

Tesis de Posgrado

Inmunopatología por oncornavirus murinos : Relación entre inmunodeficiencia y cáncer

Ruggiero, Raúl Alejandro

1982

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. 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:

Ruggiero, Raúl Alejandro. (1982). Inmunopatología por oncornavirus murinos : Relación entre inmunodeficiencia y cáncer. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1725_Ruggiero.pdf

Cita tipo Chicago:

Ruggiero, Raúl Alejandro. "Inmunopatología por oncornavirus murinos : Relación entre inmunodeficiencia y cáncer". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1725_Ruggiero.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

INMUNOPATOLOGIA POR ONCORNAVIRUS MURINOS:
RELACION ENTRE INMUNODEFICIENCIA Y CANCER

Autor: Raúl Alejandro RUGGIERO

Director: Dra. Christiane DOSNE PASQUALINI

Lugar de trabajo:

Sección Leucemia Experimental
Instituto de Investigaciones Hematológicas
Academia Nacional de Medicina

Tesis presentada para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Buenos Aires 1982

1725

Hay personas que tienen la rara fortuna de conocer a alguien que, con el tiempo, se irá transformando en la figura inolvidable de sus vidas.

Yo tuve esa fortuna porque conocí al Dr. Manuel E. Vicat, mi tío.

A él le dedico esta Tesis.

A él, que tuvo la virtud de ser profundo sin necesidad de enturbiar las aguas de la vida y que, sin asumir nunca la condición de maestro, supo enseñarme, quizá, más que nadie en este mundo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo, realizado en la Sección Leucemia Experimental del Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex" de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, se hizo posible gracias al apoyo de personas e instituciones a quienes deseo expresar mi agradecimiento.

a la Dra. Christiane Dosne de Pasqualini, Jefe de la Sección Leucemia Experimental, por su participación activa en la elaboración del plan y en la discusión de los resultados de esta Tesis y por su constante estímulo durante los 3 años que demandó la realización de la misma,

al Dr. Sol L. Rabasa, Asesor Científico de la Sección Leucemia Experimental, por su colaboración en el análisis de los resultados obtenidos,

al Dr. Julio E. Correa, por haber guiado mis primeros pasos en mi formación como investigador,

a los Sres. Juan Portaluppi y Antonio Morales, por la invalorable asistencia técnica prestada sin la cual no hubiera sido posible efectuar los experimentos de este trabajo,

a la Srta. Mónica Adlassnig por su ayuda en la preparación final de este manuscrito,

a los restantes miembros de la Sección Leucemia Experimental, profesionales y técnicos, los que, a través de la colaboración directa y el afecto, estimularon la realización de esta Tesis,

al CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) y a FUNDALEU (Fundación para Combatir la Leucemia) a través de cuyo apoyo económico se hizo posible este estudio.

INMUNOPATOLOGIA POR ONCORNAVIRUS MURINOS:
RELACION ENTRE INMUNODEFICIENCIA Y CANCER

A. INTRODUCCION

1. Cancer

- a. Definición 1
- b. Etiología 5

2. Virus oncogénicos

- a. Principales grupos 7
- b. Características generales 8
- c. Los oncornavirus murinos 9

3. Inmunidad y Cancer

- a. Reseña histórica11
- b. La teoría de la vigilancia inmunológica13
 - (i) Definición13
 - (ii) Axiomas15
 - (iii) Corolarios17
 - (iv) Análisis de los corolarios18

B. PARTE EXPERIMENTAL

1. Introducción

- a. Objeto de esta Tesis29
- b. Plan general de la investigación31

2. Materiales y Métodos

- a. Animales de experimentación34
- b. Virus leucemógenos: el PLLV-T₂34
- c. Leucemia35
- d. Preparación del virus PLLV-T₂35
- e. Bioensayo y titulación del virus35
- f. Antígenos36
- g. Agentes inmunodepresores e inmunoestimuladores.37
- h. Titulación de anticuerpos contra glóbulos rojos de carnero (GRC)37
- i. Titulación de anticuerpos contra lipopolisacáridos (LPS)38

j.	Reacción de rechazo de injerto de piel alogeneica	38
k.	Reacción de injerto contra huésped	39
l.	Evaluación estadística	39
3. <u>Resutados</u>		
a.	Efecto de PLLV-T ₂ sobre la inmunidad ce- lular	40
	(i) Reacción de rechazo de tejido alogeneico	40
	(ii) Reacción de injerto contra huésped	43
b.	Efecto de PLLV-T ₂ sobre la inmunidad hu- moral	44
	(i) Respuesta a GRC en la cepa BALB/c	47
	(ii) Respuesta a LPS en la cepa BALB/c	50
	(iii) Respuesta a GRC en distintas cepas ...	52
	(iv) Respuesta a GRC durante el período preclínico de la leucemia PLLV-T ₂	59
c.	Efecto de un agente inmunodepresor e in- munoestimulador sobre el desarrollo de la leucemia PLLV-T ₂	61
C.	<u>DISCUSION</u>	71
D.	<u>RESUMEN</u>	80
E.	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	83

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

1. CANCER

a. Definición

En el curso de la evolución biológica sobre la Tierra, la aparición de los organismos pluricelulares exigió el advenimiento de reglas o señales que regularan el crecimiento de sus células para hacer posible el mantenimiento y el equilibrio del organismo. El desajuste o la ruptura de estas reglas de control da origen a un tipo especial de crecimiento que se denomina genéricamente neoplasia. Este término ha recibido numerosas definiciones a lo largo del siglo XX, pero el sentido con que se utilizará aquí, corresponde a la formulación de Ewing, ligeramente modificada por Pitot. De acuerdo a ella: "Una neoplasia es un crecimiento proliferativo, relativamente autónomo de tejido" (106). Esta definición contiene tres elementos esenciales:

El carácter de crecimiento proliferativo indica un aumento en el número de células debido a una tasa promedio de división más rápida o a una tasa promedio de muerte más lenta que las del tejido normal (142).

El carácter de tisular significa que el término neoplasia es definido sólo para organismos pluricelulares.

El término autonomía significa que las células se dividen sin estar sujetas a las leyes que gobiernan tal división en un organismo pluricelular normal.

El carácter de relativa autonomía de las neoplasias indica que en éstas, el crecimiento no es absolutamente autónomo, es decir, que si bien las células que proliferan no se ajustan al completo control de los mecanismos reguladores del organismo, ello no significa que desconozcan todas las señales que operan en él. Hay casos en los cuales el carácter autónomo de una neoplasia es muy tenue y solamente relativo al tejido en el cual ha surgido.

El carácter de "relativa autonomía" es el rasgo distintivo de las neoplasias por el que se diferencian de otras proliferaciones como las inflamaciones, las regeneraciones y las hiperplasias (13). Respecto de las inflamaciones, regeneraciones y otros crecimientos proliferativos compensadores, puede decirse que éstos persiguen un fin útil que contribuye a la preservación y a la defensa del organismo, por lo que no pueden considerar se ajenos a las reglas de organización del individuo. Con respecto a las hiperplasias que, como las neoplasias, evidencian un aumento anormal en el número de células de un tejido, puede decirse algo análogo ya que constituyen o una respuesta a una carencia de tejido o a una mayor demanda de él, o un efecto de la alteración de una función hormonal. En cualquier caso, las hiperplasias no poseen el carácter de autonomía porque dependen de un estímulo funcional (aunque excesivo) para su aparición y desaparecen cuando aquél desaparece.

Las neoplasias, de acuerdo a sus caracteísticas pueden ser ubicadas en dos grandes categorías:

las neoplasias benignas y las neoplasias malignas o cánceres. Una neoplasia es benigna cuando permanece localizada estrictamente en el tejido de origen, es decir, cuando no puede invadir territorios extraños a aquél en el cual surgió. En cambio, una neoplasia es maligna cuando puede diseminarse desde el tejido de origen hacia otras regiones, es decir, cuando desconoce las reglas que establecen normalmente los límites territoriales de los tejidos. Cuando la diseminación se lleva a cabo en los tejidos adyacentes, sin perder la relación de continuidad con la masa de origen, se habla de invasividad. Cuando las células neoplásicas comienzan a crecer en lugares distantes y sin relación de continuidad con la masa de origen, se habla de metástasis (13). Los nombres benigno y maligno de ambos tipos de neoplasia se relacionan con su probable pronóstico y se ha dicho que si no hubiera invasividad y más aún metástasis, todos o casi todos los tumores serían asequibles para su extracción con las técnicas de la cirugía moderna.

Además de sus características definitorias, las neoplasias benignas y malignas tienen comúnmente ciertas propiedades que son indicios de uno u otro tipo de proliferación. Se dice que, por lo general, las neoplasias benignas son encapsuladas, altamente diferenciadas, con poca o ninguna anaplasia, de crecimiento lento, etc., mientras que las malignas son no-encapsuladas, escasamente diferenciadas, con alto grado de anaplasia, de crecimiento rápido, etc. (106).

Las neoplasias malignas o cánceres pueden ser ubicadas en tres grupos diferentes (17, 18): los carci

nomas, los sarcomas y las leucemias.

Los carcinomas tienen su origen en los epitelios, es decir, en las capas de células que recubren la superficie del cuerpo y revisten las diversas glándulas. Se trata, sin duda, del tipo de cáncer más común y responsable del mayor número de muertes, calculándose que alrededor de un 85% de los procesos malignos son carcinomas (85).

Los sarcomas son cánceres menos frecuentes que tienen su origen en las estructuras de sostén derivadas del mesodermo como huesos, músculos, vasos sanguíneos, etc.

Las leucemias son neoplasias malignas que tienen su origen en las células hematopoyéticas derivadas de la médula ósea y de los ganglios linfáticos.

Hay clasificaciones más específicas y rigurosas de los tipos de cánceres en las cuales se los ubica utilizando como criterio el órgano donde surgen y el tipo de células implicadas dentro de ese órgano. De acuerdo a estas clasificaciones, hay aproximadamente unas cien variedades de la enfermedad y la complicación adicional que supone una clasificación tan extensa se haya compensada por el hecho de que algunas variedades estarían relacionadas a causas distintas, lo que implicaría medios preventivos y aún de tratamiento diferentes. Debe señalarse, por último, que si bien los términos neoplasia y tumor no son sinónimos

en sentido estricto de neoplasia maligna o cáncer, en esta Tesis, para evitar redundancias, se emplearán como términos equivalentes, a menos que se especifique lo contrario.

b. Etiología

Dada la distribución universal del cáncer en los reinos vegetal (142) y animal y dentro de éste, en una amplia variedad de vertebrados e invertebrados (4, 38, 54, 88) no es extraño que haya muchas causas conocidas para diferentes procesos malignos. Ciertamente, un gran número de agentes físicos (18) como rayos X, luz UV, etc. y químicos (16, 106), como metilcolantreno, uretano, nitrosaminas, el humo del tabaco, etc., se encuentran asociados etiológicamente, a cáncceres espontáneos o inducidos experimentalmente. En algunos casos, la asociación ha sido indiscutiblemente determinada pero en otros, principalmente en el hombre donde por razones éticas, no es posible la experimentación directa, la relación causa-efecto no se haya establecida de una manera tan concluyente, aunque para ciertos agentes hay indicios muy poderosos en ese sentido. Debe agregarse también, la capacidad oncogénica de diversos virus sobre mamíferos (incluidos primates (39)), aves y animales de especies inferiores (130). En el hombre por su parte, no se ha encontrado aún un virus que pueda asociarse con certeza a algún proceso neoplásico pero no se descarta que alguna forma de cáncer pueda tener esa etiología (37, 101, 140,

165). El mejor ejemplo de esto, lo constituye quizá el virus de Epstein-Barr, probablemente asociado causal o co-causalmente al linfoma de Burkitt (80) aunque tampoco hay argumentos decisivos en este sistema (108, 109).

Si bien hay muchos agentes capaces de producir cáncer, no se puede descartar que exista una causa inmediata común de los procesos malignos en la que confluyan todas las causas mediatas conocidas. Como la alteración que transforma una célula normal en cancerosa se transmite a sus células hijas, se ha sugerido que esta causa inmediata común debería ser una alteración en el DNA de las células afectadas (cambio genético). Sin embargo, dado que no es necesario postular un cambio genético para explicar un cambio heredable (piénsese por ejemplo, en la diferenciación celular) se han propuesto mecanismos epigenéticos alternativos (107) cuyo valor no debe ser desestimado ya que hay ciertas neoplasias malignas como las teratocarcinomas donde los argumentos a favor de un origen no-mutacional son de mucho peso (46). No obstante, sea cual sea el mecanismo por el cual se hereda la alteración que causa la malignidad parece que en último término lo que importa no es tanto ese mecanismo de herencia sino la alteración que se hereda. Actualmente, hay varios estudios promisorios destinados a la búsqueda del correlato (o correlatos) molecular del proceso neoplásico, principalmente aquellos realizados utilizando virus oncogénicos y en especial, el virus de sarcoma de Rous (2, 5, 9, 12, 50, 98). Es preciso señalar, de todos modos, que estos estudios aún cuando llevados a cabo con

una tecnología altamente refinada, se enfrentan con una dificultad de principio. En efecto, la definición de neoplasia maligna hace referencia a la inobservancia de leyes que rigen el control de la división normal y la de limitación de los territorios tisulares, pero el conocimiento de tales leyes a nivel molecular no ha sido aún alcanzado. No parece extraño por lo tanto, que haya sido tan arduo hasta el presente, el estudio bioquímico de la célula neoplásica porque, en general, la capacidad que se tiene de comprender una alteración en un proceso depen de, en gran medida, de que éste sea previamente conocido (159).

2. VIRUS ONCOGENICOS

a. Principales grupos

Dentro de los virus con capacidad oncogénica conocida, se pueden considerar dos grandes grupos: los oncoDNAvirus y los oncoRNAvirus. Entre los primeros, se encuentran (47, 152): los papovavirus, los adenovirus y los virus herpes. Los papovavirus incluyen el polioma (que produce tumores múltiples en ratones recién nacidos o inmunodeficientes y transforma in vitro células de hamster, mono y ratón), el virus del papiloma (que induce en ciertos casos, carcinomas en conejos) y el SV₄₀ (que produce tumores en hamster recién nacidos y transforma in vitro células de hamster, de ratón y de riñón del mono verde de Africa). Los adenovirus producen tumores en hamster

recién nacidos y transforman in vitro células de varios roedores. Los virus herpes incluyen entre otros, el virus de Epstein-Barr (asociado al linfoma de Burkitt en el hombre), el virus de la enfermedad de Marek, el virus herpes de la rana (agente causal del adenocarcinoma de Lucké), el herpes simplex hominis I y II relacionados probablemente en el hombre con algunos carcinomas de la boca y ciertos tumores cervicales, etc.

Entre los oncoRNAvirus se encuentran (45, 151) los virus: tipo B, cuyo prototipo es el virus de tumor mamario murino; tipo C, que incluye virus de sarcoma y leucemia de aves, mamíferos y aún, especies inferiores; tipo D, cuyo ejemplo es el virus de tumor mamario de primates. La clasificación de los oncornavirus en estos tres tipos, se ha realizado de acuerdo al aspecto morfológico que las partículas virales presentan al microscopio electrónico.

b. Características generales

Los oncoDNAvirus y los oncoRNAvirus se diferencian en dos aspectos fundamentales: 1) el patrimonio genético de los primeros, está constituido por una molécula de DNA mientras que el de los segundos, está constituido por RNA; 2) los oncoDNAvirus pueden transformar una célula o multiplicar en ella (y destruirla) pero no ambas cosas a la vez mientras que, por el contrario, los oncoRNAvirus pueden transformar y multiplicar en la misma célula sin destruirla ya que emergen de la

misma por un proceso de brote o gemación. Sin embargo, a pesar de sus diferencias, hay una característica común a ambos: tanto los oncoDNAvirus como los oncoRNAvirus incorporan su patrimonio genético en el material genético de la célula huésped, permaneciendo asociados a él como provirus y comportándose a partir de allí como si fueran componentes normales del genoma celular. En los primeros, el proceso de integración es directo pero en los segundos, se requiere la formación de un DNA homólogo al RNA viral en una reacción catalizada por la enzima transcriptasa inversa. La integración explica la irreversibilidad de los cambios celulares subsecuentes a la infección con estos virus que constituyen lo que se denomina en conjunto transformación oncogénica celular y que depende de la expresión de ciertos genes virales llamados genes de transformación. Asimismo, el estado transformado es transmitido de una célula a sus células hijas ya que éstas heredan también el provirus.

c. Los oncornavirus murinos

Los oncornavirus que causan neoplasias en los ratones son partículas esféricas de aproximadamente 100nm de diámetro (151) que presentan en su interior una cadena de RNA asociada con una gran cantidad de subunidades proteicas entre las que se encuentra la enzima transcriptasa inversa. Este complejo constituye la nucleocápside la que a su vez, se encuentra incluida en una membrana exterior constituida por lípidos y pro-

teínas cuya estructura es análoga a la de la membrana celular.

