ISSN 0025-7680

REEVALUACION DE LA INMUNOLOGIA TUMORAL
Simposio Internacional
Academia Nacional de Medicina
Buenos Aires, 27 agosto 1996

MEDICINA (Buenos Aires) 1996; 56 (Supl I): 45-56

CARACTERIZACION INMUNOBIOLOGICA DE LA LEUCEMIA MURINA LB Y LA LINEA CELULAR LBC

SILVIA E. HAJOS*, CLAUDIA MONGINI#, CLAUDIA WALDNER#, MARIANO SANCHEZ LOCKHART#, MARIA J. GRAVISACO, ISABEL ROIG, TERESA FERNANDEZ Y ELIDA ALVAREZ***

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

Resumen El tumor LB se originó como una leucemia linfoide de origen espontáneo. No es inmunogénico y crece rápidamente en el huésped singeneico infiltrando hígado, bazo y ganglios linfáticos. A partir del tumor original se obtuvo la línea en cultivo LBC, que crece en suspensión, no requiere del agregado de factores de crecimiento y presenta un número modal de cromosomas igual al patrón normal de ratón. La caracterización fenotípica de las células LB y de la línea en cultivo demostró que ambos tipos celulares están constituidos por linfocitos T, $CD3^-$, $CD25^+$, gp 70^-, $J22d.2^+$, que expresan antígenos del CMH de clase I pero no de clase II, $CD8^+$ y $CD4^-$ en el tumor original pero $CD4^+$ en la línea celular. Esta última fue capaz de inducir una respuesta inmune en el huésped singeneico, mediada por anticuerpos que reaccionaron contra componentes de peso molecular 14, 16 y 27 kDa presentes en las células tumorales y en timocitos pero no en ganglios normales, y por células citotóxicas, efectivas para retardar el tiempo de muerte de los ratones desafiados con el tumor original LB. Por ELISA se pudo comprobar la presencia de receptor soluble de IL-2 en los sueros, ascitis y sobrenadantes de células LB en cultivo, responsable del efecto inhibitorio de la proliferación tumoral. Las células LB fueron estimuladas por agregado de IL-2 e inhibidas en presencia de un anticuerpo monoclonal específico para IL-2, demostrando la funcionalidad del receptor. Por RT-PCR se puso en evidencia la presencia de ARNm de IL-2 en las células tumorales, confirmando que éstas sintetizan IL-2. Se realizó una triple transfección de las células LBC con los genes que codifican para las cadenas α y β de las moléculas $I\text{-}A^d$ y el gen pSV2-Neo, que confiere resistencia al antibiótico Genetecín, y se obtuvieron 3 clones positivos para $I\text{-}A^d$. Por inoculación de estas células se generaron linfocitos T citotóxicos que fueron efectivos para impedir o retrasar significativamente el desarrollo tumoral. En función de estos resultados postulamos que la expresión de antígenos de clase II sobre la superficie celular le confiere a la célula tumoral la capacidad para actuar como célula presentadora de antígenos, generando una respuesta anti-tumoral más eficiente.

El cáncer se origina como consecuencia del crecimiento descontrolado de la progenie de una célula transformada. La inducción de una respuesta inmune selectiva y específica contra las células tumorales que no afecte a las células normales, podría proporcionar una forma de controlar este proceso. Numerosos modelos animales han sido utilizados para lograr estos objetivos, basados en el intento de lograr una mayor eficiencia en los mecanismos efectores básicos de la respuesta inmune adaptativa, es decir aumentar la producción de anticuerpos y generar la producción de linfocitos T (LT) citotóxicos específicos.

* Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)
# Becario del CONICET
** Becario de la Universidad de Buenos Aires

Dirección postal: Dra. Silvia E. Hajos, Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Junin 956, 1113 Buenos Aires, Argentina

Los tumores experimentales inducidos por virus, así como por agentes físicos o químicos, son capaces de inducir una respuesta inmune en el huésped singeneico. Por esta causa, han sido utilizados como modelo para el estudio de la inmunogenicidad y la caracterización de antígenos asociados a tumor[1-4]. Contrariamente, los tumores espontáneos son generalmente débilmente o no inmunogénicos[5-6]. La similitud entre ciertos tumores humanos y los tumores experimentales de origen espontáneo llevó a que estos últimos fueran utilizados como modelo para tratar de explicar los mecanismos involucrados en las interacciones entre el tumor y el sistema inmune del huésped[7].

El tumor denominado LB se originó como una leucemia linfoide de origen espontáneo, en un ratón macho de 6 meses de la cepa BALB/c, en el Bioterio de la Sección Medicina Experimental de la Academia Nacional de Medicina (Buenos Aires) y se mantuvo y sigue manteniéndose por pasajes subcutáneos (tumor sólido) o intraperitoneales (tumor ascítico) en animales singeneicos.

Los primeros trabajos realizados con este tumor en el laboratorio donde se originó, pusieron en evidencia su agresividad, su aumento de tamaño *in situ* y su capacidad para infiltrar hígado, bazo y ganglios linfáticos. Extractos celulares obtenidos a partir de las células LB fueron incapaces de inducir un proceso maligno en ratones BALB/c de 1 mes, sugiriendo la ausencia de un virus relacionado con esta leucemia. Además, se puso en evidencia su incapacidad para producir inmunidad de transplante[8] así como su efectividad para desarrollar resistencia concomitante de origen no inmunológico[9].

En nuestro laboratorio, comenzamos estudiando la presencia de anticuerpos y otros mediadores solubles en el suero de los ratones portadores del tumor, así como la capacidad de extractos y fracciones aislados de la membrana celular para inducir una respuesta inmune. Pudimos demostrar la ausencia de anticuerpos específicos en el suero y en el fluido ascítico de los ratones portadores de tumor. Por inoculación de ratones BALB/c con células LB irradiadas o tratadas con Mitomicina C no se pudo inducir una respuesta inmune celular aunque sí se desarrolló una respuesta humoral con bajo título de anticuerpos, que fue ineficiente para proteger contra el desafío realizado con células tumorales viables[10]. Sin embargo, la respuesta inmune contra otros antígenos T dependientes (GRC) fue normal[11-12]. Tanto en el suero como en el líquido ascítico de los ratones portadores del tumor, evidenciamos la presencia de un factor que inhibió tanto la proliferación *in vitro* de las células tumorales como la respuesta linfoproliferativa, inducida por Con A, de esple-nocitos normales murinos[13]. A su vez Ruggiero y col. demostraron la presencia de un factor inhibitorio de bajo peso molecular en el suero de ratones portadores del tumor, que inhibió la proliferación *in vitro* de células endoteliales y fibroblastos, y también la adhe-sividad y fagocitosis de macrófagos. Esta actividad fue proporcional al volumen tumoral y a la intensidad de la resistencia concomitante generada por este tumor[14,15]. Recientemente, Franco y col. describieron que esta actividad era ejercida por dos fracciones séricas relacionadas con la inmunidad concomitante, presentes tanto en tumores inmunogénicos como no-inmunogénicos[16].

