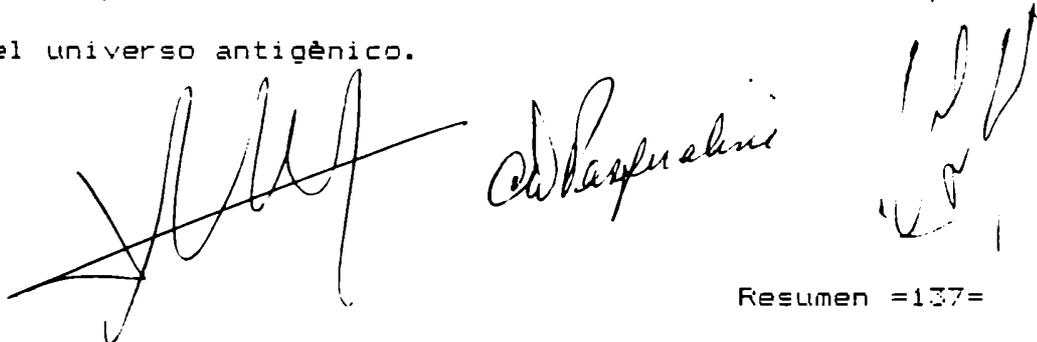
6) El amamantamiento de los F1 por hembras nodrizas de la cepa paterna determinó la modificación de su reactividad en ensayos de GvH singeneico, aumentando su capacidad de determinar reacciones de GvH singeneico en el híbrido idéntico y disminuyendo su capacidad de desencadenar reacciones de GvH singeneico en el F1 recíproco.

7) En ensayos de CML singeneico, la estimulación determinada por esplenocitos de híbridos idénticos amamantados por nodrizas de la cepa paterna resultó significativamente mayor a la determinada por esplenocitos de híbridos idénticos amamantados normalmente y similar a

la determinada por esplenocitos del F1 reciproco.

El conjunto de los resultados obtenidos en este trabajo indica la existencia de diferencias en las poblaciones de células del sistema inmune de los híbridos F1 reciprocos adultos. Estas diferencias podrían consistir en una distinta expresión de los antígenos de histocompatibilidad propios de origen parental y/o en diferencias en la regulación del reconocimiento de los mismos. El establecimiento de estas diferencias sería determinado por influencia materna. Los ensayos con híbridos amamantados por nodrizas de las cepas parentales señalen al amamantamiento como una de las vías a través de las cuales se llevaría a cabo dicha influencia.

Los niveles de expresión y de reconocimiento de los AMH propios constituyen uno de los factores determinantes de la magnitud de la respuesta inmune frente a cada antígeno, ya que, para que se desencadene una respuesta inmune, los antígenos convencionales deben ser reconocidos en el contexto de los AMH propios. Un efecto materno que intervenga en la determinación de los niveles de expresión y/o reconocimiento de estos antígenos, influirá, por lo tanto, en la determinación de los niveles de respuesta inmune frente a cada uno de los componentes del universo antigénico.



BIBLIOGRAFIA

1. Zinkernagel FM, Doherty FC (1975). Restriction of in vitro T-cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248:701.
2. Jerne NK (1974). Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* 125c:373.
3. Hildemann WH, Bigger CH, Johnston IS (1979). Histoincompatibility reactions and allogeneic polymorphism among invertebrates. *Transpl. Proceedings* 1:1136.
4. Borysenko M (1979). Evolution of lymphocytes and vertebrate alloimmune reactivity. *Transpl. Proceedings* XI(1):1123.
5. Hood L, Steinmetz M, Malissen B (1983). Genes of the major histocompatibility complex of the mouse. *Ann. Rev. Immunol.* 1:369.
6. Klein J, Figueroa F, Nagy ZA (1983). Genetics of the major histocompatibility complex: the final act. *Ann. Rev. Immunol.* 1:119.
7. Klein J (1979). The major histocompatibility complex of the mouse. *Science* 203 :516.
8. Basch FS, Stetson CA (1963). Quantitative studies on histocompatibility antigens of the mouse. *Transplantation* 1:468.
9. Flaherty L (1980). H-2 complex, Tla region, and other genes of the 17th chromosome. *En: Biological Basis of Immunodeficiency*. Gelfand EW, Dorsch HM (eds) Raven Press, NY, pp 99.
10. Kindt TJ, Robinson MA (1984) Major histocompatibility complex antigens. *En: Fundamental Immunology*. WE Paul (ed) Raven Press, NY, pp347.
11. Cook FG, Vitetta ES, Uhr JW, Capra JD (1979) Structural studies on the murine Ia alloantigens-V-Evidence that the structural gene for I-E/C beta polypeptide is encoded within the I-A subregion. *J. Exp. Med.* 249:981.

12. Murphy DB, Jones PP, Loken MR, Mc Devitt HO (1980) Interaction between I-region loci influences the expression of a cell surface Ia antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5404.
13. Jones PP, Murphy DD, Mc Devitt HO (1981) Variable synthesis and expression of E and A (E) Ia polypeptide chains in mice of different H-2 haplotypes. Immunogenetics 12:321.
14. Ahmann GB, Nadler FI, Birnbrant A, Hodes RJ (1980). T cell recognition in the mixed lymphocyte response. I. Non-T, radiation resistant splenic adherent cells are the predominant stimulators in the murine mixed lymphocyte reaction. J. Immunol. 123:903.
15. Yamashita U, Ono S, Nakamura HG (1982). The mixed leukocyte reaction in mice. J. Immunol 126:1003.
16. Steinmetz M, Minard K, Horvath S, Mc Nicholas J, Frelinger J, Wake C, Lone E, Mack B, Hood L (1982) A molecular map of the immune response region from the major histocompatibility complex of the mouse. Nature 300:35.
17. Green DR, Flood PM, Gershon RK (1983). Immunoregulatory T-cell pathways. Ann. Rev. Immunol. 1:439.
18. Klein J, Kezawa ZI, Baxevanis CN, Nagy ZA (1983). The major histocompatibility complex and the specificity of the suppressor T lymphocytes. Progress in Immunol. V : 949.
19. Williams AF, Gagnon J (1982). Neuronal cell Thy-1 glycoprotein: Homology with immunoglobulin. Science 216:696.
20. Klein J (1980). Generation of diversity at MHC : implications for T cell repertoires. Progress in Immunol. IV:1980.
21. Klein J, Figueroa F (1981) Polymorphism of the mouse H-2 loci. Immunol. Rev. 60:23.
22. Klein J (1970). Histocompatibility-2 (H-2) polymorphism in wild mice. Science 168:1362.
23. Klein J (1972). Histocompatibility-2 system in wild mice. identification of five new H-2 genes. Transplantation 13:291.