El genoma de estos virus consiste en RNA de 70S el que está constituido por dos subunidades de RNA 35S (124) de composición genética idéntica unidas en sus extremos 5' por puentes de hidrógeno. El genoma es por lo tanto, diploide y cada subunidad tiene alrededor de 10.000 nucleótidos de longitud (45) y un peso molecular de 3×10^6 daltons. Sin embargo, la expresión genética viral es organizada alrededor de la unidad haploide ya que la forma diploide sólo se encuentra en los viriones maduros. Más aún, la unidad haploide es genéticamente autosuficiente y se puede iniciar una infección si una unidad haploide de RNA viral es introducida en la célula adecuada bajo la forma de DNA (70).

Entre los oncornavirus murinos, los virus tipo C conforman el grupo más extenso y más estudiado. Entre éstos, se incluyen agentes que producen leucemias linfáticas de larga latencia (ej.: virus de Gross) sarcomas que naturalmente crecen y regresan (ej.: virus de sarcoma de Moloney) y leucemias rápidamente letales (ej.: virus de Friend, Rauscher, PLLV-T2).

El estudio inmunológico en las neoplasias producidas por los virus murinos tipo C ha revelado la presencia de antígenos asociados a la membrana de las células malignas, a través de ensayos de inmunofluorescencia y test con anticuerpos citotóxicos (96, 151). Estos anti-

genos, algunos de los cuales podrían mediar el rechazo tumoral, son o componentes estructurales del virión o antígenos asociados a la infección pero que no forman parte de los virus. Actualmente, una gran parte de los estudios inmunológicos del cáncer se hacen empleando como modelo experimental estas neoplasias virales.

3. INMUNIDAD Y CANCER

a. Reseña histórica

Si bien se desconocen aún los procesos moleculares de la transformación maligna, se ha pensado que la prevención y cura del cáncer podrían lograrse a través del estudio de la "situación ambiental" (organismo) donde se lleva a cabo el crecimiento incontrolado (113). Se considera que esta "situación ambiental" condiciona de diversos modos la progresión del tumor e incluye muchas facetas diferentes del organismo como su estado hormonal, nutricional, etc. Entre éstas, hay una que, principalmente en las dos últimas décadas, ha atraído la mayor atención por parte de los estudiosos del problema del cáncer, porque se ha pensado que en su potenciación o adecuado manipuleo experimental se podría encontrar la solución al desafío que plantea esta enfermedad: se trata de la faceta inmunológica. Este enfoque tiene, a priori, muchos atractivos en relación a los tratamientos convencionales de los procesos malignos. En efecto, la cirugía y la radioterapia logran el efecto de-

seado cuando las células tumorales se hayan localizadas. Cuando por el contrario, éstas se han diseminado desde su punto de origen, los métodos anteriores van perdiendo eficacia por lo que se requiere un procedimiento que destruya las células cancerosas dondequiera que se encuentren y en tal característica, radica la ventaja de la quimioterapia. No obstante, los productos quimioterapéuticos son también en mayor o menor medida, tóxicos para las células normales y este hecho es el que limita su eficacia final. Por el contrario, dada la selectividad de las reacciones inmunes, un método inmunoterapéutico obviaría estas dificultades (95).

El papel de la respuesta inmune en el desarrollo del cáncer fue vislumbrado por Paul Ehrlich ya en el año 1909 (131). El sugirió que, en un organismo normal, durante los complejos procesos de desarrollo y diferenciación, se acumulan células anómalas (el habló en realidad, de "semillas aberrantes") con potencial neoplásico, las cuales se hayan mantenidas en estado inactivo por la inmunidad natural del individuo, de tal modo que, si este sistema de control no existiera, el desarrollo del cáncer se produciría con una frecuencia mucho mayor de lo que realmente ocurre. A pesar de algunos trabajos realizados en la década de 1920-1930 (93, 131), en los cuales se sugería que la inmunidad celular podía representar un mecanismo de defensa contra los procesos malignos, los enunciados de Paul Ehrlich permanecieron virtualmente olvidados durante 50 años. En efecto, sólo en el año 1959, las ideas de Ehrlich fueron redescubiertas y cobra

ron vigencia cuando Thomas señaló (148) que la alta eficiencia de la inmunidad mediada por células contra los tejidos transplantados era el reflejo de un mecanismo que estaba primariamente montado como un sistema de defensa contra el desarrollo de las neoplasias. A partir del enunciado de Thomas, la idea de que el sistema inmune podía representar un mecanismo de defensa contra el cáncer fue adquiriendo una importancia creciente que culminó en la teoría de la vigilancia inmunológica propuesta por Burnet (14, 15).

b. La teoría de la vigilancia inmunológica

(i) Definición

La teoría de la vigilancia inmunológica enunciada por Burnet puede resumirse de la siguiente manera: cuando en un organismo aparecen células anómalas con potencial proliferativo de naturaleza maligna, tales células poseen determinantes antigénicos diferentes de los normales y una vez que se ha desarrollado una adecuada cantidad de antígeno, es decir, una vez que se ha producido un cierto crecimiento de las células malignas, sin llegar a constituir un tumor a nivel clínico, el organismo desencadena una reacción inmunológica celular dependiente del timo, que destruye las células anormales. De esta formulación es preciso distinguir el concepto general de vigilancia inmunológica de la respuesta inmune que Burnet consideraba responsable de aquélla.

Se denomina vigilancia inmunológica al mecanismo inmune cuya función es la de reconocer y destruir "tumores in situ", clínicamente inaparentes. Si bien en la formulación de Burnet se indicaba que la vigilancia contra las neoplasias era llevada a cabo por células efectoras dependientes del timo, el concepto de vigilancia inmunológica no implica necesariamente un cierto tipo de respuesta inmune como responsable de la misma. Es decir, la idea de que las células T dependientes del timo mediaban este mecanismo reflejaba sólo la creencia del momento de que la respuesta contra tumores era análoga a la encargada de rechazar injertos de tejido alogéneo. Puede ocurrir, sin embargo, que la vigilancia inmunológica sea llevada a cabo por anticuerpos citotóxicos dependientes o independientes de la cooperación tímica, posibilidad que de hecho ha sido postulada para diversos sistemas tumorales (19, 49, 86, 103, 125, 162). Tampoco hay una restricción conceptual para que la vigilancia sea llevada a cabo por mecanismos inmunes inespecíficos y como confirmación de esto, en los últimos años, han sido propuestos como mediadores de aquélla, sistemas como macrófagos (1, 31, 143), células NK ("natural killer") (66, 67, 136, 137); células NC ("natural cytotoxic") (136, 139) e incluso algunos sistemas aún no definidos (58).

De acuerdo con estas consideraciones parece conveniente distinguir entre la teoría de la vigilancia inmunológica en su forma original (propues

ta por Burnet y mediada por células T) de la teoría general de la vigilancia inmunológica (en la cual ésta es mediada por células T o por algún mecanismo inmune alternativo). Debe indicarse además, que el mecanismo de vigilancia inmunológica no es conceptualmente equivalente a la respuesta inmune, por lo común tardía e ineficiente, que un individuo puede desencadenar contra su propio tumor, una vez que éste ha sido ya establecido. Este último fenómeno es un evento que puede denominarse "post factum" y en todo caso, el tumor establecido y la respuesta inmune subsecuente -cuando existe- representarían precisamente la falla del sistema de vigilancia contra ese tumor.

Una característica de importancia en la teoría es la suposición -siguiendo los lineamientos de Ehrlich- de que células neoplásicas se producen habitualmente en el organismo a lo largo de toda la vida, no advirtiéndose la presencia de tumores clínicos porque el sistema de vigilancia previene su emergencia. La importancia de esta suposición radica en que si esto no fuera así, sería difícil evitar la afirmación -sugerida por algunos críticos de la teoría- de que el desarrollo evolutivo de mecanismos de vigilancia inmunológica no tendría una ventaja selectiva para las especies -y por lo tanto, no podría haberse fijado como "carácter" de las mismas- desde que el cáncer ocurre en la gran mayoría de los casos en la fase post-reproductiva de la vida.

(ii) Axiomas de la teoría de la vigilancia inmunológica

La teoría de la vigilancia inmunológica

puede adoptar dos formas generales según se considere que el mecanismo de vigilancia es llevado a cabo por un sistema específico o inespecífico. La forma específica de la teoría contiene dos axiomas fundamentales: 1) todas las células tumorales tienen antígenos distintos de los normales en el organismo donde surgen; 2) tales diferencias antigénicas pueden ser reconocidas como "extrañas" y desencadenar, en consecuencia, una respuesta inmune que tiene la capacidad de eliminar las células malignas antes del establecimiento clínico del tumor (132).

La forma inespecífica no necesita postular la antigenicidad de las células neoplásicas. Sólo requiere como axioma la existencia de estructuras celulares -sean o no antigénicas- que sean reconocidas como "no propias" y eliminables por el sistema inmune en el período subclínico del tumor (83).

Sea cual sea la modalidad que adopte la teoría, ésta afirma que el organismo está dotado de un sistema altamente efectivo para eliminar las neoplasias nacientes. ¿Qué explicación ofrece, entonces, para la existencia de los procesos malignos que efectivamente se desarrollan en los animales y en el hombre?. La explicación que se da es que la emergencia de una neoplasia es la consecuencia de una falla o ruptura del sistema de la vigilancia inmunológica. Dado la enorme gravitación que ha tenido esta teoría en la inmunología del cáncer, un gran número de trabajos se han realizado con el propósito de demostrar y caracterizar aquella falla del sistema

inmune a la que debía considerarse responsable del desarrollo tumoral (79). Se esperaba que la caracterización de esa "falla inmunológica" daría lugar a un tratamiento inmunoterapéutico cuyo propósito sería, precisamente, la corrección de esa falencia. La búsqueda de factores tumorales que interfieren con la respuesta inmune, la investigación de elementos bloqueantes de células T como anticuerpos, antígeno tumoral libre o complejos antígeno-anticuerpo (64) y, en general, todas las investigaciones, aún cuando en apariencia muy distintas entre sí, llevadas a cabo para comprender como puede progresar y desarrollarse un tumor en la presencia de un sistema inmune "intacto" es decir, como puede "escapar" del control inmunológico del huésped (102), suponen tácitamente o no, los postulados de la teoría de la vigilancia inmunológica en alguna de sus formas.

(iii) Corolarios de la teoría

La teoría en cualquiera de las formas que adopte, contiene a partir de sus axiomas, varios corolarios o predicciones que pueden ser objeto de un análisis experimental crítico (44, 67, 112, 131, 133):

- 1) las neoplasias deben desarrollarse preferencialmente en aquellas edades en las que el sistema inmune es menos eficiente, es decir, en el individuo recién nacido o de muy corta edad y en el individuo de edad avanzada;
- 2) condiciones asociadas a depresión inmunológica ya sea genética, inducida por drogas o por algún otro mecanismo, deben incrementar o facilitar la aparición de tumores ex-

perimentales y espontáneos (entendiendo por espontáneos a aquellos tumores que surgen sin interferencia experimental);

3) los agentes cancerígenos u oncogénicos deben ser -conción necesaria pero no suficiente- inmunodepresores per se, como un medio de disminuir la vigilancia del huésped.

Los primeros dos corolarios no requieren un comentario adicional. El tercero, se deduce del hecho de que si un agente tiene capacidad para transformar células normales en malignas, ésto no sería suficiente, de acuerdo a la teoría, para promover el desarrollo de una neoplasia ya que el postulado sistema de vigilancia inmunológica eliminaría las células transformadas. Por ello, para que un agente promueva el desarrollo de una neoplasia, es decir, para que sea cancerígeno u oncogénico, es necesario que deprima la función encargada de la vigilancia inmunológica.

(iv) Análisis de los corolarios

Corolario 1°:

Este corolario establecía que las neoplasias debían producirse con mayor frecuencia en aquellas edades (temprana y tardía) de la vida en las cuales el sistema inmune se considera relativamente deficiente. Entre los fenómenos conocidos que parecen adecuarse a esta formulación y que se consideran por ello, evidencias de la teoría se encuentran: el patrón de incidencia del cáncer humano en relación con la edad, es

to es un pico de incidencia en la temprana infancia y un aumento regular y constante en su frecuencia desde la adolescencia hasta la vejez (77); la incrementada susceptibilidad a la oncogénesis experimental por distintos agentes cancerígenos en animales recién nacidos (131) y la frecuencia aumentada de neoplasias espontáneas en los animales viejos comparada con la de los adultos jóvenes.

En lo que respecto al fenómeno de distribución de incidencia del cáncer humano en relación con la edad, debe ser señalado que sólo cierto tipo muy restringido de neoplasias (ej.: leucemias) son responsables del pico de incidencia en la edad temprana, lo que atenúa la importancia de estos datos como evidencia general de la teoría de la vigilancia inmunológica. Esta habría predicho una frecuencia aumentada de todos los tipos de cánceres. Respecto de la mayor incidencia de tumores observada en la vejez se ha considerado alternativamente que este aumento puede no ser reflejo de un estado inmune deteriorado sino del tiempo de exposición a un agente oncogénico como puede ser un cancerígeno ambiental (105).

Es ampliamente conocida la incrementada susceptibilidad a la oncogénesis por agentes químicos o virales en animales recién nacidos. Sin embargo, en lo que se refiere a la oncogénesis por agentes químicos, la mayoría de los experimentos que sustentan aquella conclusión fueron realizados administrando iguales dosis de cancerígeno a los animales recién nacidos y a los adultos. Cuando, por el contrario, las dosis fueron ajustadas por

peso del animal, los resultados fueron muy variables. Por ejemplo, utilizando como agentes oncogénicos al dibenzantraceno (DBA) y metilcolantreno (MC), la incidencia de adenomas de pulmón fue más alta en ratones recién nacidos que en adultos, pero cuando las dosis fueron ajustadas de modo tal que todos los animales recibían la misma cantidad de droga por peso corporal, los ratones de 2 semanas de edad eran más susceptibles que los recién nacidos (78,131). Con 9-10 dimetilbenzantraceno (DMBA), ocurría algo análogo ya que cuando las dosis fueron ajustadas por peso de animal, la incidencia de tumores era igual en animales recién nacidos y adultos (158). No obstante, el uretano, aún utilizando las dosis ajustadas, produce mayor incidencia de leucemias y adenomas de pulmón en ratones recién nacidos (76, 157). De estos y otros estudios críticos se ha llegado a la conclusión de que, en lo que respecta a la oncogénesis química, los animales recién nacidos tienen una susceptibilidad comparable a la de los adultos, salvo en lo que se refiere a las neoplasias del sistema linforeticular en la cual, aquéllos son consistentemente más sensibles (153). En lo que se refiere a la oncogénesis viral, por otra parte, se ha determinado que, en general, aún con dosis ajustadas, los animales recién nacidos tienen mayor susceptibilidad que los adultos (131). Sin embargo, aunque la causa de esta mayor susceptibilidad sea realmente debida a una deficiencia inmunológica y no a otros factores (ej.: mayor disponibilidad de células blanco para la replicación viral, etc.) puede ocurrir que este hecho se relacione con un déficit de la inmunidad contra el virus y no contra las células neoplásicas por lo que de ser así

el sistema inmune no funcionaría como un verdadero mecanismo de vigilancia contra tumores nacientes.

En muchos animales, además del hombre, se ha observado un incremento en la frecuencia de cáncer con la edad. No obstante, los estudios destinados a correlacionar este aumento de tumores con deterioros del sistema inmunológico no han dado resultados claros. Por ejemplo, se observó una estrecha correlación entre edad, capacidad inmune deteriorada y desarrollo de tumores en ratones Swiss exocriados pero, cuando se llevaron a cabo experimentos análogos en cepas de ratones endocriados de alta y baja incidencia de tumores espontáneos, aquella correlación no fue observada (146, 147).

El análisis de estos experimentos indica que la asociación entre el cáncer y las edades relativamente deficitarias inmunológicamente no es un fenómeno general sino sólo aplicable a algunos sistemas y a algunas neoplasias. No obstante, dado que hay un gran número de variables no inmunológicas que pueden afectar el desarrollo tumoral que no son necesariamente comparables entre animales recién nacidos o viejos y animales adultos (75, 141) es muy difícil sacar conclusiones decisivas acerca de la validez general de la teoría de la vigilancia inmunológica sólo a través del análisis de este corolario puesto que toda relación entre estado inmune y cáncer puede ser oscurecida por la presencia de aquellas variables.