Cuando realizamos la caracterización fenotípica de las células del tumor LB por citometría de flujo (FACS), pudimos demostrar que la leucemia LB está constituida por linfocitos T que no expresan el marcador gp70 ni el CD4 pero sí el CD8, presentando como características de interés la expresión de la cadena α del receptor de interleuquina 2 (IL-2R), marcador CD25, en forma constitutiva, la presencia de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I pero no de clase II, y la ausencia del marcador CD3[17]. Algunas de estas características indicarían que la transformación maligna habría tenido lugar en una etapa temprana del proceso de maduración de estos LT, previo a la expresión del receptor de reconocimiento antigénico. Además, la incapacidad para generar sincicios en presencia de una monocapa de células XC demostró que las células LB no liberaban partículas virales al medio de cultivo, hecho que sugería la ausencia de virus en la inducción de esta leucemia.

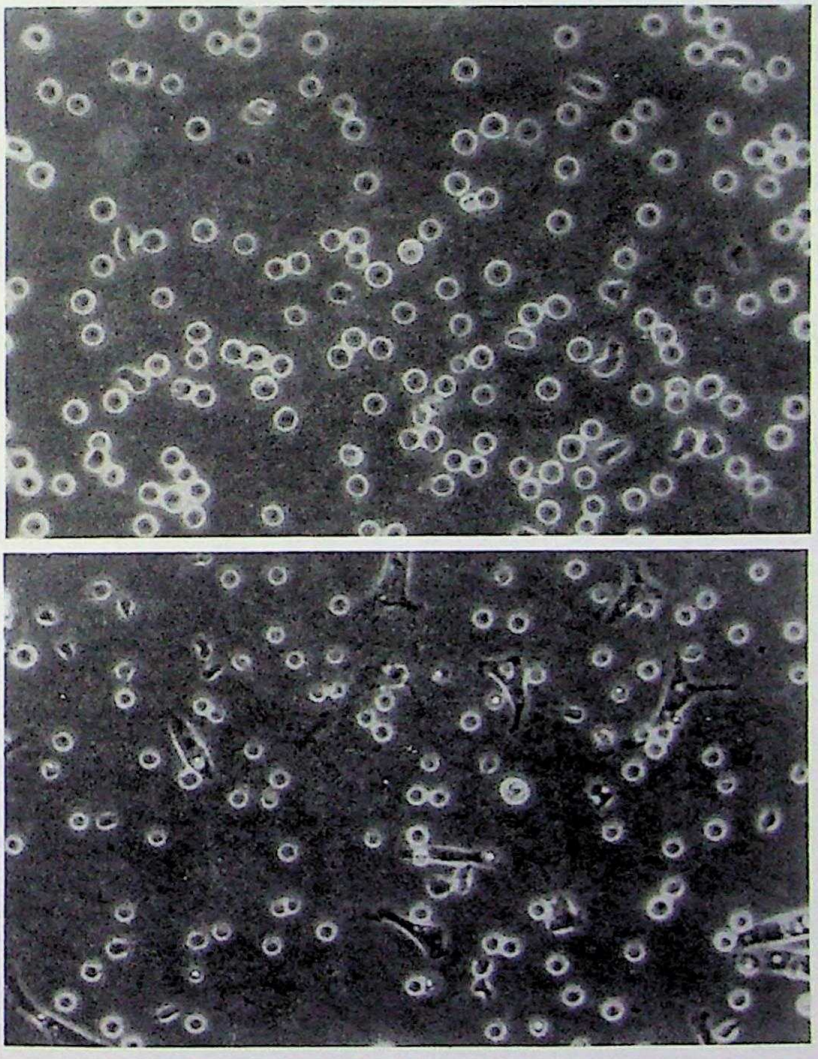
Posteriormente, se puso en evidencia que las células tumorales LB expresan moléculas de adhesión, entre ellas la integrina LFA-1 (CD18/CD11a) y el marcador CD44. Estas moléculas

cumplirían una función importante en la movilización celular y en el anclaje selectivo en diversos órganos y tejidos. Zahalka y col. demostraron que el CD18 está relacionado con la invasión del tumor en el bazo, mientras que el CD44 guía la diseminación hacia los ganglios linfáticos facilitando el proceso de metástasis[18-20].

Por otra parte, Pillemer y col. demostraron que las células del tumor LB eran estimuladas por insulina pero no por factores de crecimiento insulina-símil, tales como IGF-I y IGF-II, sugiriendo que estas células utilizaban la insulina como factor de crecimiento. Este efecto era inhibido por trifostina, un agente bloqueante de tirosina kinasa análogo de la tirosina[21]. Asimismo, se puso en evidencia la insulino dependencia de este tumor, ya que ratones diabéticos deficientes de insulina o animales mantenidos con una dieta de muy baja energía fueron resistentes al desafío tumoral[22].

A partir de células ascíticas del tumor original procedimos, en nuestro laboratorio, a la obtención de una línea celular que se denominó LBC, la que se consideró establecida a partir del cuarto mes de cultivo (Fig. 1). Esta línea crece en suspensión, no requiere del agregado de factores de crecimiento y presenta un número modal de cromosomas igual al patrón normal de ratón[23].

Cuando realizamos la caracterización fenotípica de la línea celular LBC, pudimos comprobar que estas células presentaban marcadores comu-



a.

b.

Fig. 1.– Fotomicrografía de contraste de fase de las células LBC (pasaje 120) (a) y LB de 24 h de cultivo (b) En las últimas pueden observarse algunas células peritoneales (macrófagos) acompañantes (X200).

nes y particulares con respecto al tumor original, tal como se muestra en la Tabla 1. Como puede observarse, durante el establecimiento de la línea celular se habría seleccionado una subpoblación menos diferenciada que expresa ambos marcadores, CD8 y CD4 (el CD4 está ausente en el tumor original), y posee mayor densidad de moléculas Jd11.2, marcador de células inmaduras.

En ensayos de proliferación *in vitro* las células LBC, en forma similar a las del tumor LB, fueron estimuladas por los mitógenos Con A y PHA pero no por LPS, hecho que es lógico ya que tanto las células del tumor como las de la línea celular derivada de éste están consituidas por poblaciones de linfocitos T. Por tratamiento con diferentes citoquinas o factores de crecimiento se obtuvieron los siguientes resultados: tanto los interferones (INFs) gamma como la mezcla de $\alpha + \beta$ inhibieron la proliferación, mientras que, como se observa en la Fig. 2, la IL-2 y la insulina estimularon el crecimiento celular, siendo este efecto más marcado sobre las células del tumor original LB que sobre la línea en cultivo.

Para analizar si las células LBC, adaptadas a crecer *in vitro*, eran capaces de inducir una respuesta inmune, se inocularon ratones BALB/c con células LBC irradiadas (LBCi). Estas células, a diferencia de las del tumor original, fueron inmunogénicas. Se obtuvo una respuesta inmune humoral y una respuesta celular efectiva para retardar el tiempo de muerte de los ratones desafiados con el tumor LB (10 días contra 20 días para una dosis desencadenante de 10^6 células/ratón). La especificidad de los anticuerpos generados fue analizada por inmunoblotting, y pudimos demostrar que éstos reaccionaron contra componentes de peso molecular 14, 16 y 27 kDa presentes en las células tumorales y en timocitos normales pero no en ganglios linfáticos normales (Fig. 3). Estos componentes corresponderían a antígenos de diferenciación celular y son diferentes de los descriptos por Stock y Naor, los que purificaron una proteína inmunogénica de peso molecular 64 kDa a partir de linfoblastos normales y de células LB3 obtenidas a partir de un cultivo de células LB de 3 semanas[24].