24. Gorer PA (1932) The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. Br. J. Exp. Pathol. 17:42.
25. Claman HN, Chaperon EA, Triplett EF (1966) Thymus-marrow cell combinations. Synergism in antibody production. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122:1167.
26. Miller JFAF, Mitchell GF (1968) Cell to cell interactions in the immune response. I. Hemolysis forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. J. Exp. Med. 128:201.
27. Mitchell GF, Miller JFAF (1968) Immunological activity of thymus and thoracic duct lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59:296.
28. Katz DH, Hamaoka T, Benacerraf B (1973) Cell interactions between histoincompatible 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.
29. Katz DH, Graves L, Dorf ME, Dinuzio H, Benacerraf B (1975) Cell interactions between histoincompatible T and B lymphocytes. VII. Cooperative responses between lymphocytes are controlled by genes in the I region of the H-2 complex. J. Exp. Med. 141:363.
30. Shevach EM, Rosenthal AS (1973) Function of the macrophage in the regulation of the genetic control of the murine response. J. Exp. Med. 145:726.
31. Shevach EM, Rosenthal AS (1973) 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.
32. Doherty PC, Zinkernagel RM (1974) H-2 histocompatibility is required for T cell mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. J. Immunol. 112:1548.
33. Zinkernagel RM, Doherty PC (1975) H-2 compatibility requirement for T-cell mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. J. Exp. Med. 141:1427

34. Shearer GM, Rehn TG, Garbarino CA (1975) Cell mediated lympholysis of trinitrophenyl-modified autologous lymphocytes. Effector cell specificity to modified cell surface components controlled by the H-2 K and H-2 D serological regions on the murine major histocompatibility complex. *J. Exp. Med.* 151:1348.
35. Blanden RV, Doherty PC, Dunlop MB, Gardner ID, Zinkernagel RM, David CS (1975) Genes required for cytotoxicity against virus infected target cells in K and D regions of the H-2 complex. *Nature* 254:269.
36. Plata F, Lilly F (1979) 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. INC-UNCLA Symposia on molecular and cellular Biology. Fach FH, Bonavida B, Vitetta ES, Fox CF (eds). pp549.
37. Zinkernagel RM (1979) Association between major histocompatibility antigens and susceptibility to disease. *An. Rev. Microbiol.* 33:201.
38. Rehn TG, Inman JK, Shearer GM (1976) Cell mediated lympholysis of N-3(3nitro 4hydroxy-5 iodophenylacetyl) 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.
39. Koren HS, Wunderlich JR, Inman JK (1975) In vitro development of cytotoxic T cells specific for hapten-associated antigens on syngeneic cells. *Transpl. Proc. VII (Suppl. 1):169.*
40. Gordon RD, Simpson E (1976) H-2 restricted T cells cytotoxic responses to H-Y antigen. In: Proceedings of the Tenth Leukocyte Culture Conference. Eisvogel, Roos VP, Zeylemaker WP (eds). Acad. Press. NY pp 521.
41. Goulmy E, Blokland ELS, van Rood J, Charmot D, Malissen D, Mawas C (1980) 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.

42. Zinkernagel RM, Doherty P (1979) MHC restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction, function and responsiveness. *Adv. Immunol.* 27:51.
43. Paul WE, Shevach EM, Pickeral S, Thomas DW, Rosenthal AS (1977) Independent populations of primed F1 guinea pig T lymphocytes respond to antigen-pulsed parental peritoneal exudate cells. *J. Exp. Med.* 145:618.
44. Sprent J (1978) Restricted helper function of F1 hybrid T cells positively selected to heterologous erythrocytes in irradiated parental strain mice. Failure to collaborate with B cells of the opposite strain not associated with active suppression. *J. Exp. Med.* 147:1142.
45. Swierkosz JE, Rock K, Marrack P, Kappler JW (1978) The role of H-2 linked genes in helper T-cell function. Isolation on antigen-pulsed macrophages of two separate populations of F1 helper T cells each specific for antigen and one set of parental H-2 products. *J. Exp. Med.* 147:554.
46. Allison JP, Ridge L, Lund JA, Gross-Pelos J, Lanier L, McIntyre BW (1984) The murine T cell antigen receptor and associated structures. *Immunol. Rev.* 81 :145.
47. Zinkernagel RM, Callahan GN, Althage A, Cooper S, Klein PA, Klein J (1978) on the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: evidence for dual recognition? *J. Exp. Med.* 147:882.
48. Matzinger P (1981) A one-receptor view of T-cell behaviour. *Nature* 292:497.
49. Zinkernagel RM, Callahn GN, Klein J, Dennert G (1978) Cytotoxic T cells learn specificity for self-H-2 during differentiation in the thymus. *Nature (Lond)* 271:251.
50. Bevan MJ (1977) In a irradiation chimera, host antigens determine the immune responsiveness of donor cytotoxic cells. *Nature* 269:417.
51. Fink JP, Bevan MJ (1978) H-2 antigens of the thymus determine lymphocyte specificity. *J. Exp. Med.* 148:766.

52. Katz DH, Skidmore BJ, Katz LR, Bogowitz CA (1978) Adaptive differentiation of murine lymphocytes differentiating in F1--> parental chimeras manifest preferential cooperative activity for partner lymphocytes derived from the same parental type corresponding to the chimeric host. *J. Exp. Med.* 148:727.
53. Schwartz FH (1984) The role of gene products of the major histocompatibility complex in T cell activation and cellular interactions. *En: Fundamental Immunology*. WE Paul (ed.) Raven Press, NY, pp 379.
54. Katz DH (1980) Adaptive differentiation of lymphocytes: theoretical implications for mechanisms of cell-cell recognition and regulation of immune responses. *Adv. Immunol.* 29:138.
55. H. Wagner (1983). Where is MHC restriction determined? *Progress in Immunol.* V:615
56. Mc Devitt HO, Deak BD, Shreffler DC, Klein J, Stimpfing JH, Snell GD (1972) Genetic control of the immune response. Mapping of the Ir-1 locus. *J. Exp. Med.* 135:1259.
57. Beller DI, Inanue ER (1980) Ia antigens and antigen presenting function of thymic macrophages. *J. Immunol.* 124:1433.
58. Klein J (1984) What causes immunological non-responsiveness? *Immunol. Rev.* 81:177.
59. Rosenthal AS, Barcinski MA, Blake JT (1977) Determinant selection is a macrophage dependant immune response gene function. *Nature* 267:156.
60. Janeway CA (1983) Immune response genes, the problem of non responder. *J. Mol. Cell. Immunol.* 1:15.
- ..
61. Muhlbacher A (1981) Neonatal tolerance to alloantigens alters major histocompatibility complex restricted patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1648.
62. Araneo AB, Kapp JA (1980) H-2 linked gene control of T cell proliferative responses to the syntetic terpolymer L-glutamic acid(60)-alanine(30)-L-tyrosine(10) (GAT) I. Requirements

for T cell activation in responder and nonresponder mice.
J.Immunol.124:1492.