Corolario 2°:

Este corolario establecía que condiciones asociadas a depresión inmunológica, ya sea genética, inducida por drogas o por algún otro mecanismo debían incrementar o facilitar la aparición de tumores experimentales y espontáneos. Una vasta serie de ensayos destinados a evaluar esta formulación han sido realizados comparando la incidencia de neoplasias espontáneas o inducidas en animales inmunodeprimidos. Los resultados de estos experimentos no muestran, sin embargo, un patrón claro y general. Por ejemplo, en lo que respecta a animales -ratones y ratas- inmunodeprimidos por procedimientos tales como timectomía, irradiación, suero antilinfocito, productos químicos, etc., la incidencia de tumores inducidos por cancerígenos químicos y físicos fue mayor, igual o menor respecto de los controles normales, dependiendo del tipo de cancerígeno utilizado y del método empleado en la inmunodepresión (132, 135). Estos procedimientos inmunodepresores, además, no incrementan la incidencia de tumores espontáneos (122) pero, por lo general, aunque no siempre, tienen un efecto potenciador sobre las neoplasias inducidas por virus oncogénicos especialmente por ciertos virus DNA (129, 133, 135).

La utilización de modelos genéticamente inmunodeprimidos como los ratones "nude" que carecen de timo y de las funciones inmunológicas correspondientes al timo, no ha revelado diferencias significativas en la incidencia de tumores espontáneos o inducidos por cancerígenos químicos (134) entre aquéllos y los ratones normales. Los resultados obtenidos en ratones "nude" con virus oncogénicos son similares a los obtenidos utilizando los pro-

cedimientos inmunodepresores antes comentados (134).

En lo que respecta a los datos clínicos, se ha observado en el ser humano una asociación entre deficiencias inmunológicas -primarias y secundarias- y una mayor susceptibilidad al desarrollo de neoplasias. Sin embargo, esta incidencia incrementada se debe, casi exclusivamente, a una mayor frecuencia de tumores del sistema linforetico pero no de otro tipo de neoplasias más comunes, lo cual sugiere un sistema de vigilancia inmunológica muy restringido o la existencia de mecanismos alternativos (133, 135).

Dado que los procedimientos inmunodepresores utilizados en la mayoría de los trabajos comentados afectan principalmente la inmunidad tímica, los resultados obtenidos indican que un mecanismo de vigilancia inmunológica dependiente del timo, celular o humoral, sólo podría ser aplicable contra neoplasias causadas por virus. Sin embargo, aún estos sistemas virales presentan problemas de interpretación. En primer lugar, algunos trabajos (71, 138) han detectado un efecto acelerador de los agentes inmunodepresores utilizados sobre el desarrollo tumoral; no obstante, estos resultados pueden ser explicados no sólo por un deterioro temprano sino también tardío de la inmunidad antineoplásica. Si el efecto acelerador se debiera sólo a un déficit tardío no habría razón para postular un mecanismo de vigilancia inmunológica. En segundo lugar, si bien otros trabajos han detectado un incremento en el número de tumores y no sólo una aceleración de su desarro

llo, estos resultados pueden aún ser debidos a un deterioro de las defensas contra la diseminación e infectividad de los virus y no a un déficit de la inmunidad contra las células neoplásicas.

Los dos problemas anteriores han dificultado la demostración de un mecanismo de vigilancia inmunológica en muchos sistemas virales. Sin embargo, hay casos en los cuales esta demostración ha sido posible y el mejor ejemplo de ello, es el sistema de neoplasias inducidas por el virus polioma. Este virus no produce tumores en presencia de un sistema inmune intacto lo que indica que éste previene su aparición clínica. Además, en este sistema se puede hacer una clara distinción entre la inmunidad antiviral y la inmunidad contra las células transformadas por el virus, ya que en éstas, se encuentran antígenos asociados a la membrana que si bien son inducidos por el virus, no son antígenos estructurales del virión. Se ha demostrado que la inmunización con tumores alo y singeneicos inducidos por el virus polioma pero no productores de virus, protege eficientemente a los ratones de un injerto con un tumor de polioma ya establecido, mientras que la inmunidad contra el virus no es necesaria ni suficiente para provocar el rechazo (80). Se sabe además, que este rechazo se debe casi exclusivamente a células T y no a una respuesta humoral (134).

Corolario 3°:

Este corolario establecía que un agente cancerígeno debía inmunodeprimir al huésped para que se evi

denciara su acción oncogénica.

La inmunodepresión producida por cancerígenos químicos fue documentada en un gran número de trabajos. Sin embargo, experimentos posteriores revelaron que el efecto cancerígeno podía ser disociado del efecto inmunodepresor dependiendo de las dosis utilizadas. Por ejemplo, en la cepa de ratones C_3H_f utilizando metilcolantreno (MC) en dosis de 0.02-0.5mg, se producen tumores sin afectar la respuesta a glóbulos rojos de carnero (GRC) -medida como células formadoras de placa IgM e IgG en el bazo o como título de anticuerpos hemaglutinantes en suero- ni la reacción de rechazo de un aloinjerto de piel. Con dosis de 0.1-0.2 mg (también dosis cancerígenas) se reduce la respuesta IgM sin afectar la respuesta IgG o el título de anticuerpos a GRC ni la reacción de rechazo de tejido alogeneico. Por último, dosis de 0.5-2mg, además de su poder oncogénico, reducen todas las respuestas inmunológicas medidas (131). Lo mismo puede decirse del uretano. Dosis mayores de 1mg de la droga por gramo de peso corporal poseen capacidad oncogénica en el ratón y además, deprimen su sistema inmunológico. Sin embargo, dosis inferiores (0.5mg/g) tienen aún poder cancerígeno pero no efecto inmunodepresor (100). Por otra parte, se ha observado que la vía de administración del agente cancerígeno parece deslindar el efecto oncogénico del inmunodepresor. Por ejemplo, se sabe que la administración subcutánea de hidrocarburos policíclicos como el MC o el dimetilbenzantraceno (DMBA) produce tumores y deprime la capacidad inmune del huésped contra GRC. Ahora bien, las mismas dosis, ad

ministradas oralmente, conservan su poder oncogénico sistémico pero tienen escaso efecto sobre el sistema inmune (133, 161).

El efecto inmunodepresor de los virus oncogénicos ha sido objeto de numerosos estudios en mamíferos, principalmente roedores, y en aves (40). Los efectos más significativos fueron obtenidos con los oncornavirus murinos rápidamente letales del tipo de Friend y Rauscher los cuales producen una profunda depresión de la respuesta humoral a diversos antígenos cuando estos son inoculados antes y durante el desarrollo de la enfermedad y un más moderado deterioro de la inmunidad celular, el que por lo general, se evidencia sólo en períodos tardíos del proceso maligno (44, 52, 53, 97, 160, 164). El virus de leucemia de Moloney tiene dos comportamientos diferentes dependiendo del animal de experimentación utilizado. En la ratona, se ha observado una depresión de la inmunidad humoral medida contra varios antígenos pero este efecto no ha podido ser encontrado en ratones (40). Otro oncornavirus, el virus de Gross, agente causal de la leucemia espontánea del ratón, también ha sido estudiado pero los resultados han sido variables ya que algunos trabajos han descrito una disminución, aunque moderada, de la respuesta humoral y celular y en otros, no se han encontrado diferencias con los controles excepto en estados tardíos del desarrollo neoplásico (40, 131). El oncornavirus de la leucemia felina, por su parte, ha mostrado un efecto depresor de la inmunidad celular, medida como tiempo de rechazo de un injerto de tejido alogeneico, mientras no te-

nía acción sobre la inmunidad humoral contra GRC (104). No obstante, estos resultados fueron obtenidos con preparaciones muy concentradas del virus por lo que se desconoce si con dosis menores no podría disociarse el efecto inmunodepresor del leucemógeno. Los restantes oncornavirus estudiados como los virus de sarcoma murino de Moloney y de Harvey, los virus del tumor mamario del ratón, los virus de la leucemia aviaria y los virus a DNA como los adenovirus, herpes, poliovirus, SV₄₀, etc., no muestran ningún efecto o a lo sumo, efectos equívocos y variables sobre el sistema inmune del huésped.

Considerando conjuntamente los resultados obtenidos con cancerígenos químicos y virales, puede decirse que éstos no evidencian la generalidad que había predicho este corolario de la teoría, aunque la posibilidad de que, en muchos casos, no se hayan evaluado los efectos sobre las funciones inmunes pertinentes para la eliminación del tumor, impide sacar conclusiones decisivas al respecto.

Probablemente, el sistema que parece adecuarse más claramente a la idea sustentada por este corolario es el sistema de los oncornavirus leucemógenos del tipo de Friend o Rauscher. No obstante, y a pesar de que estos virus han sido objeto de numerosos estudios, aún no se conoce realmente la importancia de su capacidad inmunodepresora en el desarrollo de la leucemia.

El análisis detallado de los tres corolari

rios fundamentales de la teoría de la vigilancia inmunológica indica que ésta, en la forma propuesta por Burnet, esto es vigilancia llevada a cabo por células T, tiene una validez restringida a las neoplasias producidas por ciertos oncoDNAvirus, mientras que, en los restantes sistemas, este mecanismo no existe o a lo sumo, en algunos casos, permanece sin demostrarse. Estas conclusiones, sin embargo, no afectan la forma general de la teoría ya que la inexistencia o la existencia restringida de un sistema de vigilancia T, no significa que otros mecanismos específicos o inespecíficos (60, 67,114) no puedan ser operativamente importantes.

B. PARTE EXPERIMENTAL

1. INTRODUCCION

a. Objeto de esta Tesis

Si bien el sistema de oncornavirus murinos altamente patógenos del tipo Friend o Rauscher parecía adecuarse a ciertas predicciones de la teoría de la vigilancia inmunológica, la demostración efectiva de este hecho aún no ha sido llevada a cabo. El objeto de esta Tesis fue precisamente aportar datos a favor o en contra de la existencia de un mecanismo de vigilancia inmunológica contra las neoplasias producidas por estos virus tomando como modelo de estudio el virus leucemógeno PLLV-T2. Debe señalarse que no ha sido el propósito de este trabajo demostrar la presencia de reacciones inmunes contra estas neoplasias -hecho ya establecido (29, 150, 162)- sino determinar si estas reacciones podían ser efectivas antes de que los procesos malignos se hicieran aparentes. Tampoco se ha intentado elaborar protocolos de vacunación anti-tumoral dado que, aun una vacunación altamente efectiva no es suficiente para probar que, en condiciones "normales" es decir, "no inmunes", los animales pueden reconocer y rechazar las células malignas en estado subclínico.

Como objetivo mediato se esperaba que las investigaciones realizadas en este sistema pudieran aportar ciertos indicios de la existencia o inexistencia de mecanismos de vigilancia inmunológica contra las neoplasias espontáneas, categoría a la que pertenecen la ma

yoría de los tumores humanos. Sobre este último punto, cabe hacer sin embargo, la siguiente observación. Se sabe que en condiciones naturales, hay algunas neoplasias de origen viral contra las cuales se ha demostrado la existencia de poderosos mecanismos de vigilancia celular (ej.: polioma) o humoral (ej.: virus de la leucemia felina) (49, 79), a pesar de lo cual, estos hallazgos han aportado muy poco a la demostración de mecanismos de vigilancia dirigidos contra las neoplasias espontáneas en general. ¿Por qué cabe suponer, entonces, que el estudio llevado a cabo en otro sistema viral, el de los oncornavirus murinos altamente patógenos, pueda realizar en alguna medida, ese aporte?. La respuesta debe buscarse en las diferencias que existen entre aquellos sistemas y éste. En las neoplasias virales que se observan en la naturaleza como las producidas por el virus polioma en el ratón, el virus de la leucemia felina, el herpes saimiri en el mono-ardilla, presumiblemente el virus de Epstein-Barr en el hombre, etc., los virus se encuentran presentes en sus huéspedes naturales desde su nacimiento y han permanecido asociados a ellos, durante un largo período de su historia evolutiva, por lo que parece natural que se hayan seleccionado mecanismos de vigilancia inmunológica contra las células transformadas que desde el nacimiento debían originarse por causa de estos virus (79, 80). En cambio, en el sistema de los oncornavirus murinos rápidamente fatales la situación es enteramente diferente. Estos, al ser virus "de laboratorio", (59) no están asociados a la historia evolutiva del ratón y la aparición de un mecanismo de vigilan-

cia contra las neoplasias producidas por estos virus no representaría en apariencia, ninguna ventaja selectiva, por lo que de existir tal mecanismo, éste podría ser el subproducto de un sistema de vigilancia inmunológica dirigido a la prevención de los cánceres espontáneos.

b. Plan general de la investigación

Si un mecanismo específico cumpliera las funciones de vigilancia inmunológica contra las neoplasias producidas por los oncornavirus murinos altamente patógenos, éste debería ser afectado por los virus en un período previo al establecimiento clínico de la neoplasia y, correlativamente, la acción de agentes que inmunodeprimieran o inmunoestimularan este mecanismo debería facilitar o dificultar respectivamente, el desarrollo de la enfermedad. Con el objeto de analizar estas predicciones de la teoría de la vigilancia inmunológica se realizaron los experimentos de esta Tesis.

Si bien un objetivo de toda investigación de esta naturaleza debería ser medir la inmunodepresión específica contra los antígenos tumorales, este análisis, en el sistema viral en estudio, presenta muchas complicaciones en lo que se refiere a la interpretación de los resultados. En efecto, cuando se busca determinar el poder inmunodepresor de estos virus, se compara la respuesta inmune contra un antígeno de prueba entre los animales infectados y los controles normales. Pero si en lu

gar de un antígeno de prueba cualquiera se emplearan las células transformadas por los virus, la situación presentaría las siguientes características: dado que estas células son una fuente continua de producción viral (115), en el grupo control también estaría presente el supuesto agente inmunodepresor; dado que este tipo de virus comparte antigenicidad con las células que transforma (115, 123) y que su inoculación produciría a su vez, células malignas, la magnitud y la forma de administración del antígeno no serían comparables en el grupo experimental y en el control, por lo que una supuesta inmunodepresión podría estar oscurecida por un mayor desafío antigénico. Un ejemplo de los problemas que se suscitan cuando se trata de medir la inmunodepresión in vivo producida por estos virus contra los antígenos de sus propias células neoplásicas, lo constituye un trabajo de Mc Coy (87), el cual ha ilustrado con claridad las dificultades señaladas.

Por estas razones, los estudios con los virus Friend y Rauscher se han dirigido, por lo general, a medir su capacidad inmunodepresora sobre la respuesta celular y humoral contra diversos antígenos no relacionados suponiendo que ésta reflejaría la respuesta contra los antígenos neoplásicos. En este estudio, en el que se ha utilizado otro virus perteneciente al grupo de los oncornavirus leucemógenos rápidamente fatales, el PLLV-T2, se ha seguido la misma orientación. La suposición anterior no es arbitraria ya que la carencia de inmunidad antitumoral y antiviral en un período preclínico de la enfermedad ha sido considerada por algunos, como una consecuen-

cia de la inmunodepresión mediada por estos virus (162). La utilización de agentes que deprimen o estimulan en forma generalizada la respuesta inmune (celular o humoral) ha procurado aportar datos más específicos sobre la naturaleza del supuesto mecanismo de vigilancia inmunológica. Con el propósito de detectar no sólo una posible aceleración (o retardo) del proceso neoplásico como en otros trabajos (71, 138) sino también un incremento (o disminución) del número de tumores, se han empleado muchas dosis diferentes de PLLV-T₂, algunas de las cuales no producían leucemia en condiciones normales. De tal modo que, en forma general, el plan de esta investigación ha consistido en analizar:

1°) El efecto de PLLV-T₂ sobre la inmunidad del huésped que infecta en lo que respecta a su capacidad para llevar a cabo reacciones de rechazo de injertos de tejido alogeneico y reacciones de injerto contra huésped.

2°) El efecto de PLLV-T₂ sobre la inmunidad humoral contra lipopolisacáridos y glóbulos rojos de carnero.

3°) El efecto de agentes inmunodepresores e inmunoestimuladores sobre el desarrollo de la leucemia PLLV-T₂.