Para poner en evidencia la presencia de LT citotóxicos, los esplenocitos obtenidos de ratones inmunizados con células LBCi fueron incubados con las células blanco marcadas con ^{51}Cr. Estos revelaron una actividad citotóxica significativa contra las células LBC, a diferencia de los resultados obtenidos inmunizando con el tumor LBi, en que no se obtuvo respuesta[25].

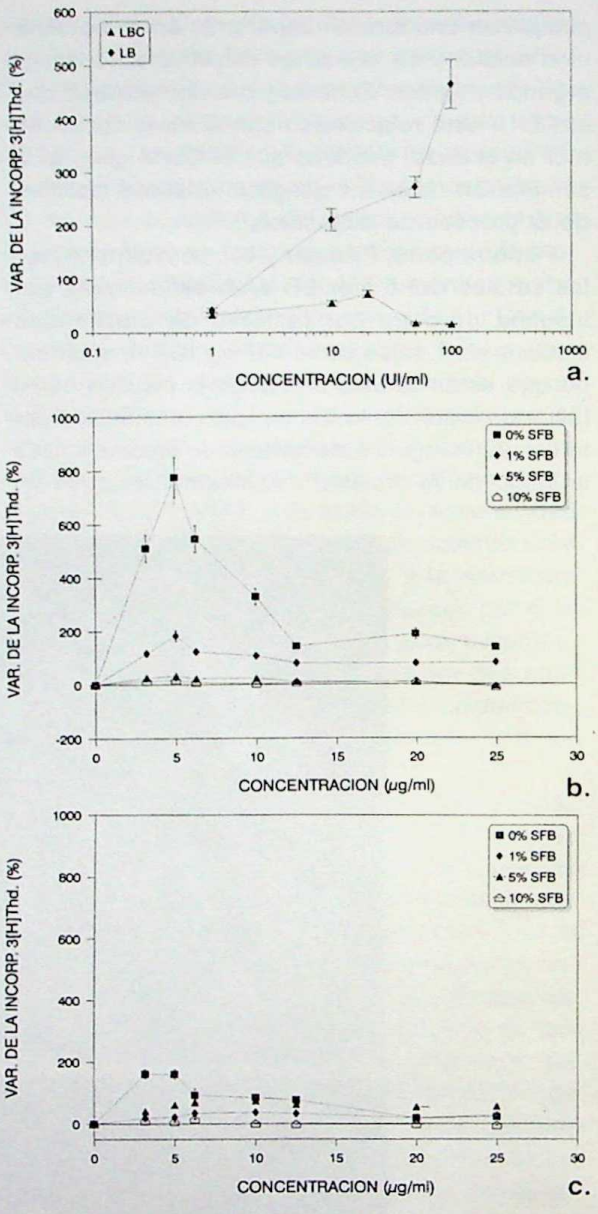


Fig. 2.– Efecto de la insulina (2a) y (2b), y de la IL-2 (2c) sobre la proliferación de las células LB y LBC. a) células LB, b) células LBC. Datos representativos de 3 experimentos diferentes. Los resultados expresan la variación promedio ± 1DS. La variación de la incorporación de ^{3}[H]Thd (VI) fue calculada por la siguiente fórmula:

$$VI = \frac{\text{cpm experimental-cpm control}}{\text{cpm del control}} \times 100$$

Con el objeto de determinar las características y la función del factor sérico modulador de la pro-

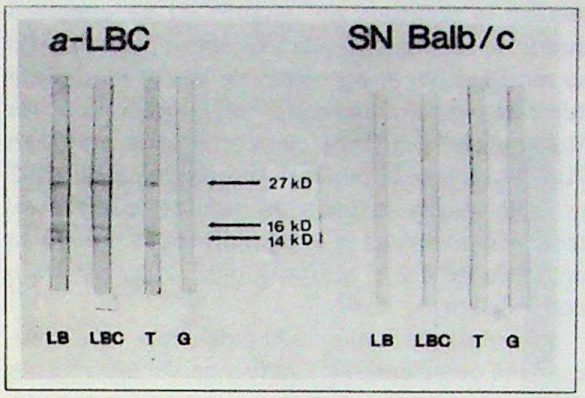


Fig. 3.– Western blotting de extractos de células LB, LBC, timocitos (T) y células de ganglio (G) de ratones normales BALB/c incubados con suero anti-LBC o suero normal (dilución 1/50) y revelados con un suero anti-IgG de ratón marcado con biotina y un conjugado de estreptoavidina peroxidasa.

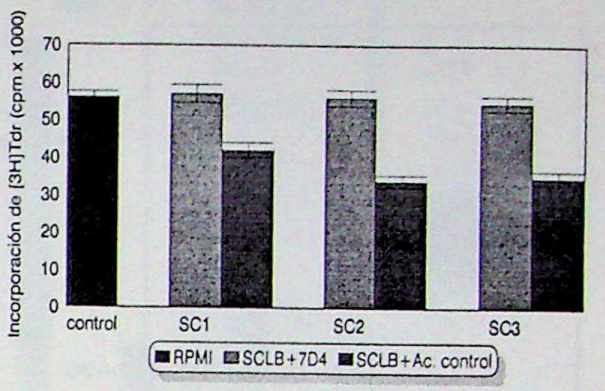


Fig. 4.– Efecto de la captura de la actividad inhibitoria de los SCLB mediada por el Mab 7D4. Diluciones de distintos SCLB fueron sometidos a un ensayo de captura utilizando el MAB 7D4 (específico para la cadena α del IL-2R) o un Mab irrelevante como control de isotipo. Luego de 4 h de incubación, se cultivaron 5 x 10^5 células LB/ml en presencia de 25% de los sobrenadantes de cultivo previamente sometidos al ensayo de captura. La incorporación de timidina tritiada se determinó luego de 48 h de incubación. Los resultados representan el promedio de cuadruplicados expresados en cpm ± 1DS.

liferación celular descripto previamente, se profundizó su estudio. Se determinó que la actividad inhibitoria se ejerció no sólo sobre la proliferación de las células tumorales sino también sobre la blastogénesis inducida por diferentes mitógenos en linfocitos singeneicos y alogeneicos normales, sobre la estimulación alogeneica en un cultivo mixto linfocitario, la proliferación de linfocitos específicos generados contra un determinado antígeno y la generación de LT citotóxicos.

Demostramos que las células tumorales fueron las responsables de producir esta inhibición ya que también se la encontró en los medios condicionados obtenidos del cultivo *in vitro* de células LB (SCLB) previamente depletadas de macrófagos. Este efecto fue citostático pero no citotóxico descartándose, además, la participación de prostaglandinas.

Por reacciones de ELISA utilizando anticuerpos monoclonales (Mabs) específicos pusimos en evidencia la presencia de receptor soluble de IL-2 (sIL-2R) cadena α en los SCLB. Mediante un ensayo de captura utilizando el Mab 7D4 pudimos demostrar que el responsable del efecto inhibitorio presente en los sobrenadantes de cultivo de las células LB era la cadena α del sIL-2R[26]. (Fig. 4). Mediante técnicas de inmunoprecipitación y PAGE determinamos que el PM del receptor soluble liberado por las células tumorales era de 50 kDa (Fig. 5). Estos resultados se suman a la demostración previa de la expresión en forma constitutiva de la cadena α del IL-2R sobre la membrana celular y a la presencia de ^{125}I-sIL-2R en los sobrenadantes de cultivo de las células LB previamente marcadas con ^{125}I, indicando que éste es liberado por proteólisis de los receptores expresados sobre la superficie celular. Nuestros resultados son concordantes con los descriptos por otros autores que demostraron que el IL-2R puede ser liberado en forma soluble no sólo por linfocitos T y B activados sino también por ciertas líneas tumorales[27-28], y este receptor soluble es capaz de ejercer su efecto inhibitorio sobre la proliferación celular dependiente de IL-2[29].