63. Ishii N, Baxevanis CN, Nagy ZA, Klein J (1981) Responder T cells depleted of alloreactive cells react to antigen presented on allogeneic macrophages from nonresponder strains .J.Exp.Med. 154:987.
64. Weksler ME, Kozak R (1977) Lymphocyte transformation by autologous cells.V.Generation of immunologic memory and specificity during the autologous mixed lymphocyte reaction.J.Exp.Med.146:1833.
65. Russo C, Indiveri F, Quaranta V, Molinaro G, Pellegrino MA, Ferrone S (1981) Stimulation of human T lymphocytes by PHA-activated autologous T lymphocytes: analysis of the role of Ia-like antigens with monoclonal antibodies. Immunogenetics 12:267.
66. Palacios F, Claesson L, Moller G, Peterson FA, Moller E (1982) The alpha chain, not the beta chain of HLA-Dr antigens participates in activation of T cells in autologous mixed lymphocyte reaction.Immunogenetics 15:341.
67. Bensussan A, Meurer SC, Schlossman FS, Reinherz EL (1984) Delineation of an immunoregulatory amplifier population recognizing autologous Ia molecules.Analysis with human T cell clones.J.Exp.Med. 159:559.
68. Haussman FB, Moody CE, Innes J, Gibbons JJ, Weksler ME (1983) Studies on the syngeneic mixed lymphocyte reaction. III.Development of a monoclonal antibody with specificity for autoreactive T cells.J.Exp. Med. 158:1307.
69. Romain FL, Schlossman SF, Reinherz EL (1984) Surface molecules involved in self-recognition and T cell activation in the autologous mixed lymphocyte reaction. J. Immunol. 133:1093.
70. Nussenzweig MC, Steinman RM (1980) Contribution of dendritic cells to stimulation of the murine syngeneic mixed lymphocyte reaction .J. Exp. Med. 151:1196.

71. Kohler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature (Lond.)* 256:496
72. Huber C, Merckenschlager M, Gattringer C, Royston I, Fink U, Braunsteiner H (1982) Human autologous mixed lymphocyte reactivity is primarily specific for xenoprotein determinants adsorbed to antigen-presenting-cells during rosette formation with sheep erythrocytes. *J. Exp. Med.* 155: 1222.
73. Yamashita U, Ono S, Nakamura H (1982) The syngeneic mixed leukocyte reaction in mice. I. The cellular and genetic mechanism of the syngeneic mixed leukocyte reaction. *J. Immunol.* 128:1003.
74. Fasternak RD, Bocchieri MH, Smith JB (1980) Surface phenotype of responder cells in the syngeneic mixed lymphocyte reaction in mice. *Cell. Immunol.* 49:384.
75. Haussman FB, Stites DP, Stobo JB (1981) Antigen-reactive T cell can be activated by autologous mixed lymphocyte are required for the response to conventional antigen. *J. Immunol.* 125:1374.
76. Dos Reis GA, Shevach EM (1981) The syngeneic mixed leukocyte reaction represents polyclonal activation of antigen-specific T lymphocytes with receptors for self-Ia antigens. *J. Immunol.* 127:2456.
77. Rock KL, Benacerraf B (1983) The role of Ia molecules in the activation of T lymphocytes. III. Antigen-specific, Ia restricted, interleukin 2-producing T cell hybridomas with detectable affinity for the restricting I-A molecule. *J. Exp. Med.* 157:359.
78. Zauderer M, Campbell H, Johnson DR, Seman M (1984) Helper function of antigen induced specific and autoreactive T cell colonies. *J. Mol. Cell. Immunol.* 1:65.
79. Smith JB, Knowlton RP (1979) Activation of suppressor T cells on human autologous mixed lymphocyte culture. *J. Immunol.* 123:419.
80. Sanaka T, Green (1979) Specificity and suppressor function of human T cells responsive to autologous non-T

cells. J. Immunol. 123:584.

81. James SF, Yenokida GG, Graeff AS, Strober W (1982) Activation of suppressor T cells by autologous lymphoblastoid cells: a mechanism for feedback regulation of immunoglobulin synthesis. J. Immunol. 128: 1149.
82. Hodes RH, Hathcock (1976) In vitro generation of suppressor cell activity: suppression of in vitro induction of cell-mediated cytotoxicity. J. Immunol. 116:1115.
83. Yamashita U, Ono S, Nakamura H (1982) The syngeneic mixed leukocyte reaction in mice. II. The I region control of suppressor T cell activity induced in the syngeneic mixed leukocyte reaction. J. Immunol. 128:1010.
84. Haussman FH, Raff HV, Gilbert RC, Ficker LJ, Stobo JD (1980) T cells and macrophages involved in the autologous mixed lymphocyte reaction are required for the response to conventional antigen. J. Immunol. 125:1374.
85. Weksler ME, Moody CE, Kozak RW (1981) The autologous mixed lymphocyte reaction. Adv. Immunol. 31:271.
86. Hom JT, Talal N (1982) Decreased syngeneic mixed lymphocyte response (SMLR) in genetically susceptible autoimmune mice. Scand. J. Immunol. 159:195.
87. Talal N, Roubinian JR, Shear H, Hom JT, Miyasaka N (1980). Progress in the mechanisms of autoimmune disease. En: Progress in Immunology IV, Fourth International Congress of Immunology, 1980, pp 889.
88. Carnaud C, Charriere J, Bach JF (1977) Adult thymectomy promotes the manifestation of autorreactive lymphocytes. Cell Immunol. 28:274.
89. Small M, Trainin N (1975) Control of autorreactivity by a humoral factor of the thymus (THF). Cell. Immunol. 20:1.
90. L'age-Sther J, Diamantstein (1987) Induction of autorreactive T lymphocytes and their suppressor cells by cyclophosphamide. Nature 271:663.