Debe hacerse, por último, una aclaración metodológicamente importante referida a la aplicación del concepto de "neoplasia clínica o subclínica" a las leucemias producidas por los oncornavirus murinos rápidamente fatales. Es decir, ¿cuál es el umbral por debajo del que este tipo de neoplasias virales se encuentra en estado subclínico y más

allá del cual se considera clínicamente reconocible?. Este umbral debe estar determinado por un indicio objetivo obtenido en contacto directo con el animal enfermo (22); por lo tanto, si bien se sabe por estudios histológicos que las células transformadas comienzan a proliferar a partir de las 30 horas post-infección viral (145), no se considera que esta comprobación sea un reconocimiento clínico. Dado que el desarrollo de estas neoplasias está en relación directa con el tamaño del bazo del huésped, el cual aumenta de peso proporcionalmente a la proliferación de las células leucémicas, un criterio que permite reconocer clínicamente el estado de estos procesos malignos es la palpación esplénica. Por lo tanto, puede decirse que este tipo de leucemias adquiere estado clínico cuando el bazo se hace perceptible por palpación como un órgano genuinamente agrandado, lo que ocurre aproximadamente cuando se ha duplicado su peso normal (73, 91, observación personal).

2. MATERIALES Y METODOS

a. Animales de experimentación

En este estudio se han empleado ratones de ambos sexos, de 1,5 a 2,5 meses de edad, de las cepas endocriadas BALB/c, DBA/2, C₅₇BL/Ks, AKR, CBA y C₃H, y de la cepa exocriada Swiss.

b. Virus leucemógenos

El virus utilizado fue el PLLV-T₂ (varian

te T_2 del Precerutti-Law Leukemia Virus (34, 110)), el cual es un oncornavirus tipo C clásico con un diámetro de 100nm, una densidad de 1.16g/cm^3 y un coeficiente de sedimentación de alrededor de 1000S (120).

c. Leucemia

El PLLV- T_2 produce una enfermedad muy similar a la causada por los virus Friend y Rasucher, caracterizada como leucemia eritroblástica de corta latencia (promedio de muerte alrededor de 1 mes) que incluye gran esplenomegalia y hepatomegalia sin involucrar ni timo ni ganglios linfáticos (20, 145). Se ha podido comprobar que en este tipo de leucemias, el peso de bazo o más estrictamente el índice esplénico (peso de bazo en mg/peso de ratón en g) de los ratones infectados es un adecuado índice de la progresión neoplásica (6, 35, 61, 89, 117, 128).

d. Preparación del virus (36)

El procedimiento para preparar PLLV- T_2 consistió en: 1) homogeneizar uno o más bazos leucémicos en fosfato bufferado (PBS) en una relación de 1 a 10 (P/V); 2) centrifugar a 1000 g durante 15 minutos a 4°C y 3) centrifugar el sobrenadante anterior a 8000 g durante 15 minutos a 4°C . Este último sobrenadante fue considerado como la dilución 10^{-1} de PLLV- T_2 .

e. Bioensayo y titulación del virus

El bioensayo para el virus PLLV- T_2 se rea-

lizó por inoculación intraperitoneal (ip) de 0.2ml de la muestra problema en ratones BALB/c hembras de 1,5 a 2 me ses de edad. En base a experimentos previos, en éste y en otros sistemas análogos (33, 118, 220), se consideró que el bioensayo era positivo cuando al día 28 post-inoculación, los animales infectados habían muerto con una gran esplenomegalia o tenían un peso de bazo igual o superior a 500mg para ratones de 18 a 20g o sea, un índice esplénico entre 25 y 27. Los bazos controles de ratones BALB/c sin tratar, inoculados con PBS o con extracto acelular de bazo BALB/c normal, siempre tenían pesos inferiores a 200mg con un promedio de 130 mg, esto es un índice esplénico entre 7 y 8. Para calcular el título de PLLV-T₂ en una muestra dada, se hicieron diluciones seriadas de diez en diez y 0.2ml de cada dilución, se inocularon ip a ratones BALB/c. El título se calculó por el método de Reed y Muench al día 28 post-inoculación, considerando que la dilución más alta con la cual el 50% de los ratones inoculados mostraban bioensayo positivo, representaba el punto final de la titulación y poseedora de una dosis esplenomegalia 50 (1DE₅₀). Por observaciones anteriores en este Laboratorio, se sabía que 1DE₅₀ al día 28, era equivalente a una dosis letal 50 (1DL₅₀) y por ello, los datos de titulación fueron expresados en DL₅₀. En los experimentos se utilizó siempre un inóculo viral de 0.2 ml.

f. Antígenos

Los antígenos utilizados fueron lipopolisacáridos (LPS) y glóbulos rojos de carnero (GRC). La respuesta inmune al primero depende sólo de las células B, mientras que la respuesta al segundo, es altamente dependiente no sólo

lo de las células B sino también de macrófagos y células T helper (44).

g. Agentes inmunodepresores e inmunoestimuladores

En este trabajo, se empleó la ciclofosfamida en dosis que deterioran específicamente las células B (200-300mg/Kg) y en dosis que sólo estimulan ciertas reacciones de la inmunidad celular sin afectar la respuesta humoral (20-30mg/Kg) (3, 155).

h. Titulación de anticuerpos contra GRC

Se inocularon los ratones con 0.3-0.4ml de GRC al 15% por vía ip y 2,3,4,6,7 ó 10 días después, de acuerdo a los requerimientos experimentales, se sangraron por vía retroorbital extrayéndose los sueros a través de dos centrifugaciones sucesivas a 25000 y 3500 rpm. Después de decomplementar los sueros media hora a 56°C, se calculó el título de anticuerpos hemaglutinantes contra GRC. Con tal objeto, 0.05ml de cada suero se diluyeron seriadamente al medio en 0.05ml de PBS y a cada dilución se le agregaron 0.05ml de GRC al 1%. Después de la incubación de una hora, a 37°C, se leyó el título de anticuerpos hemaglutinantes, considerando que la última dilución que aglutinaba era el punto final de la titulación y poseedora de una unidad hemaglutinante, por lo que la inversa de esta dilución representaba el título de anticuerpos en el suero sin diluir. Por lo general, este valor se expresa como \log_2 del título de anticuerpos (121) y esta ha sido la manera emplea

da para denotarlo en este trabajo.

i. Titulación de anticuerpos contra LPS (57)

Se inmunizaron los ratones con 10 ug de LPS en 0.1ml de solución salina por vía ip. Seis días después, se sangraron los ratones por vía retroorbital extrayéndose los sueros según el procedimiento convencional y de complementándolos luego, a 56°C durante 30 minutos. Por otra parte, se preparó una solución salina de 10mg de LPS en 10ml de solución salina y se hirvió en un baño de agua durante 90 minutos después de lo cual, 9ml de esta solución se añadieron a 1ml de GRC al 100%. La mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos para unir LPS a GRC. Luego de esto, los GRC, con LPS unido, se lavaron tres veces y se preparó una suspensión del 1% en solución salina. Para el cálculo del título de anticuerpos contra LPS, 0.05ml de cada suero se diluyeron seriadamente al medio en 0.05 ml de solución salina y a cada dilución, se le agregaron 0.05ml de GRC (unido a LPS) al 1%. Después de una incubación de dos horas a temperatura ambiente, se leyó el título hemaglutinante que es un reflejo de la respuesta inmune contra LPS.

j. Reacción de rechazo de injertos de piel alogeneica.

Para evaluar la respuesta inmunológica contra un injerto de piel alogeneica, ratones BALB/c (H-2^d) recibieron un injerto de piel de ratones C₃H (H-2^k) (56). Los injertos fueron examinados diariamente y el

punto final del ensayo fue el día de "rechazo" del injerto. Se consideró rechazado el injerto cuando aparecían los primeros síntomas de hemorragias, endurecimiento y necrosis (52, 72).

k. Reacción de injerto contra huésped

Para medir la reacción de injerto contra huésped se usó el ensayo de Simonsen según el cual se inocularon, por vía ip, células de bazo de ratones BALB/c en ratones Swiss recién nacidos. Las suspensiones celulares esplénicas se realizaron pasando las células a través de una malla de alambre, con medio mínimo esencial (MEM) y luego, en dos o tres oportunidades, a través de aguja fina. Las células se trataron con cloruro de amonio al 0.83% P/V durante 7 minutos a temperatura ambiente con el objeto de lisar los glóbulos rojos y luego, para quitarlo, se lavaron tres veces con MEM. Las células viables se contaron mediante el método de exclusión con Azul Trypan llevándose a la concentración requerida con MEM. Los ratones Swiss recién nacidos, al no ser inmunológicamente competentes para rechazar los linfocitos alogeneicos inyectados, fueron susceptibles de ataque por parte de éstos. La medida de la capacidad de los ratones dadores BALB/c para montar una reacción de injerto contra huésped se determinó por el tiempo de sobrevivencia de los ratones Swiss receptores del injerto (48).

l. Evaluación estadística

El cálculo de significación estadística de los resultados se realizó utilizando los test de χ^2 y "t" de Student (99). Se ha considerado a $p=0.05$ el límite de la significación estadística con ambos tests.

3. RESULTADOS

a. Efecto de PLLV-T₂ sobre la inmunidad celular

i. Reacción de rechazo de tejido alogeneico.

Si se considera que contra la leucemia provocada por PLLV-T₂, existe un mecanismo de vigilancia inmunológica específico mediado por células T, es decir tal como lo propuso Burnet (14), y que el rechazo de tejido alogeneico es un reflejo de este mecanismo original montado contra las neoplasias (148), debería esperarse que PLLV-T₂ interfiriese con la reacción de rechazo de un tejido alogeneico (52, 111) en un período previo al establecimiento clínico de la enfermedad.

Para evaluar esta posibilidad se realizó el siguiente experimento:

Experimento I: Se inocularon 42 hembras BALB/c de dos meses de edad por vía intraperitoneal (ip) con una dilución 10^{-1} de PLLV-T₂ (tit. 5×10^6 DL₅₀/ml) y 24 ratones se dejaron como controles. De los 42 animales inoculados con el virus, 30 se utilizaron para evaluar el desarrollo leucémico por el bicensayo de peso de bazo a distintos tiempos post-inoculación (p.i.) viral (Fig.1) y de los 24 no infectados, 12 se emplearon como control de este parámetro. A los 4 días p.i. viral, es decir cuando el peso del bazo había superado el umbral de detección clínica del tumor (ver Fig.1) 12 ratones infectados y 12 controles recibieron un transplante de piel alogeneica

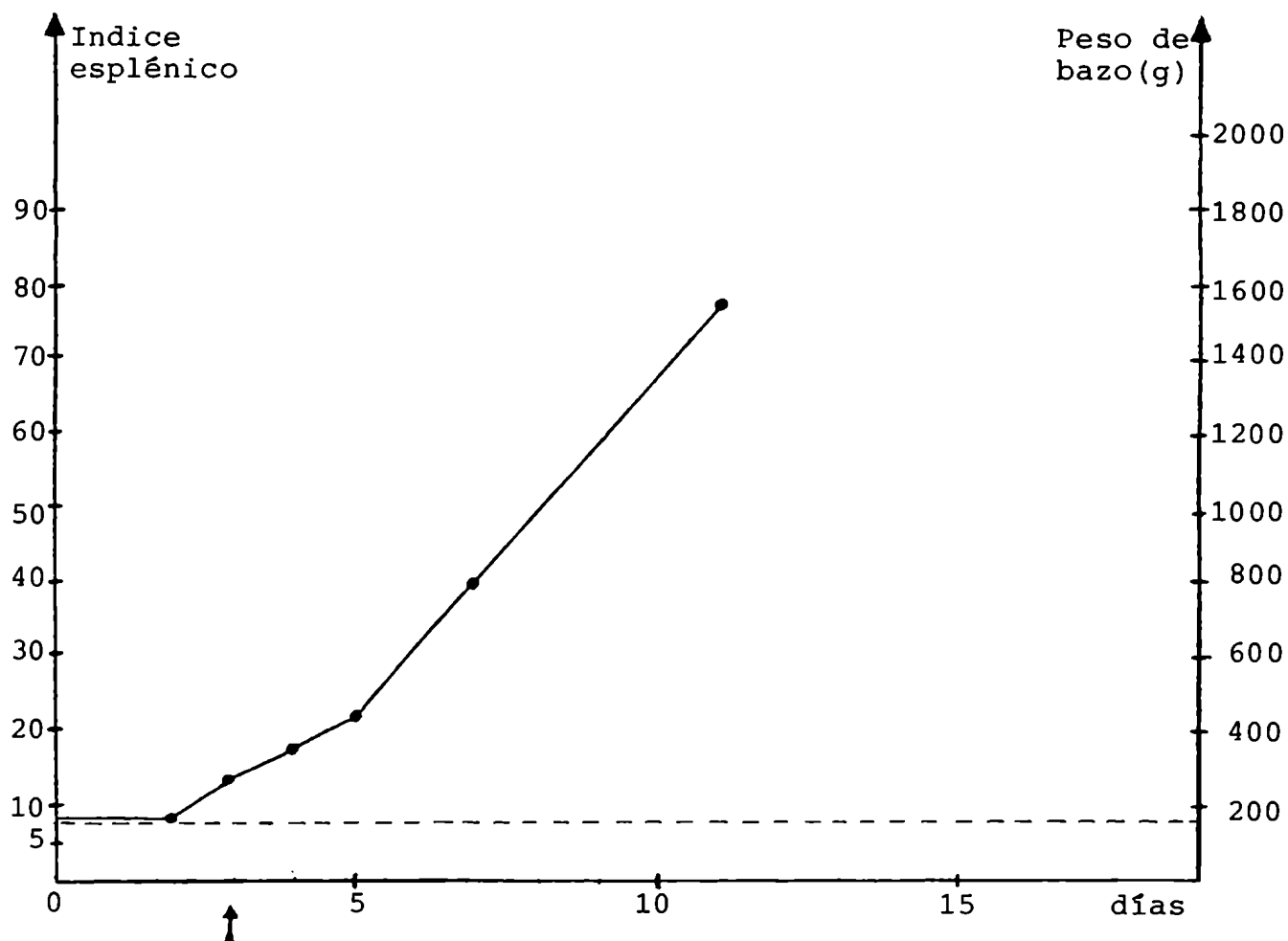


Figura 1: Índice esplénico (o peso de bazo ajustado a un peso corporal de 20g) en ratones BALB/c infectados al día 0 con PLLV-T₂ (dilución 10⁻¹). La línea punteada paralela a la abscisa representa el índice esplénico de ratones BALB/c normales. La flecha indica el día en que los bazos se hacen palpables. Preparación de virus utilizada en Tabla 1.

Tabla 1: EFFECTO DE PLLV-T₂ SOBRE EL TIEMPO DE SOBREVIDA DE UN ALOINJERTO DE PIEL DE C3H EN RATONES BALB/c

RATONES BALB/c	DOSIS DE VIRUS	N° DE RATONES RECEPTORES DEL ALOINJERTO	SOBREVIDA DE ALOINJERTOS PROMEDIO±D.S. (días)
Normales	-	12	9 ±1.4
Infectedos con PLLV-T ₂ (a)	10 ⁻¹	12	9.6±1.6

p > 0.1 (b)

(a) Infectados con el virus 4 días antes de recibir el injerto de piel alogeneica.

(b) p: no significativo (test "t" de Student).

proveniente de ratones C₃H y a partir de allí, los injertos fueron examinados diariamente determinándose su supervida. Los datos de este experimento están consignados en Tabla 1. Como puede apreciarse no hubo una diferencia significativa entre los grupos control y experimental lo cual revela que la reacción de rechazo de un aloinjerto no está deteriorada en un período temprano de la leucemia PLLV-T₂.

ii. Reacción de injerto contra huésped

Otro modo de estudiar in vivo el efecto de PLLV-T₂ sobre la función de las células inmunocompetentes dependientes del timo consiste en medir la capacidad del animal infectado para llevar a cabo reacciones de injerto contra huésped.

Para analizar esta posibilidad se realizaron los siguientes experimentos:

Experimento II: Se inyectaron 4 hembras BALB/c de dos meses de edad por vía ip con una dilución 10⁻² de PLLV-T₂ (tít: 5 x 10⁵ DL₅₀/ml) a los cuatro días pi. se extrajeron los bazos cuando éstos ya eran palpables (coeficiente esplénico 16.7) y 15 x 10⁶ células esplénicas viables se incoularon en 9 ratones Swiss recién nacidos. Como controles, se inocularon 9 ratones Swiss recién nacidos con 15 x 10⁶ células esplénicas viables de bazos normales (coeficiente esplénico promedio 7.5). Se hicieron tres controles adicionales: 5 Swiss recién nacidos inoculados con extracto acelular de los bazos infectados; 5 con ex-

tracto acelular de bazos normales y 5 sin tratar. La reacción de injerto contra huésped fue evaluada en todos los grupos midiendo el porcentaje y el tiempo de sobrevida de los ratones Swiss. Los resultados de este experimento se encuentran detallados en Tabla 2, y revelan que la capacidad de los animales infectados para montar una reacción de injerto contra huésped, no está deteriorada aún cuando la leucemia ya se encuentra en un estadio clínico.