Por agregado de IL-2 recombinante murina se revirtió el efecto inhibitorio que ejercieron los sobrenadantes de cultivo de las células LB sobre la proliferación de linfoblastos preformados, sugiriendo que el sIL-2R actuaría capturando la IL-2 libre y de esta manera, impidiendo la unión de esta citoquina al receptor de membrana. Otros autores demostraron que el sIL-2R retiene la capacidad de unirse a la IL-2 y postularon que podría tener un rol inmunomodulatorio, ya sea inhibiendo reacciones de generación de LT citotóxicos dependientes de Il-2 o de activación de LT colaboradores[30-32].

Para comprobar si los receptores de IL-2 expresados constitutivamente sobre la membrana

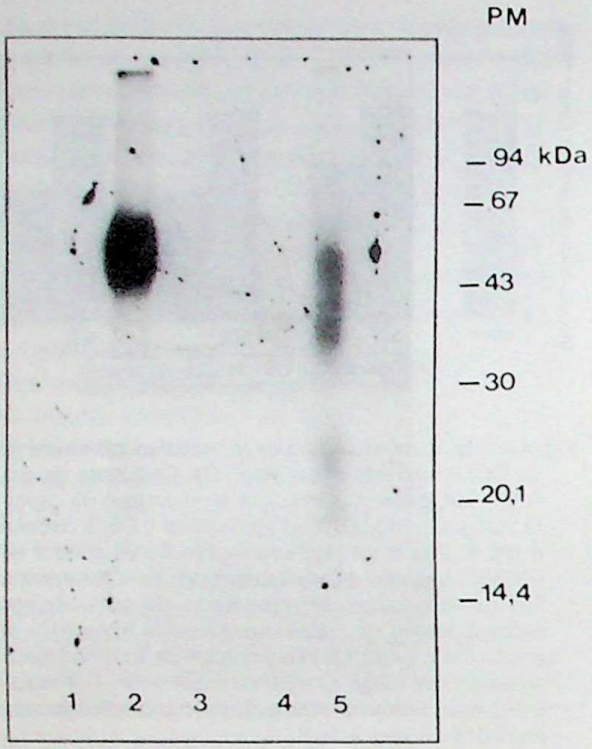


Fig. 5.– Inmunoprecipitación y SDS-PAGE de las células LB. Los inmunoprecipitados obtenidos a partir de células LB marcadas con ^{125}I en presencia del Mab PC61 y Proteína G Sepharosa fueron analizados por SDS-PAGE y posterior autoradiografía. Calle 1: lisado de células LB + Mab control de isotipo (IgG1 de rata), calle 2: lisado de células LB + Mab PC61, calle 3: SCLB + IgG control, calle 4: SCLB obtenido a partir de $5x10^5$ células LB + Mab PC61, calle 5: SCLB obtenido a partir de $5x10^6$ células LB + Mab PC61. Los pesos moleculares fueron calculados en función de proteínas controles: fosforilasa B (94 kDa), BSA (67kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20.1 kDa) y lacto-albúmina (14.4 kDa).

celular eran funcionales, se cultivaron las células en presencia de IL-2 recombinante murina. Tal como se observa en la Fig. 2c, las células LB respondieron al estímulo mitogénico inducido por la IL-2 exógena en forma dosis dependiente, incrementando su proliferación basal. Además, demostramos que los Mabs PC61 y 7D4 específicos para la cadena α del IL-2R fueron capaces de inhibir la proliferación tumoral en ausencia de IL-2 agregada exógenamente. La inhibición producida por el anticuerpo 7D4 fue dependiente de su concentración y este efecto fue revertido por el agregado de IL-2. Por el contrario, cuando se analizó la actividad del Mab PC61 se encontró que la inhibición ejercida por este anticuerpo no se modificó por el agregado de IL-2 (Fig. 6).Este comortamiento concuerda con lo descripto por Malek y col[33], quienes demostraron que el Mab 7D4 disminuye la proliferación mediada por IL-2 pero no inhibe la unión de esta citoquina a su receptor, mientras que el Mab PC61 inhibe la unión de la IL-2 a su receptor y la proliferación dependiente de IL-2[34].

Mas aún, se demostró la existencia de un mecanismo de estimulación autócrina del crecimiento de las células LB inducido por la IL-2, ya que, tal como se observa en las Figs. 7 y 6, los anticuerpos específicos para IL-2 y para el receptor de IL-2 inhibieron el crecimiento *in vitro* de estas células.

Para confirmar que la IL-2 era producida en forma endógena por las células tumorales, determinamos la presencia de transcriptos del ARN mensajero para IL-2 en estas células. Los resultados obtenidos por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se indican en la Fig. 8. Se puede observar un fragmento de 453 pb de ADNc que corresponde al ARNm del gen de IL-2 murino. Estos resultados ponen de manifiesto que las células LB expresan ARNm de IL-2, confirmando que sintetizan IL-2.

Cuando se utilizó la ciclosporina A como droga inmunosupresora se demostró que ésta inhibió la incorporación de timidina tritiada sin causar un efecto citotóxico sobre las células, ya que la inhibición fue revertida por agregado de IL-2. Este dato constituye otra evidencia experimental que confirma que las células leucémicas LB dependen de la IL-2 autócrina para su crecimiento[35].

En consecuencia, se propone que el mecanismo de acción del sIL-2R liberado por las células tumorales sería a través de la captura de la IL-2, impidiendo que esta molécula interactúe con los receptores específicos de membrana. De esta forma neutralizaría el efecto de la IL-2, indispensable para la activación linfocitaria.

Dentro de los efectos inducidos por los INFs, principalmente el INFγ, está el de aumentar la expresión o estimular la neo-expresión de antígenos del CMH de clase I y II. Con el objeto de determinar si mediante la expresión de estos antígenos se podría modular la respuesta inmune transformando a las células tumorales en inmunogénicas, éstas fueron tratadas con dife-