91. Gozes Y, Umiel T, Meshorer A, Trainin N (1978) Syngeneic GvH induced in popliteal lymph nodes by spleen cells of old C57BL/6 mice. *J. Immunol.* 121:2199.
92. Walford RL (1974) Immunologic theory of aging. *Fed. Proc.* 33:2020.
93. Rollinghoff M, Starzinski-Powitz A, Pfizenmaier K, Wagner H (1977) Cyclophosphamide-sensitive T lymphocytes suppress the in vivo generation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 145:455.
94. Howard J, Wilson DB (1974) Specific positive selection of lymphocytes reactive to strong histocompatibility antigens. *J. Exp. Med.* 140:660.
95. Mage MG, Mc Hugh L (1975) Specific partial depletion of graft-vs-host activity by incubation and centrifugation of mouse spleen cells on allogeneic spleen cells monolayers. *J. Immunol.* 115:911.
96. Kornbluth J, Dupont B (1980) Cloning and functional characterization of primary alloreactive human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 152:164s.
97. Wilson DB, Blyth LJ, Nowell FC (1968) Quantitative studies on the mixed lymphocyte interaction in rats. III. Kinetics of the response. *J. Exp. Med.* 128:1157.
98. Bevan MJ (1976) H-2 antigen-specific cytotoxic cells induced by concanavalin A: estimation of their reactive frequency. *Europ. J. Immunol* 6:150.
99. Simonsen M (1976) Graft-versus-host studies in experimental animals. In: A transplantation proceedings reprint. *Immunobiology of bone marrow transplantation.* B. Dupont y RA Good (eds). Grune & Stratton, NY, pp 3.
100. Wilson DB, Nowell FC (1971) Quantitative studies on the mixed lymphocyte interaction in rats. V. Tempo and specificity of the proliferative response and the number of reactive cells from immunized donors. *J. Exp. Med.* 133:442.
101. Janeway C, Jones B, Binz H, Frischknecht H, Wizzell H (1980) T cell receptor idiotypes. *Scand. J. Immunol* 12:83.

102. Bevan MJ (1977) Killer cells reactive to altered-self antigens can also be alloreactive. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 74:2094.
103. Benacerraf B (1981) Role of MHC gene products in immune regulation. *Science* 212:1229.
104. Herber-Katz E, Wilson DB (1976) 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.
105. Finberg R, Bukaroff SJ, Cantor H, Benacerraf B (1978) Biological significance of alloreactivity: T cells stimulated by Sendai virus-coated syngeneic cells specifically lyse allogeneic target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3145.
106. Pflizenmaier K, Stockinger H, Tollinghoff M, Wagner H (1980) Herpes-simplex-virus-specific, H-2D(k) restricted T lymphocytes bear receptors for H-2D(d) alloantigen. *Immunogenetics* 11:169.
107. Piazzon MI, Deroche A, Fasqualini CD (1985) Maternal immunoregulation: Interrelationship between alloreactive and anti-self plus conventional antigen T sets of cells. *J. Repr. Immunol.* In press.
108. Sredni E, Schwartz RH (1980) Alloreactivity of an antigen-specific T-cell clone. *Nature* 287:855.
109. Sredni E, Swartz H (1981) Antigen-specific, proliferating T lymphocyte clones. Methodology, specificity, MHC restriction and alloreactivity. *Immunol. Rev.* 54:187.
110. Kaye, J, Janeway CA Jr (1984) The Fab fragment of a directly activating monoclonal antibodies that precipitates a disulfide linked heterodimer from a helper T cell clone blocks activation by either allogeneic-Ia or Antigen and self-Ia. *J. Exp. Med.* 159:1397.
111. Golub ES (1977) The cellular basis of the immune response. An approach to immunobiology. *Sinauer Associates Sunderland, Massachusetts*, pp 39.

112. Elkins WL (1971) Cellular immunology and the pathogenesis of graft-versus-host reactions. *Progr. Allergy* 15:78.
113. van Elven EH, Rolink AG, van der Veen F, Gleichmann E (1981) Capacity of genetically different T lymphocytes to induce lethal graft-vs-host disease correlates with their capacity to generate anti-F1 killer cells. A non H-2 locus determines the inability to induce lethal graft-vs-host disease. *J. Exp. Med.* 153:1474.
114. Daguillard FR, Garneau L, Deschne C, Casuinard C, Fudenberg HH (1973) Hyperreactive production of antibody of a boy with thymic dysplasia undergoing graft-versus-host reaction. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 2:52.
115. Rolink AG, Radaszkiewicz T, Fals ST, van der Meer WG, Gleichmann E (1982) Allosupresor and allohelper T cells in acute and chronic graft-versus-host disease. I. Alloreactive suppressor cells rather than killer cells appear to be the decisive effector cells in lethal graft-vs.-host disease. *J. Exp. Med.* 155:1501.
116. Rolink GA, Steven TP, Gleichmann E (1983) Allosuppressor and allohelper T cells in acute and chronic graft-vs.-host disease. II. F1 recipients carrying mutations at H-2K and/or I-A. *J. Exp. Med.* 156:329
117. Ford WL, Simonsen MM (1970) A lymph node weight assay for the graft-versus-host activity of rat lymphoid cells. *Transplantation* 10:258.
118. Pimsler M, Forman J (1980) Use of H-2 mutations to quantitate alloreactivity: alloreactivity is strongest against H-2 antigens wich are closest to self. *Immunogenetics* 11:111.
119. Elkins WL (1978) Effector mechanisms and graft-vs.-host disease. *Transplantation Proc.* 1:15.
120. Woodland FT, Wilson DB (1977) The induction of specific resistance in F1 hybrid rats to local graft versus host reactions: nature of the eliciting cell. *Eur. J. Immunol* 7:136.
121. Bellgreau D, Wilson DB (1978) 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.
122. Bellgreau D, Wilson DB (1979) Immunological studies of T-receptors. II. Limited polymorphism of idiotypic determinants on T-cell receptors specific for major histocompatibility complex alloantigens. *J. Exp. Med.* 149:234.
123. Kimura H, Wilson DB (1984) Anti-idiotypic cytotoxic T cells in rats with graft-versus-host disease. *Nature* 308:463.
124. Bellgreau D, Smilik D, Wilson DB (1981) Induced tolerance in F1 rats to major histocompatibility complex receptors on parental T cells. Implications for self-tolerance. *J. Exp. Med.* 153:1660.
125. Wilson DB (1984) Idiotypic regulation of self-reactive and allo-reactive T cells in autoimmunity and graft-versus-host disease. *Immunol. Today* 5:228.
126. Gowas JL (1962) The fate of parental strain small lymphocytes in F1 hybrid rats. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 99:432.
127. Graff RJ, Bailey DW (1973) The non-H-2 histocompatibility loci and their antigens. *Transpl. Rev.* 15:26.
128. Klein J (1980) Les genes de la resistance aux maladies. *La Recherche* 109:294.
129. Fensing GG, Cohen G, Lansbergen, van Food JJ (1979) Retrospective and prospective studies on the effect of blood transfusions in renal transplantation in The Netherlands. *Transplantation* 32:48.
130. Festenstein H, Bishop C, Taylor BA (1977) Location of Mls locus on mouse chromosome 1. *Immunogenetics* 5:264.
131. Festenstein H (1973) Immunogenetic and biological aspects of in vitro lymphocyte allotransformation (MLR) in the mouse. *Transpl. Rev.* 15:62.