Experimento III: Este experimento fue similar al anterior sólo que variaron la dosis de virus utilizada y el número de ratones en los grupos control y experimental. Se inyectaron por vía ip 4 hembras BALB/c con una dilución 10^{-3} de PLLV-T₂ (tít: 5×10^5 DL₅₀/ml). Cuatro días pi viral se extrajeron los bazos -aún no palpables, con un coeficiente esplénico de 12- y 15×10^6 células viables se inyectaron en 9 ratones Swiss recién nacidos. Como controles se inocularon 11 ratones Swiss recién nacidos con 15×10^6 células esplénicas viables de bazos normales (coeficiente esplénico 7.6). Se hicieron dos controles adicionales: 7 Swiss recién nacidos inoculados con extracto acelular de bazos infectados y 7 sin tratar. Del mismo modo que en el experimento anterior, se determinó el porcentaje y el tiempo de sobrevida de los ratones Swiss como parámetro de la reacción de injerto contra huésped. Los resultados están consignados en Tabla 3 e indican que la capacidad de los animales infectados para llevar a cabo reacciones de injerto contra huésped no está deprimida en un período en el que aún no se ha alcanzado el umbral de detección clínica del tumor.

b. Efecto de PLLV-T₂ sobre la inmunidad humoral

Tabla 2: EFFECTO DE PLLV-T₂ (DILUCION 10⁻²) SOBRE LA REACCION DE INJERTO CONTRA HUESPED (I vs H).

Sobrevida de ratones Swiss recién nacidos inoculados con células esplénicas de ratones BALB/c no infectados o infectados 4 días antes con el virus PLLV-T₂.

INOCULOS	N° SWISS MUERTOS POR I vs H N° SWISS INOCULADOS	SOBREVIDA DE LOS RATONES SWISS MUERTOS POR I vs H (días)
Células esplénicas ^(b) a los 4 días p.i. con PLLV-T ₂	5/9 ^(d)	18.5 ± 2.9 ^(e)
Células esplénicas ^(b) normales	5/9 ^(d)	19.2 ± 3.0 ^(e)
Extracto acelular ^(c) de bazo a los 4 días p.i. con PLLV-T ₂	0/5	> 30
Extracto acelular ^(c) de bazo normal	0/5	> 30
Nada	0/5	> 30

(a) El experimento se dio por terminado un mes después de la inoculación de los ratones Swiss.

(b) 15x10⁶ células esplénicas viables en 0.05 ml.

(c) 0.05ml

(d) p > 0.1, no significativa (test χ^2).

(e) p > 0.1, no significativa (test "t" de Student).

Tabla 3: EFFECTO DE PLLV-T₂ (DILUCION 10⁻³) SOBRE LA REACCION DE INJERTO CONTRA HUESPED (I vs H).

Sobrevida de ratones Swiss recién nacidos inoculados con células esplénicas de ratones BALB/c no infectados o infectados 4 días antes con el virus PLLV-T₂.

INOCULOS	N° SWISS MUERTOS POR I vs H N° SWISS INOCULADOS	SOBREVIDA DE LOS RATONES SWISS MUERTOS POR I vs H (días)
Células esplénicas ^(b) a los 4 días p.i. con PLLV-T ₂	5/9 ^(d)	20.2 ± 2.4 ^(e)
Células esplénicas ^(b) normales	5/11 ^(d)	19.8 ± 3.6 ^(e)
Extracto acelular ^(c) de bazo a los 4 días p.i. con PLLV-T ₂	0/7	> 30
Nada	0/7	> 30

(a) El experimento se dio por terminado un mes después de la inoculación de los ratones Swiss.

(b) 15 x 10⁶ células esplénicas viables en 0.07ml

(c) 0.07ml

(d) p > 0.1, no significativo (test χ^2).

(e) p > 0.1, no significativo (test "t" de Student).

Si se considera que contra la leucemia producida por PLLV-T₂ existe un mecanismo de vigilancia inmunológica mediado por anticuerpos, podría esperarse que PLLV-T₂ interfiriese con la respuesta humoral a diversos antígenos como un reflejo del deterioro de la respuesta inmune contra los antígenos neoplásicos. Para evaluar esta posibilidad, se realizaron experimentos utilizando dos antígenos: GRC y LPS. Desde que la respuesta al primero, depende de la cooperación de células B con células T helper y macrófagos y la respuesta al segundo, sólo depende de células B, el efecto del virus sobre ambas debería aportar datos sobre la naturaleza del supuesto mecanismo de vigilancia inmunológica.

i. Respuesta a GRC en la cepa BALB/c

Experimento IV: Se infectaron lotes de hembras BALB/c de 1.5 a 2 meses de edad con distintas diluciones de PLLV-T₂ y a diferentes tiempos pi los animales fueron desafiados con GRC, midiéndose la respuesta de anticuerpos en suero 7 días más tarde. Los controles fueron ratones sólo desafiados con GRC (Tabla 4). En la Figura 2, se puede apreciar la progresión leucémica en los grupos infectados con las distintas dosis de virus utilizadas en el experimento de Tabla 4. Los resultados de este experimento muestran que PLLV-T₂ afecta profundamente la respuesta humoral a GRC aún cuando éstos sean inoculados en un período previo al desarrollo clínico de la enfermedad. En efecto, en los ratones infectados con la dilución 10⁻¹ de PLLV-T₂, el tumor comenzaba a hacerse perceptible el día 4 pi pero, la respuesta humoral a GRC se encontraba profundamente afectada aún cuando éstos fueron ino-

Tabla 4: EFFECTO DE PLLV-T₂ SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL A GRC.

DOSIS DE PLLV-T ₂	Log ₂ TITULO DE ANTICUERPOS ANTI-GRC ^(a) INOCULACION DE GRC ^(b)			
	D I A S			
DIA				
0	+1	+3	+4	+10
dilución 10 ⁻¹	6.4 [±] 0.2 ^(c)		1.2 [±] 0.4 ^(d)	0.5 [±] 0.1 ^(d)
dilución 10 ⁻²			3.5 [±] 0.2 ^(c)	3.8 [±] 0.5 ^(d)
dilución 10 ⁻³		6.8 [±] 0.2 ^(c)	6.5 [±] 0.4 ^{* (c)}	5 [±] 0.3 ^(d)
nada ^(e) (control)	9.2 [±] 0.3	8.9 [±] 0.3	9 [±] 0.5	10.3 [±] 0.3

- (a) El título de anticuerpos en suero se calcula 7 días después del desafío con GRC, es decir, a 8, 10, 11 y 17 días post-infección viral.
- (b) Cada uno de los valores representa el promedio de 6 animales.
- (c) El día del desafío con GRC no había manifestación clínica de la leucemia.
- (d) El día del desafío con GRC había manifestación clínica de la leucemia.
- (e) Todos los valores de la tabla difieren de sus controles con un $p < 0.001$, excepto el valor señalado con * que difiere del control con $p < 0.005$ (test "t" de Student).

Título de la preparación de PLLV-T₂: 5×10^5 DL₅₀/ml

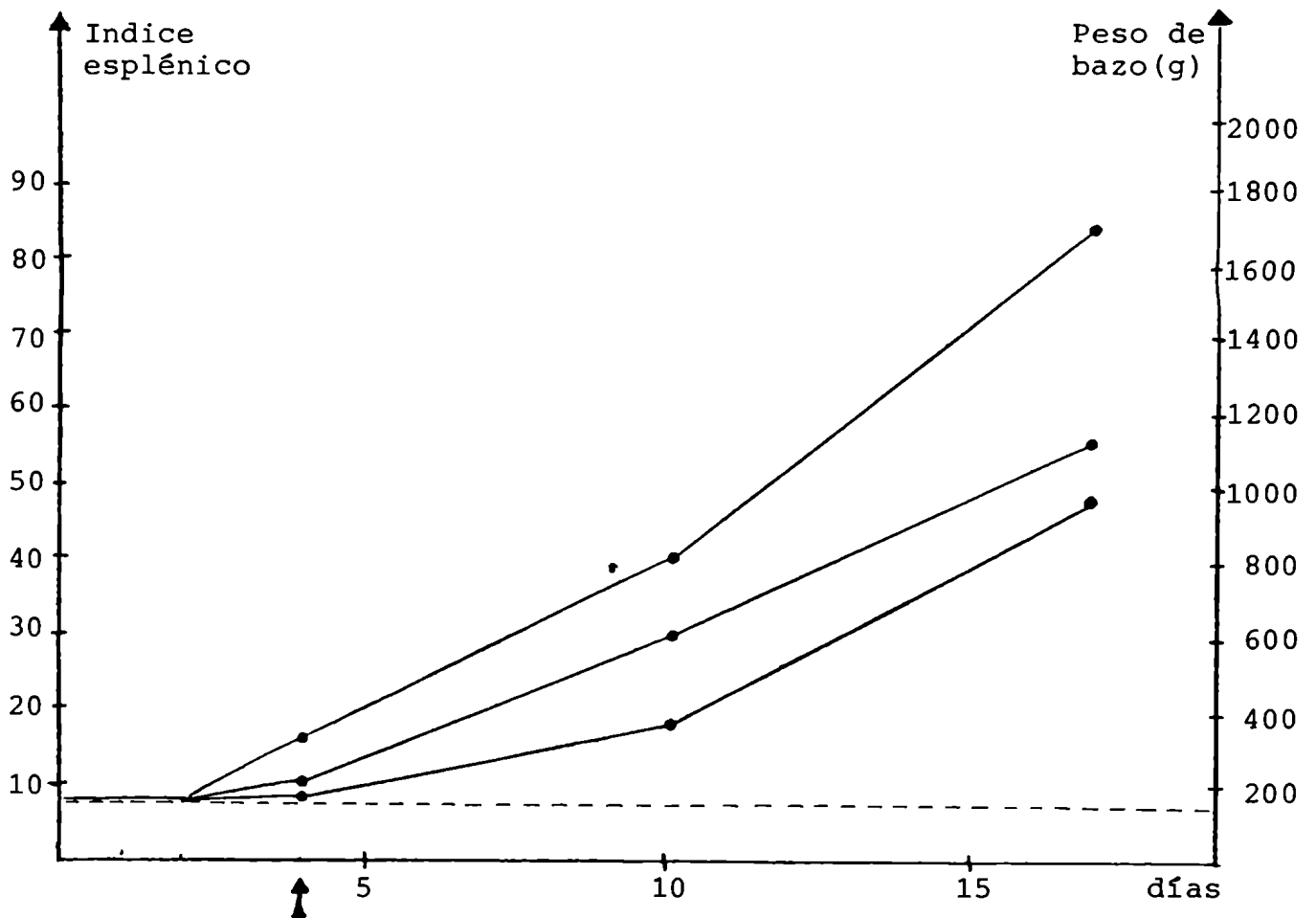


Figura 2: Índice esplénico (o peso de bazo ajustado a un peso corporal de 20g) en ratones BALB/c infectados al día 0 con distintas diluciones de PLLV-T₂ (10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³).

La línea punteada paralela a la abscisa representa el índice esplénico de ratones BALB/c normales.

La flecha indica el día en que los bazos de los ratones inoculados con la dilución 10⁻¹ de PLLV-T₂ se hacen palpables, no siéndolo aún, los de aquéllos inoculados con las dos diluciones restantes.

Preparación de virus utilizada en Tablas 4 y 5.

culados el día 1pi. En los animales infectados con las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} de PLLV-T₂, el tumor comenzaba a hacerse clínicamente reconocible entre los días 6 y 8 pi, pero la respuesta humoral a GRC se encontraba marcadamente deteriorada aún cuando éstos fueron inoculados en los días 3 y 4 pi. Estos datos parecen apoyar la idea de que un sistema de vigilancia inmunológica contra la leucemia PLLV-T₂ podría estar mediado por una respuesta humoral dependiente del timo.

ii. Respuesta a LPS en la cepa BALB/c

Experimento V: Se inocularon lotes de hembras BALB/c de 1.5-2 meses de edad con diferentes diluciones de la misma preparación de PLLV-T₂ utilizada en el experimento de Tabla 4; 4 ó 11 días después, los animales fueron desafiados con LPS y 6 días más tarde, fueron sangrados y se calculó el título de anticuerpos anti-LPS. Los resultados están consignados en Tabla 5 y revelan que PLLV-T₂ afecta la respuesta humoral a LPS aunque la magnitud de la depresión es menor a la observada con GRC, especialmente en el período temprano del desarrollo leucémico. En efecto, en los ratones inoculados con la dilución 10^{-1} del virus, el tumor comenzaba a detectarse clínicamente en el día 4pi. Cuando LPS fue inoculado en ese día, la respuesta a éste fue poco inferior -aunque la diferencia era significativa- que la de los controles. En los ratones inoculados con las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , el tumor comenzaba a detectarse clínicamente los días 6 y 8 pi respectivamente. Cuando

Tabla 5: EFEECTO DE PLLV-T₂ SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL A LPS.

DOSIS DE PLLV-T ₂	Log ₂ TITULO DE ANTICUERPOS ANTI-LPS ^(a) INOCULACION DE LPS	
DIA	D I A S	
0	+4	+11
dilución 10 ⁻¹	7.5 ± 0.3 ^(c) n=11 p < 0.05	N.D. ^(b)
dilución 10 ⁻²	7.9 ± 0.2 ^(d) n= 4 p < 0.1 ^(e)	4 ± 0.4 ^(c) n=6 p < 0.001
dilución 10 ⁻³	8.1 ± 0.2 ^(d) n=10 p > 0.1 ^(e)	5.6 ± 1.3 ^(c) n=6 p < 0.01
nada (control)	8.7 ± 0.4 n=9	8.8 ± 0.3 n=11

(a) El título de anticuerpos en suero se calcula 6 días después del desafío con LPS, es decir, 10 y 17 días post-infección.

(b) No determinado.

(c) El día del desafío con LPS había manifestación clínica de la leucemia.

(d) El día del desafío con LPS no había manifestación clínica de la leucemia.

(e) p: no significativo (test "t" de Student).

Título de la preparación de PLLV-T₂: 5 x 10⁵ DL₅₀/ml

LPS fue inoculado en el día 4 pi, la respuesta a éste, si bien menor, no fue significativamente diferente de la de los controles, aunque quizá, si hubiera sido inoculado en un período posterior, aún preclínico del desarrollo neoplásico, habría podido detectarse algún deterioro de la capacidad inmune. Estos datos no descartan la posibilidad de que una respuesta humoral independiente del timo cumpla algún papel como mecanismo de vigilancia inmunológica contra la leucemia PLLV-T₂ aunque el grado de depresión -y por lo tanto, la probable importancia de esta alternativa- es inferior al de la respuesta dependiente del timo analizada anteriormente.

iii. Respuesta a GRC en distintas cepas.

Los dos experimentos anteriores no son suficientes para probar que una respuesta humoral cumple las funciones de vigilancia inmunológica contra esta leucemia viral. Para ello, en primer lugar, con el propósito de evaluar la universalidad del fenómeno, pareció necesario analizar la relación entre inmunodepresión y leucemogénesis en distintas cepas de ratones con diferente grado de susceptibilidad a los efectos oncogénicos de este virus. Se empleó GRC como antígeno de prueba para medir la inmunodepresión ya que la respuesta a éste, es la más severamente deprimida por los virus en estudio.

Experimento VI: Se inocularon lotes de ratones hembras de 1,5 a 2 meses de edad de las cepas

BALB/c, Swiss y DBA/2 con una dilución 10^{-3} de PLLV-T₂ (día 0) y 4 días más tarde, se desafiaron con GRC (día +4) midiéndose 7 días después (día +11) el título de anticuerpos anti-GRC en suero. Los resultados de este experimento se encuentran detallados en Tabla 6, donde se indica también, el desarrollo leucémico de cada grupo al día +11. Como dato complementario, en la Figura 3, se puede observar la progresión neoplásica en función del tiempo en las tres cepas de ratones infectados con la dilución 10^{-3} de la misma preparación de PLLV-T₂. Los resultados de este experimento muestran que el efecto de la infección con PLLV-T₂ sobre la capacidad inmune de dos cepas con susceptibilidad muy semejante a los efectos oncogénicos del virus, son muy diferentes. En efecto, mientras la respuesta humoral a GRC se encontraba marcadamente deprimida en la cepa BALB/c cuando este antígeno era inoculado a los 4 días pi viral, en las mismas condiciones no se observaba ningún efecto sobre la capacidad inmune de los animales infectados de la cepa DBA/2 (Tabla 6). En la cepa Swiss, por su parte, la inmunodepresión temprana fue virtualmente igual a la observada en la cepa BALB/c pero, la progresión leucémica fue mucho más lenta.