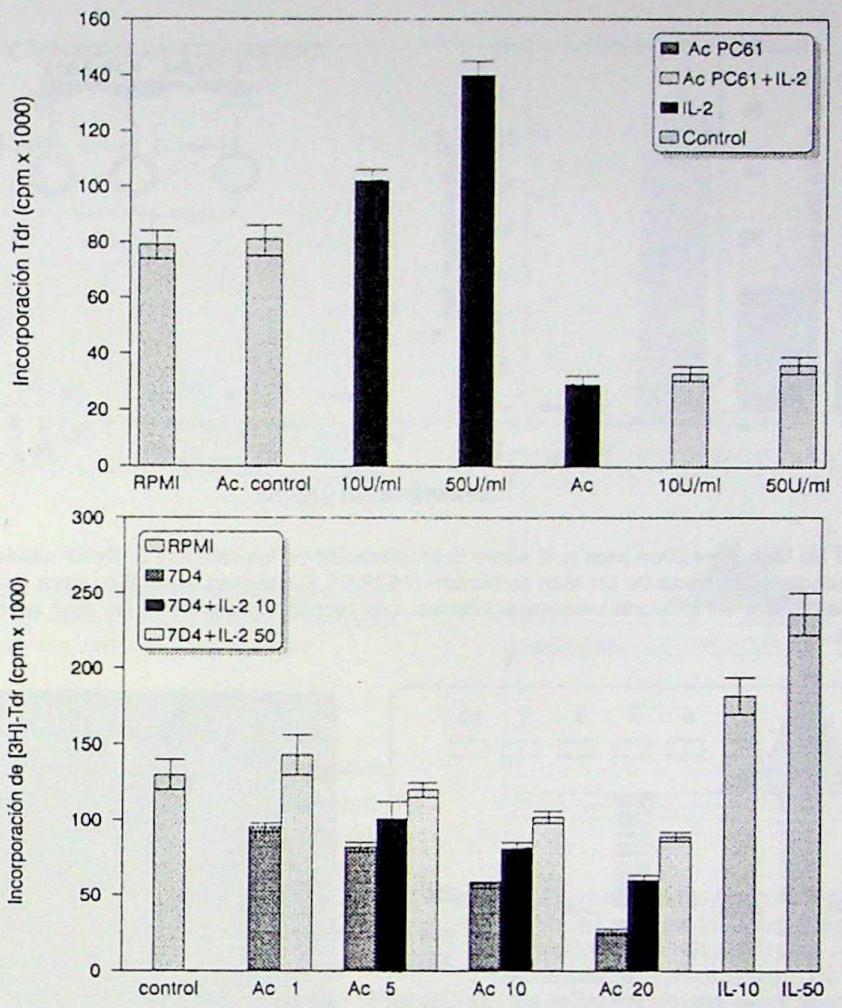


Fig. 6.– Efecto de los Mabs PC61 y 7D4 específicos para el receptor de IL-2 murino sobre la proliferación de las células LB. a) $5x10^5$ células/ml furon cultivadas en presencia o ausencia del Mab PC61, un Mab control de isotipo (IgG1), IL-2 recombinante murina (10 y 50 U/ml), y el Mab PC61 + Il-2 recombinante. Los resultdos expresan las cpm promedio ± 1DS de cuadruplicados. b) $5x10^5$ células/ml fueron cultivadas en presencia o ausencia del Mab 7D4 purificado, Mab control de isotipo (IgM de rata), IL-2 recombinante (10 y 50 U/ml) y el Mab 7D4 + IL-2 recombinante. El Mab 7D4 se utilizó en las concentraciones de 1, 5, 10 y 20 µg/ml. El Mab control de isotipo (10-20 µg/ml) no modificó la proliferación de las células LB. Los resultados expresan las cpm promedio ± 1 DS de cuadruplicados.

rentes unidades de INFγ. No fue posible inducir la neo-expresión de antígenos de clase II (I-A^d) por este tratamiento, resultado que concuerda con otras investigaciones que demostraron la incapacidad del INFγ para inducir la expresión de moléculas de clase II en LT murinos, a diferencia de lo que ocurre con los LT humanos o de rata[36]. Por consiguiente, y en función de estos resultados, procedimos a la transfección de las células LBC con los genes correspondientes a las cadenas I-Aα e I-Aβ, utilizando la técnica de los liposomas y selección por resistencia al antibiótico análogo de la neomicina G418 (genetecin), de acuerdo al diagrama esquematizado en la Fig. 9. Se llevó a cabo una triple transfección de los genes correspondientes a las dos cadenas de las moléculas I-A^d y el gen pSV2-Neo, que codifica para una aminoglucósido-transferasa capaz de inactivar al Genetecin y por consiguiente confiere a las células transfectadas la capacidad de crecer en un medio que contenga ese antibiótico.

Luego de 20 días de cultivo se obtuvieron 3 clones positivos para la expresión de I-A^d, entre los cuales se seleccionó uno, LBCT, por presen-

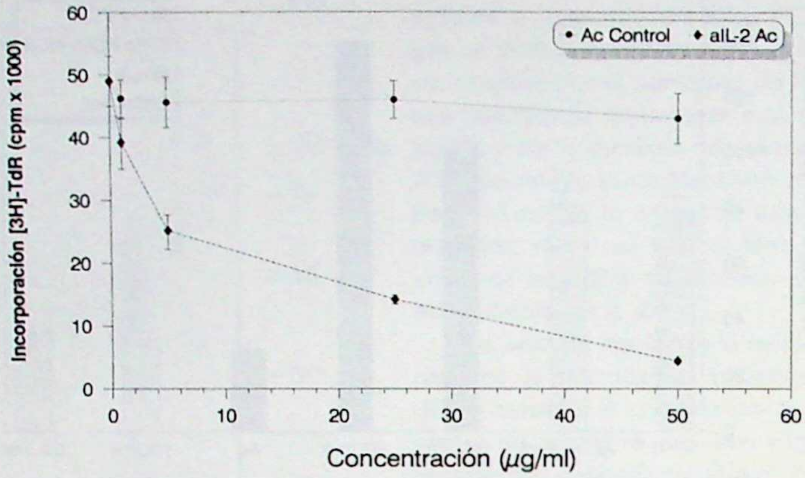


Fig. 7.– Efecto de un Mab específico para IL-2 sobre la proliferación de las células LB. $5x10^5$ células/ml fueron cultivadas en presencia o ausencia de un Mab purificado (1632-01, Genzyme) específico para IL-2 murina o de un Mab control de isotipo, en diferentes concentraciones. Los resultados expresan las cpm promedio ± 1 DS de cuadruplicados.

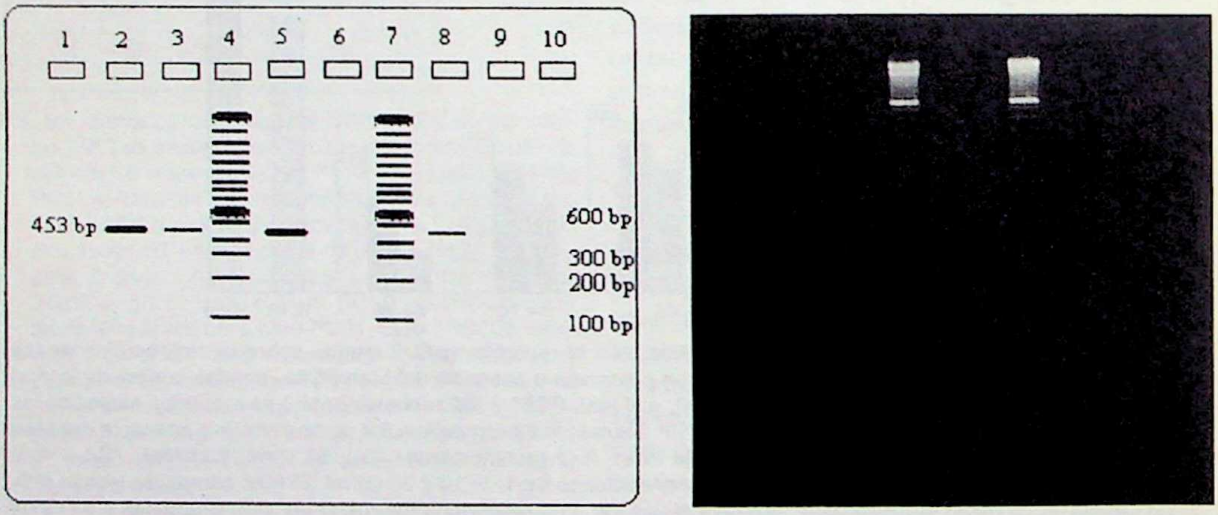


Fig. 8.– Análisis de la presencia de ARNm de IL-2 en las células LB por RT-PCR. Por amplificación a partir del ARNm de IL-2 se obtuvo un fragmento de 453 pb, calles 2 y 5: esplenocitos normales estimulados con Con A (control positivo), calles 3 y 8: células LB, calles 4 y 7: patrones de peso molecular entre 100 y 1500 pb, calle 6: control negativo.

tar la mayor expresión de este antígeno (Fig. 10). Las células de este clon fueron utilizadas para estudiar la influencia que ejerce la expresión de antígenos del CMH de clase II en la inmunogenicidad y en la tumorigenicidad.