132. Janeway CA Jr., Lerner EA, Jason JM, Jones B (1980) T lymphocytes responding to Mls-locus antigens are Lyt-1(+), 2(-) and are IA restricted. *Immunogenetics* 10:481.
133. Gress FE, Wesley MN, Hodes RJ (1981) The role of H-2 in T cell recognition of Mls. *J. Immunol.* 127:1763.
134. Glasebrook AW, Fitch FW (1980) Alloreactive cloned T cell lines. I. Interactions between cloned amplifier and cytolytic T cell-lines. *J. Exp. Med.* 151:876.
135. Ben-Nun A, Lando Z, Dorf ME, Bukaroff S (1983) Analysis of cross-reactive antigen-specific T cell clones. Specific recognition of two major histocompatibility complex (MHC) and two non MHC by a single clone. *J. Exp. Med.* 157:2147.
136. Dubreuil FC, Caillol DH, Lemonnier FA (1982) Analysis of unexpected inhibitions of T lymphocyte proliferation to soluble antigen, alloantigen and mitogen by unfragmented anti-I-A(k) or anti-I-E/C(k) monoclonal antibodies. *J. Immunogenetics* 9:11.
137. Janeway CA Jr., Conrad FJ, Tite J, Jones B, Murphy DB (1983) Efficiency of antigen presentation differs in mice differing at the Mls locus. *Nature* 306:80.
138. L'age-Stehr J, Teichman H, Gershon RK, Cantor H (1980) Stimulation of regulatory T cell circuits by immunoglobulin-dependent structures on activated B cells. *Eur. J. Immunol* 10:21.
139. Eardley DD, Murphy DB, Kemp JD, Shen FW, Cantor H, Gershon RK (1980) Ly-1 inducer and Ly-1,2 acceptor cells in the feedback suppression circuit bear an I-J subregion controlled determinant. *Immunogenetics* 11:549.
140. Flood F, Yamauchi K, Singer A, Gershon RK (1982) Homologies between cell-interaction molecules controlled by MHC and Igh-V linked genes that T cells use for communication: Tandem "adaptive differentiation" of producer and acceptor cells. *J. Exp. Med.* 156:1390.
141. Yamauchi K, Chao N, Murphy DB, Gershon RK (1982) Molecular composition of an antigen-specific, Ly-1 T suppressor

- inducer factor : one molecule binds antigen and is I-J⁻, another is I-J⁺. does not bind antigen, and imparts an Igh-variable region linked restriction. J.Exp.Med. 154:964.
142. Gershon RK, Eardley DD, Drum S, Green DR, Shen FW, Yamauchi K, Cantor H, Murphy DB (1981) Contrasuppression: a novel immunoregulatory activity. J.Exp.Med. 153:1533.
143. Green DR, Gershon RK (1982) Hyperimmunity and the decision to be intolerant. Ann.N.Y.Acad.Sci. 392:318.
144. Green DR, Earfley DD, Kimura A, Murphy DB (1981) Immunoregulatory circuits wich modulate responsiveness to suppressor cell signals : Characterization of an effector cell in the contrasuppressor circuit. Eur.J. Immunol. 11:973.
145. Mosier DE, Johnson EM (1975) Ontogeny of mouse lymphocyte function. II. Development of the ability to produce antibody is modulated by T lymphocytes. J.Exp.Med. 141:216.
146. Gershon RK, Eardley DD, Durum DD, Shen FW, Yamauchi K, Cantor H, Murphy DB (1981) Contrasuppression : a novel immunoregulatory activity. J.Exp.Med. 153:1533.
147. Green DR, Chue B, Gershon RK (1983) Two types of T cell suppression discriminated by action on the contrasuppression circuit. J.Mol.Cell.Immunol. 1:79.
148. Smith HR, Green DR, Raveche ES, Smathers FA, Gerson RK, Steinberg AD (1982) Studies of the induction of anti-DNA in normal mice. J.Immunol. 129 2332.
149. Hodes FJ, Hathcock KS (1976) In vitro generation of suppressor cell activity: Suppression of in vitro induction of cell mediated cytotoxicity. J.Immunol. 116:167
150. Skowron-Cendrzak A, Rybcynska RK, Gershon RK, Ptak W (1983) Ontogenic development of contrasuppression. Proc.Natl.Acad. Sci.USA 80:5052.
151. Raybourne E, Arnold LW, Haughton G (1981) Perturbation of early development of the immune system by normal adult T

lymphocytes. *J. Immunol.* 127:1142.

152. Fodkey LL (1974) Studies of idiotypic antibodies. Production and characterization of auto-anti-idiotypic antisera. *J. Exp. Med.* 139:712.
153. Owen FL, Nisonoff A (1978) Effect of idiotypic-specific suppressor T cells on primary and secondary responses. *J. Exp. Med.* 148:182.
154. Juy D, Frimi D, Cazenave FA (1982) Idiotypic regulation: evidence for the involvement of Igh-C restricted T cells in the M 460 idiotype suppressive pathway. *Europ. J. Immunol.* 12:24.
155. Paul WE, Bona C (1982) Regulatory idiotypes and immune networks: a hypothesis. *Immunol. Today* 3:230.
156. Rath M, Kelsoe G, Fajewsky K (1981) Idiotypic regulation by isologous monoclonal anti-idiotypic antibodies. *Nature* 290:257.
157. Fajewsky K, Takemori T (1983) Genetics, expression, and function of idiotypes. *Ann. Rev. Immunol.* 1:569.
158. Wikler M, Frassen JD, Loe O, Marime B, Van de Walle F, De Groot D, Urbain J (1979) Idiotype regulation of the immune system. Common idiotypic specificities between idiotypes and antibodies raised against anti-idiotypic antibodies in rabbits. *J. Exp. Med.* 150:184.
159. Koler H, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495.
160. Eichmann K (1978) Expression and function of idiotypes on lymphocytes. *Adv. Immunol.* 26:195.
161. Theze J, Moreau JL (1978) Genetic control of the immune response to the GAT terpolymer. *Ann. Immunol. (Paris)* 129C:26.
162. Makela O, Karjalainen K (1977) Inherited immunoglobulin idiotypes of the mouse. *Immunol. Rev.* 34:119.