Con el propósito de extender los datos del experimento anterior a un mayor número de cepas y a distintas dosis de virus, se realizó el siguiente experimento:

Experimento VII: Se inocularon lotes de ratones hembras de 2 meses de edad de las cepas BALB/c, DBA/2, Swiss, CBA, AKR y C₅₇BL/Ks con distintas diluciones

Tabla 6: EFFECTO DE PLLV-T₂ (DILUCION 10⁻³) SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL A GRC Y SU RELACION CON EL DESARROLLO LEUCEMICO EN DISTINTAS CEPAS DE RATONES.

CEPAS	Log ₂ título anticuerpos antiGRC (a)		Indice esplénico(día+11)			
	GRUPOS (b)		GRUPOS (b)			
	PLLV-T ₂ (día0) + GRC (día+4)	GRC (día+4) (c) <i>¿Cáncer?</i>	PLLV-T ₂	Nada	PLLV-T ₂ (día0) +GRC (día+4)	GRC (día+4)
BALB/c	5.8 [±] 0.4 p < 0.001	8.7 [±] 0.2	19.4 [±] 0.9 p < 0.001	7.5 [±] 0.4	19.5 [±] 1.2 p < 0.001	9.5 [±] 1.7
DBA/2	10 [±] 0.4 p > 0.1(d)	9.8 [±] 0.4	19.2 [±] 1.1 p < 0.001	7.3 [±] 0.7	18.2 [±] 1.8 p < 0.01	8.7 [±] 1.7
Swiss	6.9 [±] 0.4 p < 0.001	10.3 [±] 0.5	9.5 [±] 0.4 p > 0.1(d)	8.1 [±] 0.7	10.5 [±] 0.9 p > 0.1(d)	9.6 [±] 0.6

- (a) El título de anticuerpos en suero se calcula 7 días después del desafío con GRC, es decir, el día +11.
 (b) Cada uno de los valores representa el promedio de 6 animales.
 (c) El día del desafío con GRC no había aún manifestación clínica de la neoplasia en ninguna de las 3 cepas.
 (d) p: no significativo (test "t" de Student).

Título de la preparación de PLLV-T₂: 5 x 10⁵DL₅₀/ml

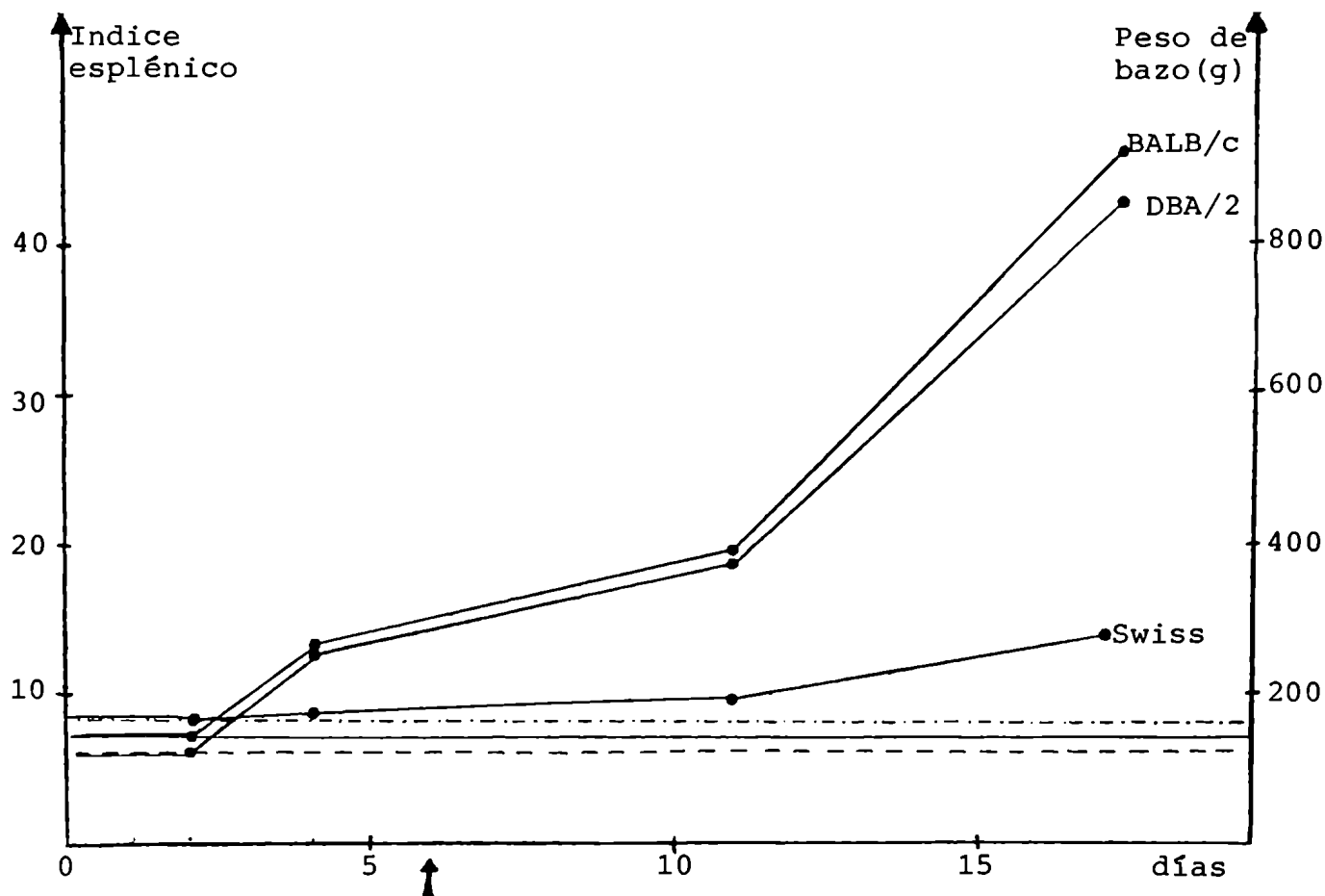


Figura 3: Índice esplénico (o peso de bazo ajustado a un peso corporal de 20g) en ratones de las cepas BALB/c, DBA/2 y Swiss infectados al día 0 con una dilución 10^{-3} de PLLV- T_2 .

Líneas paralelas a la abscisa:

- : representa el índice esplénico de ratones BALB normales
- : representa el índice esplénico de ratones DBA/2 normales
- · - · - · - ·: representa el índice esplénico de ratones Swiss normales

La flecha indica el día en que los bazos de los ratones BALB/c y DBA/2 se hacen palpables. Los bazos Swiss no se palpan aún al día 17.

Preparación de virus utilizada en Tabla 6.

(10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) de una preparación de PLLV-T₂ (día 0) y 4 días después se desafiaron con GRC (día +4) midiéndose 7 días más tarde (día +11) el título de anticuerpos anti-GRC. Los resultados se encuentran detallados en Tabla 7. A su vez, el desarrollo leucémico (al día +11) observado en las distintas cepas con las diferentes diluciones de PLLV-T₂ utilizados, está indicado en Tabla 8. Como puede apreciarse, los resultados son similares a los del experimento anterior. El desarrollo leucémico al día +11 (medido como cociente entre el índice esplénico de los animales infectados y el de los controles normales) fue muy parecido en los ratones BALB/c y DBA/2 inoculados con la dilución 10^{-3} de PLLV-T₂ y en los AKR inoculados con las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} del mismo virus. Sin embargo, mientras que en los ratones AKR inoculados con la dilución 10^{-1} y en los BALB/c se evidenciaba una marcada inmunodepresión, no pudo apreciarse lo mismo en los AKR inoculados con la dilución 10^{-2} ni en los ratones DBA/2. Debe destacarse que los datos de Tabla 7, que importan para determinar si la inmunodepresión es una condición de la leucemia, son aquellos acompañados por la notación bazo no-palpable (NP) dado que son los únicos con los que podría demostrarse la existencia o inexistencia de inmunodepresión en un período preclínico de la leucemia. Los dos experimentos anteriores sugieren que el deterioro de la respuesta humoral no sería un evento universalmente requerido para el establecimiento de la neoplasia. Además, muestran que no hay una relación directamente proporcional entre el grado de inmunodepresión temprana y la leucemogénesis como podría haberse esperado en principio, si aquella fuera una condición

Tabla 7: EFECTO DE DIFERENTES DOSIS DE PLLV-T₂ SOBRE LA RESPUESTA HUMORAL A GRC EN DISTINTAS CEPAS DE RATONES.

CEPAS	Log ₂ TITULO DE ANTICUERPOS ANTI-GRC ^(a)			
	GRUPOS ^{(b) (c)}			
	PLLV-T ₂ (día 0)+GRC (día +4)			GRC (día+4) CONTROL
	DILUCIONES DE PLLV-T ₂			
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
BALB/c	0.9 [±] 0.2 ^P	3.2 [±] 0.4 ^{NP}	6.5 [±] 0.3 ^{NP(f)}	9.5 [±] 0.4
DBA/2	3 [±] 0.3 ^P	N.D. (d)	9.7 [±] 0.4 ^{NP*}	9.4 [±] 0.4
Swiss	1 [±] 0.7 ^{NP} n=4	5 [±] 1 ^{NP} n=4	6.9 [±] 0.4 ^{NP}	10.3 [±] 0.5
AKR	6.5 [±] 0.0 ^{NP} n=4	8.8 [±] 0.4 ^{NP*}	N.D.	9.8 [±] 0.4
C ₅₇ ^{BL/Ks}	3.3 [±] 0.5 ^{NP}	N.D.	6.4 [±] 0.2 ^{NP}	8.3 [±] 0.3
CBA	2 [±] 0.2 ^{P(e)}	N.D.	N.D.	9 [±] 0.4

- (a) El título de anticuerpos en suero se calcula 7 días después del desafío con GRC, es decir, el día +11.
- (b) Cada uno de los valores representa el promedio de 6 animales a excepción de aquéllos para los que se ha especificado un número distinto.
- (c) Todos los valores de la tabla difieren de sus controles con un $p < 0.001$, excepto aquéllos señalados con * cuya diferencia respecto del control correspondiente no es significativa con un $p > 0.1$ (test "t" de Student).
- (d) N.D.: no determinado
- (e) La notación P indica bazo palpable al día +4.
- (f) La notación NP indica bazo no palpable al día +4.

Tabla 8: DESARROLLO LEUCEMICO EN RATONES DE DISTINTAS CEPAS INOCULADAS CON DIFERENTES DILUCIONES DE PLLV-T₂.

CEPAS	INDICE ESPLENICO (día +11) (a)			
	PLLV-T ₂ (día 0)			NADA (b) CONTROL
	D I L U C I O N E S			
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
BALB/c	66.2 [±] 4.6	39.3 [±] 2.5	20.1 [±] 1.0	7.4 [±] 1.4
DBA/2	72.5 [±] 5	N.D. ^(c)	18.2 [±] 1.8	8.1 [±] 0.9
Swiss	9.6 ^{*±} 0.4 n=4	8.4 ^{*±} 0.5 n=4	9.5 [±] 0.4	8.1 [±] 0.7
AKR	13.8 [±] 0.9	12.2 [±] 0.4	N.D.	5.4 [±] 1
C ₅₇ -BL/Ks	8.2 ^{*±} 1.9	N.D.	6.8 [±] 1.2	6.3 [±] 0.5
CBA	48.0 [±] 2.4	N.D.	N.D.	6.0 [±] 0.5

(a) Cada uno de los valores representa el promedio de 6 animales a excepción de aquéllos para los que se ha especificado un número distinto.

(b) Todos los valores de la tabla difieren de sus controles con un $p < 0.001$ excepto aquéllos señalados con * cuya diferencia respecto del control correspondiente no es significativa con un $p > 0.1$ (test "t" de Student).

(c) N.D.: no determinado.

Título de la preparación de PLLV-T₂: 5×10^5 DL₅₀/ml

para el desarrollo de ésta. Por ejemplo, la inmunodepresión contra GRC observada en las cepas Swiss y C57BL/Ks fue muy superior a la de las cepas DBA/2 y AKR aunque el desarrollo leucémico en las primeras, fue marcadamente inferior. Esta situación se ha documentado en Tabla 9, en la cual se asignó a cada cepa un número de orden de acuerdo a su susceptibilidad a la leucemia PLLV-T₂ y a los efectos inmunodepresores tempranos del virus, según los datos de las Tablas 6, 7 y 8.

iv. Respuesta a GRC durante el período preclínico de la leucemia PLLV-T₂.

A pesar de que no todas las cepas evidencian una inmunodepresión humoral antes del establecimiento de la leucemia PLLV-T₂, debilitando la idea de que un mecanismo de vigilancia inmunológica de este tipo sea operativo en forma universal, ello no significa que no pueda existir un sistema restringido de vigilancia en ciertos grupos de ratones.

Dado que la gran mayoría de los estudios acerca de la capacidad inmunodepresora de los oncornavirus rápidamente fatales se llevó a cabo en la cepa BALB/c utilizando como antígeno de prueba a GRC (8, 26, 74) pareció importante evaluar si en esta cepa la inmunodepresión realmente precedía a la leucemia. En principio se había supuesto que así era en realidad dado que la inmunodepresión a GRC se observaba aún cuando el antígeno era inoculado en un período preclínico de la enfermedad. Sin embargo, la

Tabla 9: CLASIFICACION DE LAS CEPAS DE ACUERDO A SU SUSCEPTIBILIDAD A LOS EFECTOS ONCOGENICOS E INMUNODEPRESORES TEMPRANOS DEL VIRUS PLLV-T₂

SUSCEPTIBILIDAD A :	C E P A S (a)					
	DBA/2	BALB/c	CBA	AKR	Swiss	C ₅₇ BL/Ks
oncogénesis	1	2	3	4	5	6
inmunodepresión	5	2	3	6	1	4

(a) A cada cepa se le asigna un número de orden de acuerdo a su susceptibilidad a los efectos oncogénicos e inmunodepresores de PLLV-T₂. Por ejemplo, a la cepa más susceptible a los efectos oncogénicos de PLLV-T₂ se le asigna el número 1, a la que le sigue en susceptibilidad el número 2 y así sucesivamente. Lo mismo se aplica para la susceptibilidad a los efectos inmunodepresores.

medición de la respuesta humoral se hacía siempre varios días después del desafío antigénico, cuando la leucemia ya se había desarrollado, por lo que fue necesario verificar si antes del establecimiento clínico de ésta, existía efectivamente una respuesta humoral disminuída.