Como consecuencia de la transfección no se modificó la morfología ni la cinética de crecimiento celular. Es interesante destacar que el tumor no se desarrolló con un inóculo de 1.0×10^3 células LBCT y que el tiempo de sobrevida de los ratones inmunizados con 1.0×10^6 células fue 3 veces mayor al obtenido con las células sin transfectar, y se cuadruplicó con respecto a los inoculados con las células de tumor original LB (figura 11 y Tabla 2). Como puede observarse en la Fig. 12, este efecto es debido a la generación de LT citotóxicos específicos contra las células tumorales[12].

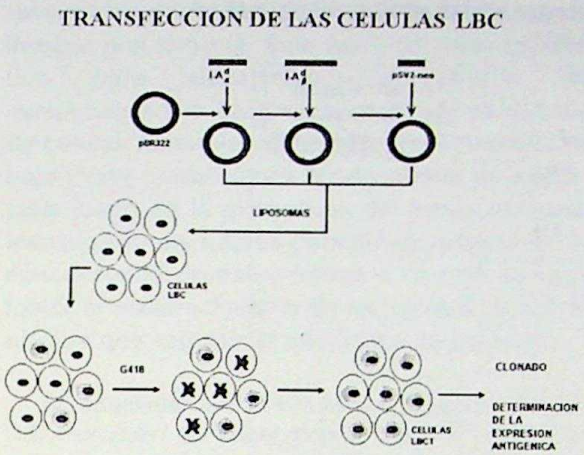


Fig. 9.– Esquema del procedimiento utilizado para realizar la transfección de las células LBC con los genes que codifican para ls cadenas I-Aα^d e I-Aβ^d.

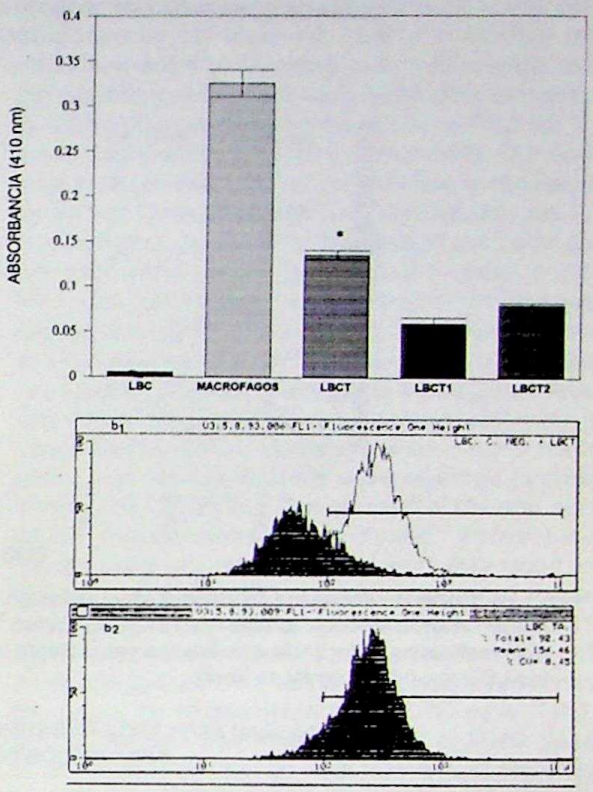


Fig. 10.– Expresión del antígeno del CMH de clase II I-A^d sobre las células LBC después de realizada la transfección. a) Cell-ELISA de las células LBC antes y después de ser transfectadas. Los resultados expresan los valores promedio de las absorbancias ± 1 DS. Para el análisis estadístico se utilizó el test de Student de doble cola para muestras independientes y se consideró una diferencia significativa con $p < 0,05$. *LBCT corresponde al clon que presentó mayor absorbancia (mayor expresión de I-A) y que se seleccionó para ser utilizado en ensayos posteriores. b) Histograma obtenido por citometría de flujo (FACS) del clon LBCT. b1) Análisis del clon LBCT en comparación con las células sin transfectar. b2) Histograma del clon LBCT.

En función de los resultados obtenidos, postulamos que la expresión de moléculas de clase II sobre la superficie celular le confiere a la célula tumoral la capacidad para actuar como célula presentadora de antígeno. De esta manera la estimulación de los LT colaboradores se efectuaría por contacto directo célula tumoral-célula T, generando una respuesta anti-tumoral más eficiente. Por otra parte, otros investigadores trabajando con tumores no espontáneos pero inmunogénicos, demostraron que la inducción de genes que codifican para antígenos del CMH de clase II indujeron una respuesta inmune efectiva para rechazar el tumor, incluso con un inóculo grande de células[37-38]. Las células LBCT, derivadas de un tumor no inmunogénico con características muy agresivas, inducirían una respuesta no suficientemente efectiva para rechazar la neoplasia con altos inóculos. Esto podría deberse al bajo número de epitopes diferentes que estimulan una respuesta inmune anti-tumoral que está restringida a unas pocas moléculas. En consecuencia, la variación de la respuesta celular obtenida no sería cualitativa sino cuantitativa, producida por una expansión clonal de los LT citotóxicos específicos y como resultado de las linfoquinas sintetizadas por los LT colaboradores, estimulados directamente por las células tumorales.

En función de todos los resultados obtenidos en nuestras investigaciones, podemos concluir que tanto el tumor espontáneo LB como la línea LBC constituyen modelos de interés para el estudio de diferentes mecanismos relacionados con el crecimiento tumoral y la interacción tumor-huésped. Postulamos que la IL-2 y el receptor soluble de IL-2 serían reguladores autócrinos y antagónicos importantes en el crecimiento del tumor LB. Por otra parte, el establecimiento de la línea celular LBC ofrece la posibilidad de trabajar con las células neoplásicas en un medio

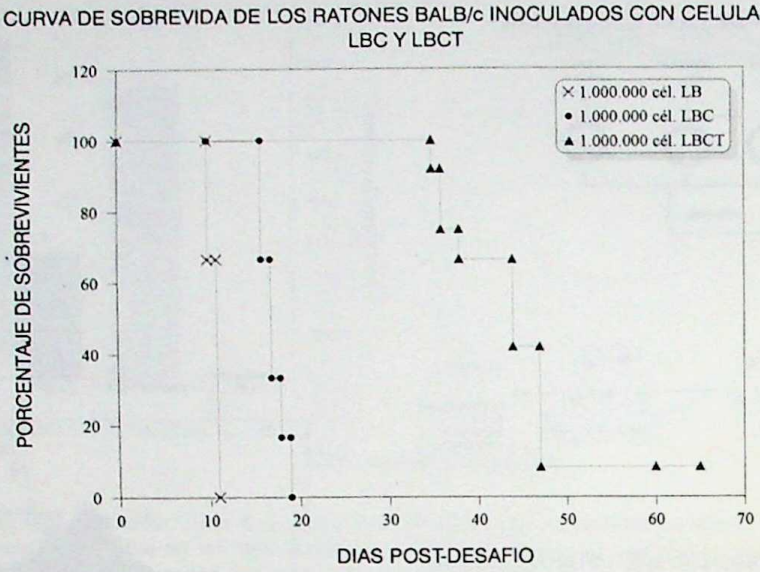


Fig. 11.– Curva de sobrevida de ratones inoculados en forma i.p. con células LBCT, LBC y LB. Lotes de 12 ratones BALB/c fueron inoculados con $1,0x10^6$ células/ratón. Los resultados son representativos de una de dos experiencias realizadas. Diferencia significativa respecto de las curvas de muerte de los ratones inoculados con las células LBC ($p< 0,01$, Log Rank Test).