163. Heyner S (1983) Alloantigen expression on mouse oocytes and early embryos. *Immunology of reproduction*. TG Wegmann and TJ Gill III eds., Oxford University Press, NY, pp79
164. Beer AE, Quebberman JF, Clyers JWT, Haines, RF (1981) Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune response, and chronic abortin in humans. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 141:982.
165. Swinburne LM (1970) Leukocyte antigens and placental sponge. *Lancet* 1:592.
166. Chouat G, Kolb JP, Wegmann TG (1983) The murine placenta as an immunological barrier between the mother and the fetus. *Immunol. Rev.* 75:31.
167. Wegmann TG, Mosmann TR, Carlson G, Olnick O, Singh B (1979) The ability of the murine placenta to absorb monoclonal anti-fetal H-2K antibody from the maternal circulation. *J. Immunol.* 122:270.
168. Wegmann TG, Barrington Leigh J, Carlson G, Mosmann TR, Raghupaty R, Singh B (1980) Quantitation of the capacity of the placenta to absorb monoclonal antifetal H-2 K antibody. *J. Repr. Immunol.* 2:53.
169. Raghupathy R, Singh B, Barrington Leigh J, Wegmann TG (1981) The ontogeny and turnover kinetics of paternal H-2K antigenic determinants on the allogeneic murine placenta. *J. Immunol.* 127:2074.
170. Wegman TG (1983) The placental immunological barrier. *En: Reproductive Immunology 1983*. S. Isojima y WD Billington, eds. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, pp111.
171. Voisin GA, Chouat G (1974) Demonstration, nature and properties of maternal antibodies fixed on placenta, and directed against paternal antigens. *J. Reprod. Fertil.* 21(Suppl):89.
172. Clark DA, Mc Dermott M, Sczewczuk MR (1980) Impairment of host vs. graft reaction in pregnant mice: II. Selective suppression of cytotoxic cell generation correlates with soluble suppressor activity and with soluble suppressor activity and with successful allogeneic pregnancy. *Cell. Immunol.* 52:106.
173. Voisin G.A. (1983) Enhancing antibodies and suppressor cells

in pregnancy:role of the placentation.En:Reproductive Immunology.S.Isojima y WD Billington,eds.Elsevier Science Publishers BV.Amsterdam.pp 121.

- 174.Beer AE, Billingham RE (1976): The immunobiology of mamalian reproduction, Prentice-Hall Inc.,Englewood Clifs, New Jersey.
- 175.Beer AE, Billingham RE (1974)The embryo as a trasplant. Scientific American 230:36.
- 176.Fiazzon M,Matusevich M,Deroche A,Nepomnaschy I,Fasqualini CD (1985) Early increase in graft-versus-host reactivity during pregnancy in the mouse.J.Reprod.Immunol.In press.
- 177.Voisin GA (1983)Immunological interventions of the placenta in maternal immunological tolerance to the fetus.En:Immunology of reproduction. TG Wegmann y TJ II Gill (eds.).Oxford University Press.N.Y.pp 181.
- 178.Beer AE,Billingham RE (1979)Maternal immunological recognition mechanisms during pregnancy.En:Maternal recognition mechanisms. CIBA Foundation Symposium.Vol 64:293.
- 179.Jacoby DR (1984) Regulation of fetal-maternal balance.Adv. Immunol. 35:157.
- 180.Walknowska J,Conte FA,Grunbath MM(1969)Practical and theoretical implications of fetal/maternal lymphocyte transfer.Lancet I:1119.
- 181.Collins GD,Chrest FJ,Adler WH (1981) Maternal cell traffic in allogeneic embryos.J.Reprod.Immunol.2:163.
- 182.Billingham RE(1983) Natural and artificial chimeras and reproductive immunology. En: Reproductive immunology 1983. J.Isojima y WD Billington,eds.Elsevier,Amsterdam.pp 47.
- 183.Hunziker RD, Gambel P, Wegmann TG (1983)Absence of maternal cellular traffic across the placenta.J.Repr.Immunol.Suppl.31
- 184.Beer AE,Head JR,Smith WG,Billingham RE (1976) Some immunoregulatory aspects of pregnancy in rats.Transpl.Proc. 8:267.

185. Matusevich M, Andrada EC, Piazzon I, Pasqualini CD (1980) Daño fetal en el ratón por pretratamiento de la madre con injertos de piel o de tumor de origen paterno. *Medicina (Bs.As.)* 40:543.
186. Matusevich M, Piazzon I, Deroche A, Pasqualini CD (1981) Daño fetal en el ratón por pretratamiento de la madre con antígenos tumorales. *Medicina (Bs.As.)* 41:321.
187. Pasqualini CD, Piazzon I, Matusevich M, Deroche A (1982) From tumor-host to materno-fetal relationship: immunological studies. En: *Physiopathology of hypophysial disturbances and diseases of reproduction*. Liss A.R. Inc, NY, pp 277
188. Piazzon IM (1982) Receptores para antígenos convencionales en linfocitos T alorreactivos. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.
189. Beer AE, Quebberman JF (1982) The immunobiology and immunopathology of the maternal-fetal relationship. En: *Physiopathology of hypophysial disturbances and diseases of reproduction*. Liss A.R. Inc, N.Y. pp289.
190. Geha RS, Reinherz EL (1983). Identification of circulating maternal T and B lymphocytes in uncomplicated severe combined immunodeficiency by HLA typing of subpopulation of T cells separated by the fluorescence-activated cell-sorter and of Epstein-Barr virus-derived B cell lines. *J. Immunol.* 130:2493.
191. Beer AE, Billingham RE (1973) Maternally acquired runt disease. *Science* 179:240.
192. Ogra SS, Ogra LP (1979) Components of immunologic reactivity in human colostrum and milk. En: *Immunology of breast milk*. P.L. Ogra y DH Dayton, eds. Raven Press, N.Y. pp185.
193. Hanson LA (1982) The mammary gland as an immunological organ. *Immunol. Today* 3(6):168.
194. Farmely MJ, Beer AE, Billingham RE (1976) In vitro studies on the T-lymphocyte population of human milk. *J. Exp. Med.* 144:358.