Experimento VIII: Se inocularon lotes de hembras BALB/c de 1,5 a 2 meses de edad con una dilución 10^{-1} (la dilución con mayor capacidad inmunodepresora) de PLLV-T₂ (día 0) por vía intraperitoneal. Un grupo fue destinado a evaluar el desarrollo leucémico temprano en función del tiempo (Figura 4) y los restantes fueron desafiados, antes y después del día 0, con GRC, midiéndose la respuesta inmune a distintos días post-desafío antigénico (Figuras 5, 6, 7, 8). Como puede apreciarse en estas figuras, independientemente del día en que GRC fueron inoculados, la respuesta humoral a éstos no estaba deteriorada, en ningún caso, antes del día +5 pi viral. Como los bazos de los animales infectados ya eran palpables a partir del día +3, parece evidente que la depresión inmune no se produjo antes que la leucemia fuera perceptible.

c. Efecto de un agente inmunodepresor e inmunoestimulador sobre el desarrollo de la leucemia PLLV-T₂

Los estudios anteriores sugieren que el virus PLLV-T₂ y probablemente también los restantes oncornavirus murinos altamente patógenos, no necesitan deprimir la respuesta inmune para que se establezca la leucemia que ellos producen. No obstante, estos análisis no fueron realizados

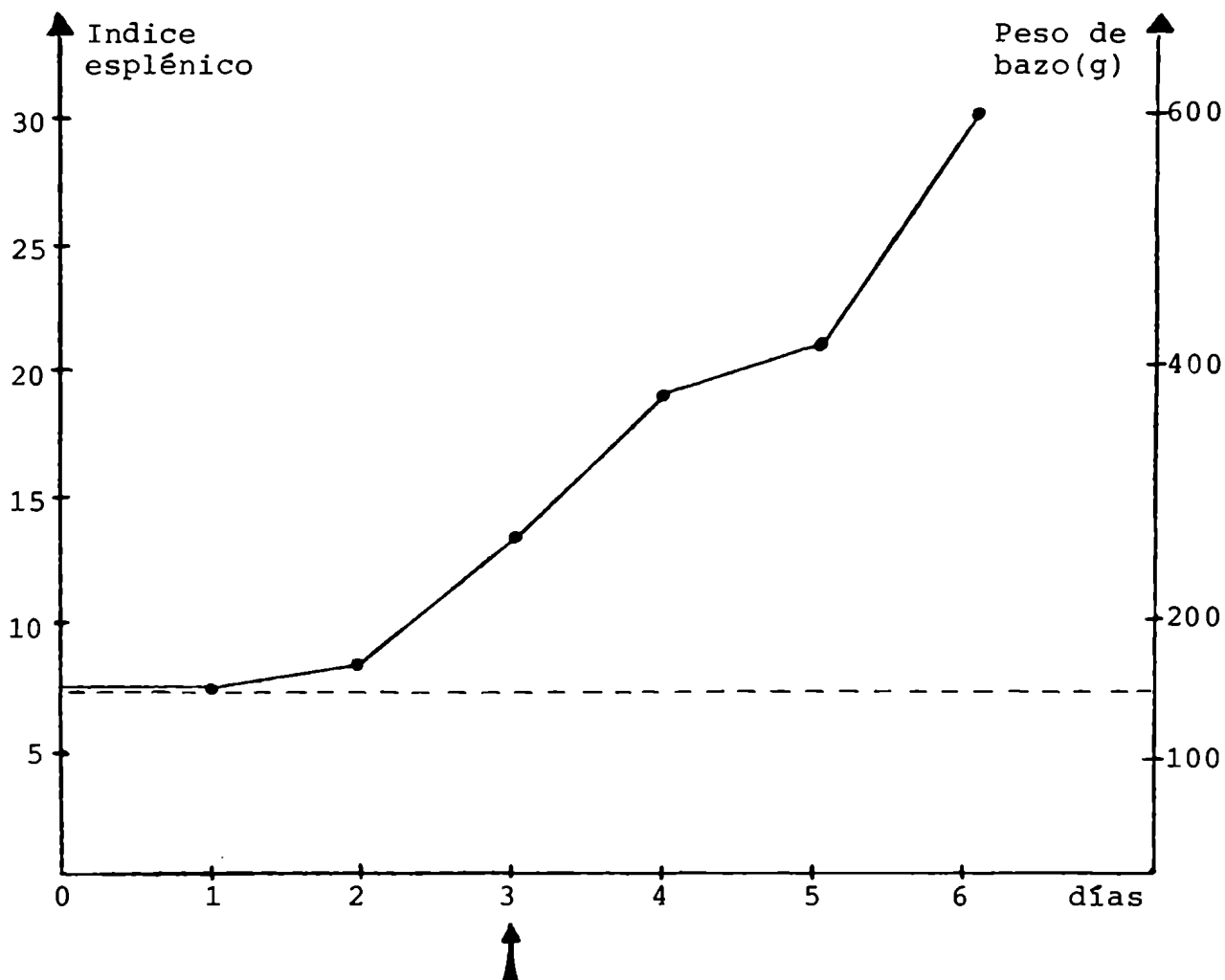


Figura 4: Índice esplénico (o peso de bazo ajustado a un peso corporal de 20g) en ratones BALB/c infectados al día 0 con PLLV-T₂ (dilución 10⁻¹). La línea punteada paralela a la abscisa representa el índice esplénico de ratones BALB/c normales. La flecha indica el día en que los bazo se hacen palpables. Preparación de virus utilizada en las Figuras 5, 6, 7 y 8. Título de la preparación de PLLV-T₂: 1 x 10⁶ DL₅₀/ml

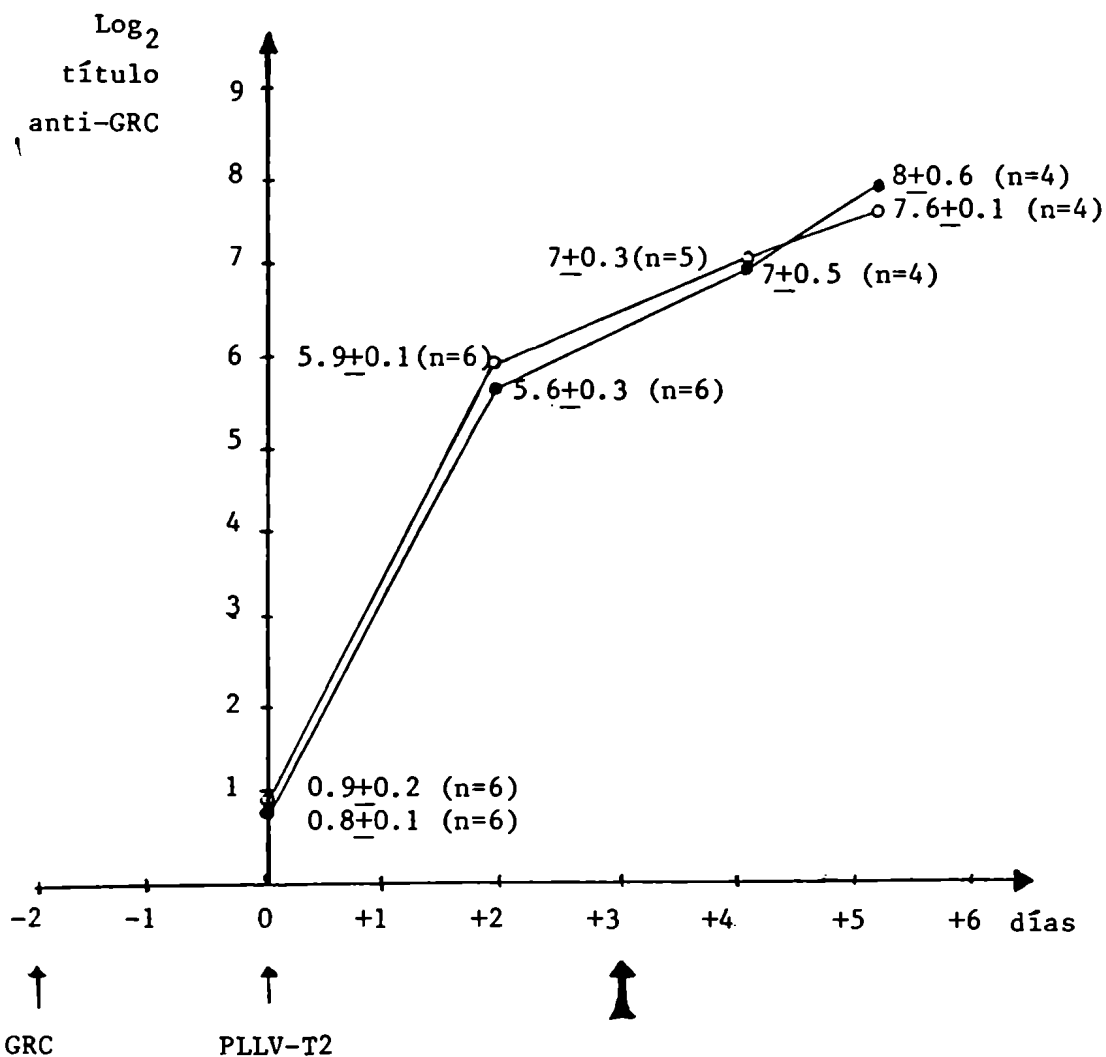


Figura 5: Respuesta inmune a GRC en ratones BALB/c infectados con PLLV-T2 (día 0) y desafiados con GRC (día -2)

- : grupo control: GRC (día -2)
- : grupo experimental: GRC (día -2) + PLLV-T2 (día 0)

La flecha gruesa indica el día en que los bazo se hacen palpables en el grupo experimental.

La diferencia entre los grupos experimentales y control no es significativa ($p > 0.1$) para todos los días analizados.

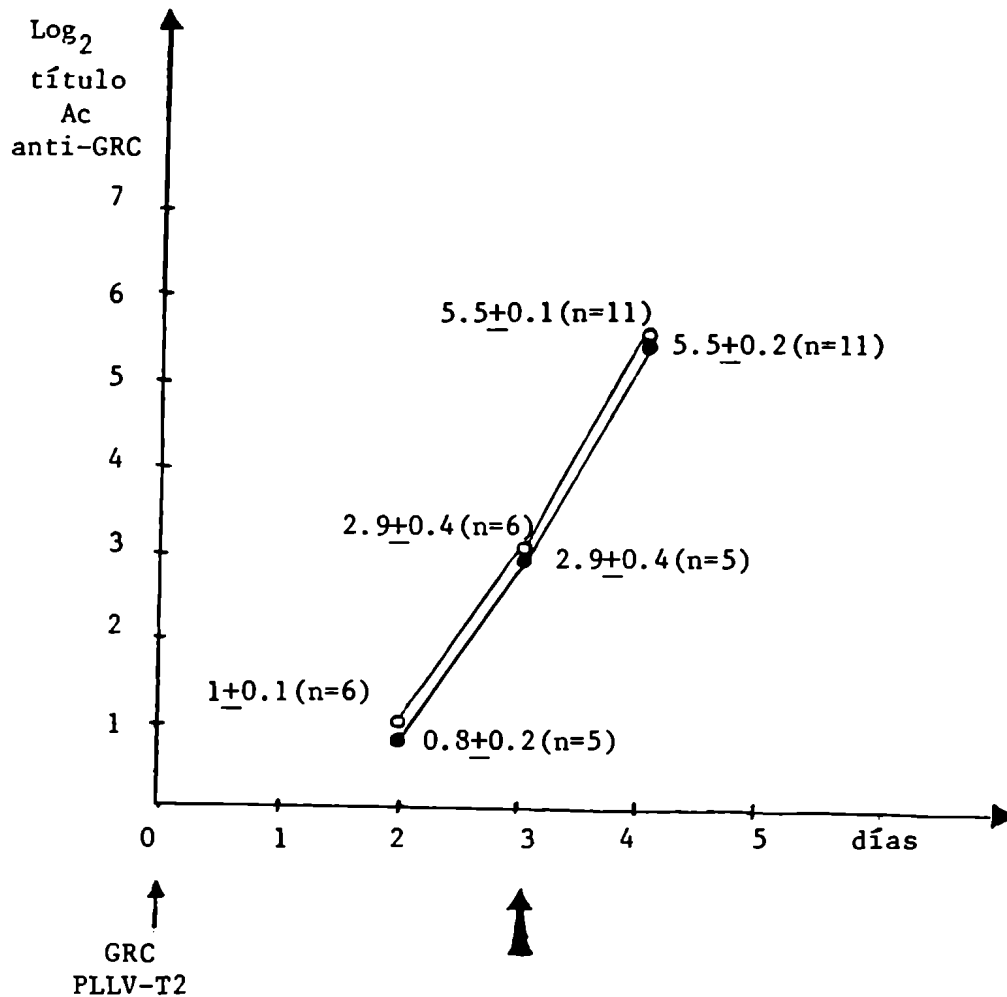


Figura 6: Respuesta inmune a GRC en ratones BALB/c infectados con PLLV-T2 (día 0) y desafiados el mismo día con GRC.

●—● : Grupo control: GRC (día 0)

○—○ : Grupo experimental: GRC (día 0) + PLLV-T2 (día 0)

La flecha gruesa indica el día en que los bazo se hacen palpables en el grupo experimental.

La diferencia entre los dos grupos no es significativa ($p > 0.1$) para todos los días analizados.

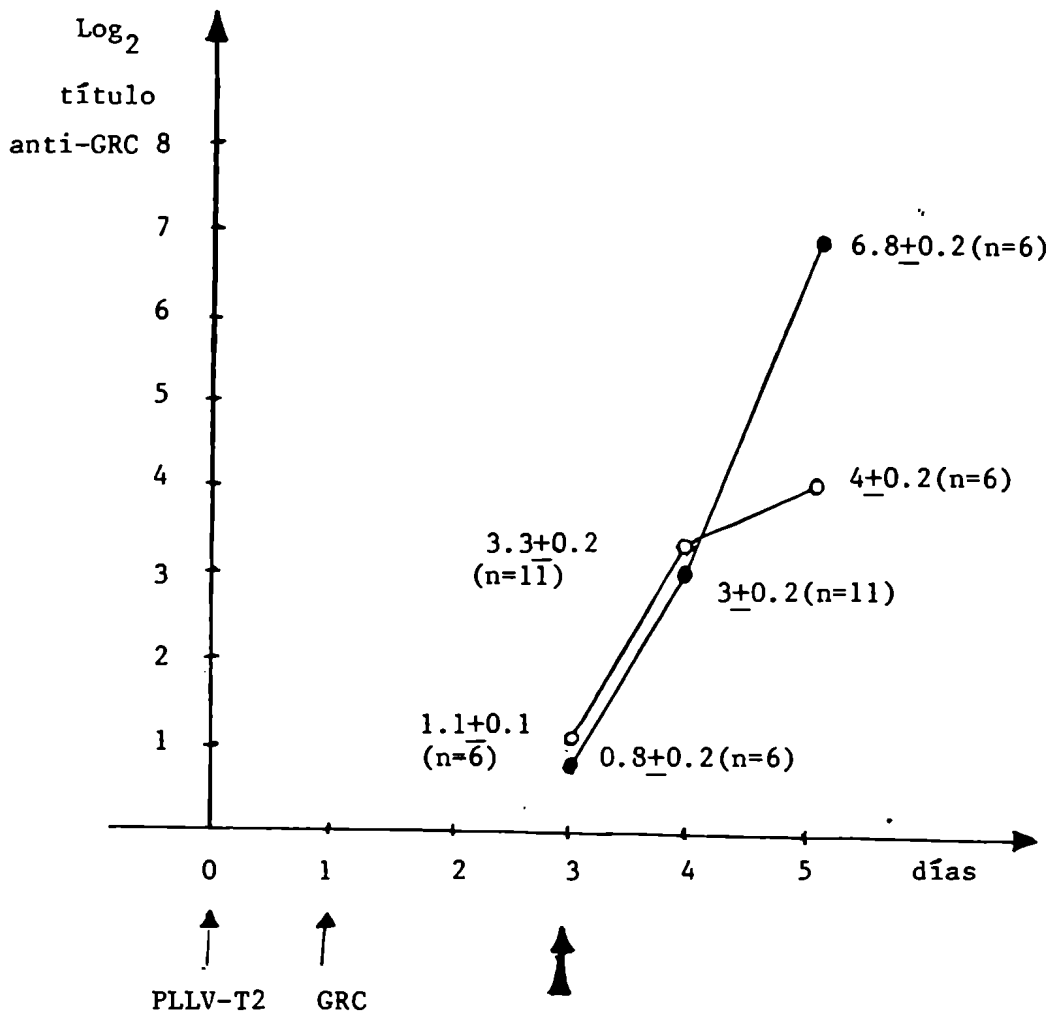


Figura 7: Respuesta inmune a GRC en ratones BALB/c infectados con PLLV-T2 (día 0) y desafiados con GRC (día +1)

- : Grupo control: GRC (día +1)
- : Grupo experimental: PLLV-T2 (día 0) + GRC (día +1)

La flecha gruesa indica el día en que los bazos se hacen palpables en los animales del grupo experimental.

En los días 3 y 4 la diferencia entre ambos grupos no es significativa ($p > 0.1$) pero en el día 5 sí lo es ($p < 0.001$).