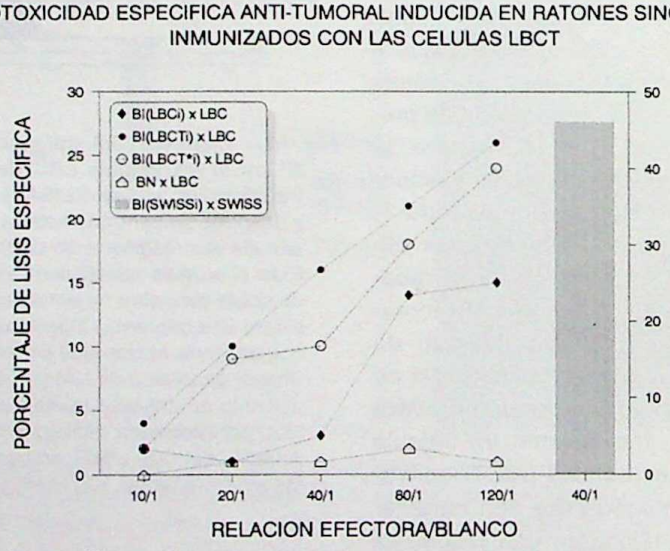


Fig. 12.– Citotoxicidad específica anti-tumoral inducida por inmunización con las células transfectadas LBCT. Esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con células LBCT irradiadas (LBCTi) fueron cultivados *in vitro* durante 5 días, al cabo de los cuales fueron enfrentados con células LBC durante 4 h, en un ensayo de liberación de ^{51}Cr. Cada punto representa el promedio de triplicados, en todos los casos los DS fueron menores al 10%. Para el análisis estadístico se utilizó el test de Student de doble cola para muestras independientes y se consideró una diferencia significativa con $p < 0,05$. BI(LBCT*I) corresponde a esplenocitos de los ratones sobrevivientes de la curva de muerte realizada inoculando células LBCT (Figura 10). La barra corresponde al control positivo realizado enfrentando linfoblastos de ratones Swiss marcados con ^{51}Cr y esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con las células LBCi y co-cultivados con células esplénicas de ratones Swiss irradiadas, durante 5 días.

definido, experimentalmente manejable, para estudiar las diferentes señales de transducción gatilladas por la IL-2 y los mecanismos de activación relacionados con el crecimiento tumoral. La inducción de antígenos del CMH de clase II por transfección permitió transformar a la célula

tumoral en una CPA, posibilitando la respuesta inmune anti-tumoral. Este sería un método efectivo para desarrollar un estado de inmunovigilancia en los casos donde el número de células tumorales que debe ser controlado es bajo y hay posibilidades de desarrollo de metástasis luego de la extirpación del tumor primario. Investigaciones futuras permitirían avanzar en el conocimiento de estos temas a efectos de contribuir al esclarecimiento de los complejos mecanismos que regulan el desarrollo de un tumor.

Agradecimientos: Los autores agradecen a la Dra. C.D. Pasqualini por haber proporcionado el tumor original y por el apoyo brindado a lo largo de todos estos años.

Este trabajo constituye gran parte de las Tesis Doctorales de las Dras. Claudia Mongini y Claudia Waldner y fue financiado parcialmente por subsidios del CONICET y de la Universidad de Buenos Aires.

Summary

Immunobiological characterization of the murine LB leukemia and the LBC cellular line

LB leukemia is a nonimmunogenic T cell tumor which spontaneously arose in a BALB/c mouse; efforts to induce immunological rejection of the leukemic cells have always failed. The leukemic cells grow rapidly and progressively in the syngeneic host invading spleen, lymph nodes and liver. A cell line (LBC) was developed from the original tumor. Both the original tumor and the cell line have been characterized as expressing the Thy 1+, CD3-, CD25+, MHC class I+, class II-, CD4- (original tumor), CD4+ (cell line), CD8+, gp70-, J11d.2+ phenotypes. Immunization of syngeneic mice with irradiated LBC cells induced cytotoxic T lymphocytes as well as anti-LBC antibodies which reacted with components of 14, 16 and 27 kDa present on LB tumor cells, LBC cell line and normal thymocytes but not on normal lymph node cells. Immunization of syngeneic mice with LBC cells partially protected them against subsequent challenge with the original tumor cells. The effect of sera from tumor-bearing mice and the super-natants from short term cultures were studied on cell proliferation. An inhibitory activity was demonstrated in these fluids, which was abrogated by addition of exogenous IL-2. ELISA showed the presence of soluble IL-2Rα chain both in the conditioned medium as well as in the serum, which was demonstrated to be responsible for the inhibitory activity. The soluble IL-2R was produced by LB leukemic cells and exerted the inhibitory activity blocking cell proliferation and modulating immune response by binding to free IL-2. Using reverse-transcription PCR, mRNA for IL-2 was found to be present in tumor cells. Our findings indicate that LB cell proliferation is mediated by an autocrine pathway involving endogenous IL-2 generation, despite the fact that these cells are not dependent on exogenous IL-2 to grow in culture. The relationship between tumorigenicity and expression of MHC class II was also investigated. *In vitro* treatment with IFNγ failed to induce the expression of class II antigens in LBC cell line. Therefore these cells were tri-transfected by a liposome-mediated protocol with I-Aα^d, I-Aβ^d genes and pSV2neo. Cells were selected to grow in medium containing Genetecin (G418) and surviving transfectants were cloned. Three I-A+ clones were obtained (LBCT) and were used to induce a specific CTL response against tumor cells. Syngeneic mice inoculated with 10^3 LBCT cells failed to develop a tumor while the DT_{50} of mice injected with 10^6 LBCT cells was three times the value for mice injected with LBC cells (I-A-). It is suggested that neoexpression of MHC class II molecules enhances anti-tumor response by transforming tumor cells into professional antigen-presenting cells, which may be used to improve tumor-specific immunity in the autologous host.