195. Roux ME, Mc Williams M, Phillips-Quagliata JM, Weiss-Carrington FW, Lamm ME (1977) Origin of IgA secretory plasma cells in the mammary glands. *J. Exp. Med.* 146:1311.
196. Lamm EM, Weisz-Carrington F, Roux ME, McWilliams M, Phillips-Quagliata J. (1979) Mode of induction of an IgA response in the breast and other secretory sites by oral antigen. En: *Immunology of breast milk*. FL Ogra y DH Dayton, eds. Raven Press, N.Y., pp 105.
197. Weisz-Carrington F, Roux ME, McWilliams M, Phillips-Quagliata JM, Lamm ME (1978) Hormonal induction of the secretory immune system in the mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:2928.
198. Franklin RM, Prendergast RA, Silverstein AM (1978) Nonspecific signals for B-cell localization and activation. *J. Exp. Med.* 148:1705.
199. Elson CO, Heck JA, Strober W (1979) T cell regulation of murine IgA synthesis. *J. Exp. Med.* 149:662.
200. Cruz JR, Garcia B, Urrutia JJ, Carlson B, Hanson LA (1981) Food antibodies in milk from Guatemala. *J. Pediatr.* 99:600.
201. Hanson LA, Carlsson B, Cruz JR, Garcia B, Holmgren J, Shaukat R, Khan, Lindblad BS, Svennerholm A-M, Svennerholm B, Urrutia J (1979) Immune response in the mammary gland. En: *Immunology of breast milk*. FL Ogra y DH Dayton, eds. Raven Press, NY. pp 145.
202. Farmely MJ, Williams SB (1979) Selective expression of immunocompetence in human colostrum: preliminary evidence for the control of cytotoxic T lymphocytes including those specific for the paternal alloantigens. En: *Immunology of breast milk*. FL Ogra y D Dayton, eds. Raven Press. N.Y. pp 173.
203. Billingham RE, Head JR (1983) The riddle of the allogeneic conceptus. *Transpl. Proc.* XV(1):877.
204. Weiber I, Hickler W, Sprenger R (1983) Demonstration that milk cells invade the suckling neonatal mouse. *Am. J. Reprod. Immunol.* 4:95.
205. Boass A, Willson TH (1963) Development of mechanisms for intestinal absorption of vitamin B12 in growing rats. *Am. J. Physiol.* 204:101.

206. Luckey TD, Mende TJ, Pleasants J (1954) The physical and chemical characterization of rat's milk. *J. Nutr.* 54:345.
207. Agunod M, Yamaguchi N, Lopez R, Lohby AL, Glass GBJ (1969) Correlative study of hydrochloric acid, pepsin, and intrinsic factor secretion in newborns and infants. *Am. J. Dig. Dis.* 14:400.
208. Mason S (1962) Some aspects of gastric function in the newborn. *Arch. Dis. Child.* 37:387.
209. Tatematsu M, Takahashi M, Tsuda H, Hirose M, Furihata C, Sugirama T (1975) Precocious differentiation of immature chief cells in fundic mucosa of infant rats induced by hydrocortisone. *Cell Differentiation* 4:285.
210. Beer AE, Billingham RE, Head JR (1975) Natural transplantation of leukocytes during suckling. *Transpl. Proc.* 9:1455.
211. Uphoff DE (1977) Runt disease in suckling hybrid mice. Substrain differences and litter seriation. *Transpl. Proc.* 9:1455.
212. Head JR, Beer AE (1979) In vivo and in vitro assessment of the immunologic role of leukocytic cells in milk. In: *Immunology of the breast milk*. FL Ogra, DH Dayton (eds) Raven Press, N.Y. pp 207.
213. Allan S, Cunningham AS, Cooperstown NY (1979) Morbidity in breast-feed and artificially fed infants. II. *J. Pediatr.* 95:685.
214. Welsh JK, May JT (1979) Anti-infective properties of breast milk. *J. Pediatr.* 94:1.
215. Nossal GJV, Pike BL (1978) Mechanisms of clonal abortion tolerogenesis. I. Response of immature, hapten specific B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 148:1161.
216. Auerbach R, Clark S (1975) Immunological tolerance: transmission from mother to offspring. *Science* 189:811.
217. Scott DW, Venkaraman M, Jandinski JJ (1979) Multiple pathways of B lymphocyte tolerance. *Immunol. Rev.* 43:241.

218. Loblav R, Fazekas de St Groth B, Fritchard-Briscoe H, Basten A (1983) Suppressor T cell memory. II. The role of memory suppressor T cells in tolerance to human gamma globulin. *J. Exp. Med.* 157:957.
219. Weiler IJ, Weiler E, Springer R, Cosenza H (1977) Idiotype suppression by maternal influence. *Eur. J. Immunol.* 7:591.
220. Bona C, Stein KE, Lieberman R, Paul WE (1979) Direct and indirect suppression induced by anti-idiotypic antibodies in the inulin-bacterial levan antigenic-system. *Mol. Immunol.* 16:1093.
221. Bernabe RR, Coutinho A, Cazenave PA, Forni L (1981) Suppression of recurrent idiotype results in profound alterations of whole B cell compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6416.
222. Bona C, Paul WE (1979) Cellular basis of regulation of expression of idiotype/I.T-suppressor cells specific for MOFC 460 idiotype regulate the expression of cells secreting anti-TNP antibodies bearing 460 idiotype. *J. Exp. Med.* 149:592.
223. Doth Y, Nissonoff A (1979) Suppression of idiotype and generation of suppressor T cells with idiotype-conjugated thymocytes. *J. Exp. Med.* 150:909.
224. Mitchinson NA, Secarz EE (1979) Helper and suppressor epitopes. In: T and B lymphocytes: Recognition and function. INC-UNCLA Symposia on molecular and cellular biology. Bach FH, Bonavida B, Vitetta ES, Fox CF (eds), pp289.
225. Nossal GJV (1983) Cellular mechanisms of immunologic tolerance. *Ann. Rev. Immunol.* 1:33
226. Bona C, Lieberman R, House S, Green I, Paul W (1979) Immune response to levan II. Independence of suppression of cross-reactive idiotype by anti-idiotypic antibodies. *J. Immunol.* 122:1614.
227. Nissonoff A, Ju ST, Owen FL (1977) Studies of structure and immunosuppression of a cross-reactive idiotype in strain A mice. *Immunol. Rev.* 34:98.
228. Wilker M, Demeur C, Dewasme G, Urbain J (1980) Immunoregulatory role of maternal idiotypes. Ontogeny of immune networks. *J. Exp. Med.* 152:1024.

229. Rubinstein LJ, Bona CA (1983) Idiotype-Anti-Idiotype network: III. Genetic control of activation of A48 Id silent clones subsequent to manipulation of the immune network. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 418:97.
230. Yamashita V, Hamaoka T (1979) The requirement of Ia positive accessory cells for the induction of hapten-reactive cytotoxic T lymphocytes in vitro. *J. Immunol.* 123:2637.
231. Uphoff DE (1973) Maternal influences on the immune response. *Biomedicine* 18:13.
232. Uphoff DE (1970) Maternal modification of tissue antigenicity and the histocompatibility-2 (H-2) locus. *J. Natl. Cancer Inst.* 45:1035.
233. Uphoff DE (1972) Maternal modification of antigen recognition in ova-transfer substrain FIIIe B. *J. Natl. Cancer Inst.* 48:517.
234. Morse HC III, Harrison MR, Asofsky R (1974) Graft-vs.-host reactions in reciprocal hybrid mice. I. Dissociation of YT-cell activities in the mixed lymphocyte reaction and two graft-vs.-host assays. *J. Exp. Med.* 139:721.
235. Fischer Lindahl K, Bocchieri M, Riblet R (1980) Maternally transmitted target antigen for unrestricted killing by NZB T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 152:1583.
236. Fischer Lindahl K, Hausmann B, Chapman VM (1983) A new H-2-linked class I gene whose expression depends on a maternally inherited factor. *Nature* 306:383.
237. Smith R III, Rich RR (1985) Polymorphism and tissue distribution of maternally transmitted antigen defined by cytotoxic T lymphocyte lines. *J. Immunol.* 134:2191.
238. Polisson RP, Shearer GM (1980) Mutual recognition of parental and F1 lymphocytes. II. Analysis of graft-versus-host response. *J. Immunol.* 125:1855.

Ontogeny of the immune system: Newborn cells capable of regulating maternal alloreactivity. Enviado para su publicación.

240. Piazzon I, Nepomnaschy I, Dèroche A, Pasqualini CD (1985) Maternal influences in self-recognition (1985) Am.J.Repr. Immunol.1:445.
241. Oncogenic viruses (1961) Gross L., Pergamon Press, Oxford.
242. Weiss R (1982) Experimental biology and assay of RNA tumor viruses. Weiss R, Teich N, Varmus H, Coffin J (eds.) Cold Spring Harbor Ed., pp 209.
243. Saal F, Pasqualini CD, Rabasa SL (1970) Study of the Gross Antigen in BALB/ leukemias and tumors of different origin. Int.J.Cancer.5:338 .
244. Rowe WF, Hartley JW (1972) Studies of genetic transmission of murine leukemia virus by AKR mice. II. Crosses with "Fv-1" strains of mice. J.Exp.Med.136:1286.
245. Riesser R, Grunwald DJ (1981) Production of anti-self H-2 antibodies by hybrid mice immune to a viral tumor. Nature 289:563.
246. Nakano K, Nakamura I, Cudowicz G (1981) Generation of F1 hybrid cytotoxic T lymphocytes specific for self H-2. Nature 289:559.
247. Billingham R, Silvers W (1971) The immunobiology of transplantation. Osler A, Weiss L (eds) Prentice-Hall Inc, Englewood Cliffs, New Jersey.
248. Margni RA (1982) Inmunologia e imunoquímica. Fundamentos. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
249. O'Neill HC, Blanden RV (1979) Quantitative differences in the expression of parentally derived H-2 antigens in F1 hybrid mice affect T-cell responses. J.Exp.Med. 149:724.
250. O'Neill HC (1980) Quantitative variation in H-2 antigen expression II. Evidence for a dominance pattern in H-2 K and

H-2 D expression in F1 hybrid mice. *Immunogenetics* 11:241.

251. Fischer Lindahl K, Burki K (1982) Mta, a maternally inherited cell surface antigen of the mouse, is transmitted in the egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5362.
252. Huston MM, Smith R III, Huston DP, Rich RR (1983) Differences in maternal lineages of New Zealand Black mice defined by restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA and by expression of maternally transmitted antigen. *J. Exp. Med.* 157:2154.
253. Smith R III, Huston MM, Jenkins RN, Huston DP, Rich RR (1983) Mitochondria control expression of a murine cell surface antigen. *Nature* 306:383.
254. Mengle-Gaw L, Mo Devitt HO (1985) Genetics and expression of mouse Ia antigens. *Ann. Rev. Immunol.* 3:367.
255. Janeway CA Jr, Bottomly K, Babich J, Conrad F, Conzen S, Jones B, Kaye J, Katz M, Mc Vay L, Murphy DB, Tite J (1984) Quantitative variation in Ia antigen expression plays a central role in immunoregulation. *Immun. Today* 5:99.
256. Cullen SE, Kindle CS, Shreffler DC, Cowing C (1981) Differential glycosylation of murine and spleen adherent cell Ia antigens. *J. Immunol.* 127:4.
257. Sung E, Jones PP (1981) The invariant chain of murine Ia antigens: its glycosylation, abundance, and subcellular localization. *Mpl. Immunol.* 18:899.
258. Stankova J, Rola-Pleszczynsky M. (1984) Suppressor cells in the human maternal-fetal relationship. *J. Repr. Immunol.* 6:49
259. J. Urbain, Francotte M, Franssen JD, Hiernaux J, Leo O, Moser M, Slaoui M, Urbain-Vensanten G, Van Acker A, Wilker M (1983) From clonal selection to immune networks: induction of silent idiotypes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 418:1.
260. Benacerraf B, Greene MI, Sy MS, Dorf, ME (1982) Suppressor T cell circuits. *Ann. NY. Acad. Sci.* 392:300.

ABREVIATURAS

AMH : antígenos mayores de histocompatibilidad.

AmH : antígenos menores de histocompatibilidad.

CMH : complejo mayor de histocompatibilidad.

CMLA : cultivo mixto de linfocitos alogeneico.

CMLS : cultivo mixto de linfocitos singeneico.

e.v. : endovenosa.

GvH : injerto contra huésped.

GvHS : injerto contra huésped singeneico.

GRC : glóbulos rojos de carnero.