Bibliografía

1. Baldwin RW. Immunity to metylcholanthrene-induced tumors in mice and in inbred rats following implantation and regression of implanted tumors. *Br J Cancer* 1955; 9: 652-7.
2. Hajos SE, Alvarez E, Pierangeli S, et al. Antibodies against a tumour-associated antigen in an AKR lymphoma conditioned to grow in BALB/c mice. *Vet Immunol Immunopathol* 1984; 7: 53-63.
3. Klein G, Klein E. Rejectability of virus-induced tumors and non-rejectability of spontaneous tumors. A lesson in contrasts. *Transpl Proc* 1977; 9: 1095-104.
4. Ransom JH, Schengrund CL, Bartlett G. Solubilization and partial characterization of the tumor-rejection antigen from an ultraviolet light-induced murine tumor. *Int J Cancer* 1981; 27: 545-54.
5. Hewitt HB. The choice of animal tumors for experimental studies of cancer therapy. *Adv Cancer Res* 1978; 27: 149-200.
6. Schreiber H, Ward PL, Rowley DA, Stauss HJ. Unique tumor-specific antigens. *Ann Rev Immunol* 1988; 6: 465-83.
7. Hewitt HB. Point and counterpoint. Animal tumor models and their relevance to human tumor immunology. *J Biol Resp Modif* 1982; 1: 107-19.
8. Ruggiero RA, Bustuoabad OD, Bonfil RD, et al.

Concomitant immunity in murine tumors of non-detectable immunogenicity. *Br J Cancer* 1984; 51: 37-48.
9. Meiss RP, Bonfil RD, Ruggiero RA, Pasqualini CD. Histologic aspects of concomitant resistance induced by nonimmunogenic murine tumors. *JNCI* 1986; 76: 1163-75.
10. Mongini C, Alvarez E, Waldner C, et al. Lack of specific immune response against a spontaneous mouse lymphoma. *Com Biol (Bs As)* 1989; 7:247-60.
11. Alvarez E, Mongini C, Waldner C. et al. The interrelationships between spontaneous murine T cell leukaemia LB and the immune system. *Br J Cancer* 1955, 9:652-7.
12. Mongini C, Sanchez-Lockhart M, Waldner C, et al. Enhancement of anti-tumour immunity in syngeneic mice after MHC class II gene transfection. *Br J Cancer* 1996; 74: 258-63.
13. Alvarez E, Waldner C, Mongini C, et al. Marcadores de superficie y factores humorales en una leucemia murina espontánea. *Medicina (Buenos Aires)* 1989; 49: 253-7.
14. di Gianni PD, Ruggiero RA, Bustuoabad OD. Caracterización parcial de un factor sérico presumiblemente asociado a la resistencia concomitante. *Medicina (Buenos Aires)* 1991; 51: 413.
15. Ruggiero Ra, Bustuoabad OD, Bonfil RD, et al. Correlation between seric antitumor activity and concomitant resistance in mice bearing non immunogenic murine tumors. *Cancer Res* 1990; 50: 7159-65.
16. Franco M, Bustuoabad OD, di Gianni PD, et al. A serum-mediated mechanism for concomitant resistance shared by immunogenic and non-immunogenic murine tumors. *Br J Cancer* 1996; 74: 178-86.
17. Lugasi H, Hajos SE, Murphy JR et al. Murine spontaneous T-cell leukemia constitutively expressing IL-2 receptor. A model for human T-cell malignancies expressing IL-2R. *Int J Cancer* 1990; 45: 163-7.
18. Zahalka MA, Naor D. Beta 2-integrin dependent aggregate formation between LB T cell lymphoma and spleen cells: asssessment of correlation with spleen invasiveness. *Int Immunol* 1994; 6: 917-24.
19. Zahalka MA, Okon E, Naor D. Blocking lynphoma invasiveness with a monoclonal antibody directed against the β-chain of the leukocyte adhesion molecule (CD18). *J Immunol* 1993; 150: 4466-77.
20., Zahalka MA, Okon E, Gosslar U, et al. Lymph node (but no spleen) invasion by murine lymphoma is both CD44- and hyaluronate-dependent. *J Immunol* 1995; 154: 5345-55.
21. Pillemer G, Lugasi-Evgi H, Scharovsky G, Naor D. Insulin dependence of murine lymphoid T-cell leukemia. *Int J Cancer* 1992; 50:80-5.
22. Sharon R, Pillemer G, Ish-Shalom D, et al. Insulin dependence of murine T-cell lymphoma. II. Insulin-deficient diabetic mice and mice fed low-energy diet develop resistance to lymphoma growth. *Int J Cancer* 1993; 53: 843-9.
23. Mongini C, Waldner C, Roig I, Hajos SE. Murine T cell leukaemia line in suspension culture. *In Vitro Cell Dev Biol* 1991; 27: 523-4.
24. Stock R, Naor D. Induction of an autoimmune response against syngeneic lymphoma cells by immunogenic 64-kDa protein isolated from normal blast cells of BALB/c mice. *Cancer Immunol Immunother* 1995; 40: 48.-56.
25. Mongini C, Waldner C, Alvarez E, et al. Induction of anti-tumor immunity in syngeneic mice by a leukaemic cell line. *Scand J Immunol* 1995; 41: 298-304.
26. Waldner C, Mongini C, Alvarez E, et al. Inhibitory activity of soluble IL-2R in sera, ascites and culture supernatants from murine leukaemic cells. *Scand J Immunol* 1994; 40: 308-16.
27. Nelson DL, Rubin LA, Kurman CC, et al. An analysis of the cellular requirements for the production of soluble interleukin 2 receptors *in vitro*. *J Clin Immunol* 1986; 6: 114-20.
28. Osawa H, Josimovic-Alasevic O, Diamantstein T, Interleukin 2 receptors are released by cells *in vitro* and *in vivo*. I. Detection of soluble IL-2 receptors in cell culture supernatants and in the serum of mice by an immunoradiometric assay. *Eur J Immunol* 1986; 16: 467-9.
29. Rubin L, Nelson D. The soluble interleukin 2 receptor: biology, function and clinical application. *Ann Int Med* 1990; 113: 619-27.
30. Caruso C, Candore G, Cigna D, et al. Biological significance of soluble IL-2 receptor. *Mediators of Inflammation*, 1993; 2: 3-21.
31. Chopra R, Powers D, Kending N, et al. Soluble interleukin 2 receptor released from mitogen stimulated human peripheral blood lymphocytes bind interleukin 2 and inhibit IL-2 dependent cell proliferation. *Immunol Invest* 1989; 18: 961-73.
32. Rubin L, Nelson D. The released interleukin 2 receptor binds interleukin 2 efficiently. *J Immunol* 1986; 137: 381-4.
33. Malek T, Ortega G, Jakway J et al. The murine IL-2 receptor: II. Monoclonal anti IL-2 receptor antibodies as specific inhibitors of T cell function *in vitro*. *J Immunol* 1984; 133: 1976-82.
34. Moreau JL, Nabholz M, Diamantstein T, et al. Monoclonal antibodies identify three epitope clusters on the mouse p55 subunit of the interleukin 2 receptor: relationship to the interleukin 2 binding site. *Eur J Immunol* 1987; 17: 929-35.
35. Waldner C, Mongini C, Alvarez E, et al. IL-2 exerts autocrine stimulation on murine T cell leukemia growth. *Enviado para su publicación.*
36. Glimcher LH, Kara CJ. Sequences and factors: a guide to MHC class II transcription. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 13-49.
37. James RFL, Edwards S, Hui KM, et al. The effect of class II gene transfection on the tumorigenicity of the H-2K negative mouse leukaemia cell line K36.16. *Immunology* 1991; 72: 213-28.
38. Ostrand-Rosemberg S, Thakur A, Clements V. Rejection of mouse sarcoma cells after transfection of MHC class II genes. *J Immunol* 1990; 144: 4068-71.