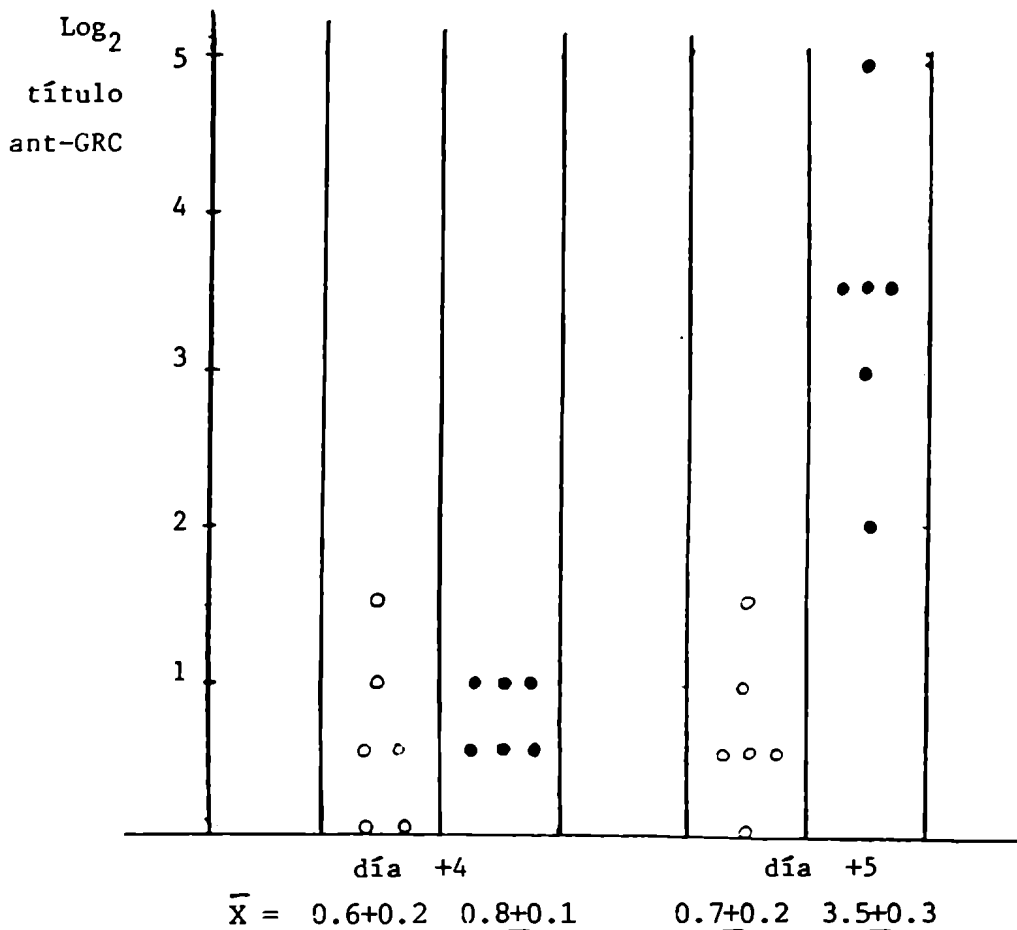


Figura 8: Respuesta inmune a GRC en ratones BALB/c infectados con PLLV-T2 (día 0) y desafiados con GRC (día +2)

- : Grupo control: GRC (día +2)
- : Grupo experimental: PLLV-T2 (día 0) + GRC (día +2)

El día +3 los bazos se hacen palpables en el grupo experimental.

Dado que los GRC se inocularon el día +2 el título de anticuerpos se ha calculado 2 y 3 días después del desafío antigénico. En el día +4 la diferencia entre ambos grupos no es significativa ($p > 0.1$) pero en el día +5 sí lo es ($p < 0.001$).

específicamente con los antígenos neoplásicos quedando la posibilidad de que la respuesta inmune contra éstos, esté deteriorada en un período preclínico de la enfermedad aunque no ocurra lo mismo con la respuesta a otros antígenos no relacionados. Si ésto fuera así, podría existir de to dos modos un sistema de vigilancia inmunológica y consecuentemente, una inmunodepresión o inmunoestimulación del mecanismo encargado de llevarla a cabo, aumentaría o disminuiría respectivamente la incidencia neoplásica. Para evaluar esta alternativa, se utilizó ciclofosfamida (CY) en dos dosis diferentes: 300mg/Kg de peso corporal y 20mg/Kg. La primera dosis produce una selectiva y profunda depleción de linfocitos B (3, 154, 155); este efecto se extiende durante 7 días después de la inoculación y la respuesta humoral se encuentra deprimida en forma generalizada hasta el día 13 (3, 155). La dosis menor de CY produce un incremento en ciertas reacciones de la inmunidad celular dependiente del timo, como la hipersensibilidad retardada, sin afectar la respuesta humoral (3). Hay que hacer notar que CY como agente antitumoral, tiene una vida media muy corta y su concentración en el organismo desciende rápidamente y desaparece a lo sumo 24 horas después de su adminis tración (42, 62, 81, 82). Contrariamente CY, como agente inmunodepresor (o inmunoestimulador), tiene un efecto más prolongado (62) por lo que si se ajustaran adecuadamente la dosis y el tiempo de su administración, podría evidenciarse sólo su capacidad inmunodepresora o inmunoestimuladora y determinarse en consecuencia, el efecto de ésta sobre el desarrollo leucémico. Con este propósito, se llevó a cabo el siguiente experimento:

Experimento IX: Se inocularon por vía ip lotes de ratones BALB/c de ambos sexos, de 1.5 a 2 meses de edad, con 300mg/Kg ó 20mg/Kg de CY y 3 días más tarde, se infectaron por vía ip con distintas diluciones de PLLV-T₂. Los controles fueron ratones sólo inoculados con el virus. El parámetro utilizado para medir la progresión neoplásica fue la sobrevivencia de los animales infectados.

Dado que las células neoplásicas producidas por los oncornavirus murinos fuertemente oncogénicos comienzan a aparecer más allá del primer día después de la infección (145), y que los efectos antineoplásicos de CY desaparecen cuatro días después de la inoculación de una sola dosis de 300mg/Kg ó 20mg/Kg, este sistema pareció adecuado para medir la relación entre inmunodepresión, inmunostimulación y leucemogénesis. Asimismo, el efecto de CY sobre el sistema inmune -que si bien es más prolongado que su acción antineoplásica no tiene mucha duración- permitió evaluar la consecuencia de una alteración en aquél sobre el desarrollo temprano (y no tardío) de la leucemia, que es lo que realmente importa para estudiar la posible existencia de un mecanismo de vigilancia inmunológica. Los resultados de este experimento se encuentran detallados en la Tabla 10.

Como puede apreciarse, con la dosis mayor de CY, la sobrevivencia en los grupos experimental y control, fue igual con todas las dosis de virus utilizadas salvo con la dilución 10⁻¹. Con ésta, el grupo que había recibido previamente 300mg/Kg de CY mostró una sobrevivencia significativamente menor que el grupo control ($0.02 < p < 0.05$). Si la inmunodepresión de la respuesta humoral, causada o incrementada por CY, fuera un ele-

Tabla 10: EFECTO DE CICLOFOSFAMIDA (CY) SOBRE EL DESARROLLO DE LA LEUCEMIA PLLV-T₂ EN LA CEPA BALB/c.

DILUCIONES DE PLLV-T ₂ (b)	N° DE RATONES SOBREVIVIENTES (día 90) (a)			TIEMPO DE SOBREVIDA (a) PROMEDIO ± D.S. (días)		
	TOTAL					
	CY (300) + PLLV-T ₂ (c) (d)	CY (20) + PLLV-T ₂ (c) (d)	PLLV-T ₂	CY (300) + PLLV-T ₂	CY (20) + PLLV-T ₂	PLLV-T ₂
10 ⁻¹	0/3	N.D. (h)	0/3	19.7 [±] 2.2 ^(e)	N.D.	31.3 [±] 2.7
10 ⁻²	0/6	N.D.	0/6	23.5 [±] 1.8 ^(f)	N.D.	27.8 [±] 2.3 ^(f)
10 ⁻³	0/6	0/6	0/6	36.7 [±] 3.8 ^(f)	39.0 [±] 2.1 ^(f)	38.3 [±] 2.4 ^(f)
10 ⁻⁴	0/6	0/6	0/6	49.2 [±] 2.6 ^(f)	48.4 [±] 2.0 ^(f)	47.7 [±] 2.2 ^(f)
10 ⁻⁵	2/4	N.D.	2/6	58.72 (g)	N.D.	56, 59, 59, 69
10 ⁻⁶	5/5	5/5	5/6	> 90	> 90	50
10 ⁻⁷	6/6	6/6	5/6	> 90	> 90	62

(a) Los ratones fueron inoculados con CY 3 días antes de la infección con PLLV-T₂.

(b) Los ratones inoculados con las diluciones 10⁻¹ y 10⁻² de PLLV-T₂ fueron machos, los restantes fueron hembras.

(c) CY (300mg/Kg) y (20mg/Kg) respectivamente.

(d) La diferencia entre los grupos fue p > 0.1 por el test χ^2 para todas las diluciones analizadas.

(e) p < 0.05, test "t" de Student.

(f) p > 0.1, no significativa, test "t" de Student.

(g) Sobrevida individual de los ratones afectados por la enfermedad.

(h) N.D.: no determinado.

Título de la preparación de PLLV-T₂: 5 x 10⁵ DL₅₀/ml

mento necesario para el establecimiento clínico de esta leucemia viral, debería haberse esperado en primer lugar, que los ratones inoculados previamente con CY tuvieran una sobrevida significativamente menor que la de los controles para todas las diluciones empleadas de PLLV-T₂ y, en segundo lugar, la existencia de leucemia con aquellas diluciones virales que, por sí solas, eran incapaces de producir la enfermedad. Además, dado que la inmunodepresión producida por PLLV-T₂ es proporcional a la dosis, el efecto inmunodepresor adicional de CY debería haberse evidenciado más claramente con las dosis menores es decir, las diluciones más altas. El resultado obtenido con la dilución 10⁻¹ fue debida probablemente, a ciertos efectos tóxicos de CY sobre este grupo particular de ratones ya que la apariencia enfermiza de los mismos era muy diferente a la observada en el resto. No obstante, aún cuando haya sido la consecuencia de una disminución de la respuesta humoral contra las células malignas, ello sólo implicaría que la inmunidad humoral actúa contra la leucemia PLLV-T₂ en un período relativamente temprano de su desarrollo, pero no como un mecanismo de vigilancia inmunológica.

Con la dosis de CY que incrementa ciertas reacciones de la inmunidad celular sin afectar la respuesta humoral (20mg/Kg), la sobrevida no fue significativamente diferente entre los grupos experimental y control con ninguna de las diluciones de PLLV-T₂ utilizadas. Si estas reacciones de la inmunidad celular fueran un reflejo de la inmunidad contra la leucemia, debería haberse encontrado más sobrevida aumentada en los ratones inoculados con esta dosis de CY.

C. DISCUSSION

Las predicciones de la teoría de la vigilancia inmunológica han sido analizadas en numerosos sistemas tumorales. Si bien en la forma propuesta por Burnet, esto es, vigilancia llevada a cabo por células T, la teoría parece aplicarse sólo a algunas neoplasias naturales de origen viral, ello no significa que otros mecanismos específicos o inespecíficos no puedan ser operativamente más importantes.

El propósito de esta Tesis fue aportar datos a favor o en contra de la existencia de un sistema de vigilancia inmunológica contra las neoplasias producidas por los oncornavirus murinos rápidamente letales, tomando como modelo de estudio el virus leucemógeno PLLV-T₂. Como objetivo mediato del análisis antedicho, se esperaba obtener ciertos indicios de la presencia o ausencia de mecanismos de vigilancia contra las neoplasias espontáneas.

Los resultados de este trabajo revelaron, en primer lugar, que la inmunidad celular dependiente del timo, medida in vivo como reacción de rechazo de tejido alogeneico o reacción de injerto contra huésped, no fue afectada por PLLV-T₂ en un período temprano -preclínico y clínico- de esta leucemia viral. Estos experimentos concuerdan con algunos datos obtenidos en sistemas análogos (10,24,52) y sugieren que, a pesar de existir una reacción celular de naturaleza tímica contra las neoplasias causadas por los oncornavirus murinos altamente patógenos (11, 55, 149), ésta no actuaría como un sistema de vigilancia inmunológica porque de actuar como tal, PLLV-T₂ habría deprimido esta

respuesta como medio para permitir la progresión de la leucemia. No obstante, hay trabajos en los cuales se ha detectado cierto deterioro -inducido por los virus de Friend o Rauscher- de la inmunidad T utilizando como parámetro de ésta, la reacción de rechazo de aloinjertos (52), la susceptibilidad a infecciones virales (30) y a tumores de transplante (41), la respuesta in vitro de los linfocitos esplénicos a un estímulo alogéneico (63, 92), la inhibición de la migración de los macrófagos (91), etc. Sin embargo, esta inmunodepresión fue observada sólo en una etapa clínica de la enfermedad y en muchos casos, cuando la leucemia ya se encontraba en períodos muy avanzados de su desarrollo. Por lo tanto, estos datos son irrelevantes para el problema discutido en esta Tesis dado que una deficiencia del sistema inmune revelable sólo cuando la neoplasia ya se ha establecido, no puede considerarse como una condición de ésta sino en todo caso, como una consecuencia.

La inmunidad humoral dependiente (GRC) e independiente de la cooperación tímica (LPS) por su parte, fue afectada profundamente por PLLV-T₂ en la cepa BALB/c aunque el deterioro de la respuesta a GRC fue más pronunciado en el período inicial de la enfermedad. Con otros oncornavirus murinos rápidamente letales, también se ha detectado una deficiencia de la respuesta humoral a diversos antígenos (28, 43, 51, 126), lo cual, llevó a muchos autores a investigar los mecanismos de la inmunodepresión observada con la esperanza de caracterizar la falla inmunológica que pudiera explicar la progresión de

estas leucemias virales y quizá, aportar datos para la comprensión general de los procesos neoplásicos (21, 23, 25, 84). No obstante, en este trabajo se demostró que el fenómeno de inmunodepresión inducido por este virus no era universal ya que no solo no había una relación directamente proporcional entre la inmunodepresión temprana y la leucemogénesis causada por PLLV-T₂ en distintas cepas de ratones si no que había algunas -como la DBA/2- que teniendo una susceptibilidad a los efectos oncogénicos de este virus comparable a la de la cepa BALB/c no evidenciaron una respuesta inmune deteriorada en una etapa temprana del desarrollo leucémico. Estos datos están en aparente oposición con aquéllos obtenidos por Ceglowski y Friedman (27) quienes, trabajando con el virus Friend, observaron una relación bastante directa entre deficiencia inmune y leucemogénesis en algunos grupos de ratones. Sin embargo, dado que ese estudio se efectuó cuando la neoplasia ya se había desarrollado, no fue posible decidir con él, el problema planteado en esta Tesis, es decir, si la inmunodepresión era un antecedente necesario de la leucemia; a lo sumo, se demostró la proposición recíproca, a saber, que una mayor inmunodepresión tardía se produjo en función de una mayor progresión leucémica.

Asimismo, en la propia cepa BALB/c cuando se estudió más detenidamente la inmunidad humoral en los animales infectados con PLLV-T₂, se comprobó que la inmunodepresión efectiva contra el antígeno de prueba comenzaba a revelarse sólo cuando el bazo alcanzaba un tamaño perceptible -es decir, cuando la leucemia se hacía evidente- aún cuando el antígeno hubiera sido inoculado en la fase preclínica de la

enfermedad. Si la inmunidad humoral cumpliera un papel como mecanismo de vigilancia inmunológica debería haberse esperado que ésta fuera deprimida por PLLV-T₂ en todas las cepas susceptibles y en una etapa previa al desarrollo de la leucemia ya que de no ser así, el deterioro de aquélla no podría considerarse un requisito universal o condición necesaria para el establecimiento del proceso neoplásico.

La utilización de ciclofosfamida (CY) en dos dosis diferentes que, por una parte, deprimen la inmunidad humoral (300mg/Kg) y por otra, estimulan la respuesta celular sin afectar la humoral (20mg/Kg) ha confirmado los resultados anteriores. Dado que CY es un agente antineoplásico (32) que se emplea habitualmente para el tratamiento de la leucemia linfocítica, el mieloma múltiple y los linfomas (62), puede paracer en principio, difícil la interpretación de los datos ya que cualquier efecto deletéreo o potenciador sobre el sistema inmune podría ser oscurecido o atribuido respectivamente, a su acción antitumoral. Sin embargo, CY tiene un efecto de menor duración como agente antineoplásico que como agente inmunodepresor o inmunoestimulante y en este trabajo, la dosis y el tiempo de su administración se ajustaron para impedir que su acción contra las células leucémicas pudiera influir en los resultados. Estos revelaron que ratones BALB/c inoculados con una u otra dosis de CY, 3 días antes del desafío con diversas diluciones de PLLV-T₂, no evidenciaron una sobrevida significativamente diferente de la de los controles, sólo infectados con el

virus. Desde que, en estas condiciones, el deterioro o el incremento de uno u otro tipo de respuesta se extendía hasta los 10 días pi viral, puede inferirse que una alteración de la capacidad inmune poco después de la infección con PLLV-T₂ no modifica el curso de la leucemia ni propicia su aparición con aquellas dosis muy bajas de virus que son incapaces de producirla en condiciones normales. Si la vigilancia inmunológica fuera llevada a cabo por una respuesta humoral dependiente o independiente del timo, debería haberse esperado que los animales inoculados con 300mg/Kg de CY exhibieran un desarrollo leucémico mayor que los controles. A su vez, si la vigilancia fuera debida a una respuesta celular T debería haberse observado una progresión neoplásica menor en los animales inoculados con 20mg/Kg de CY. Adicionalmente, estos resultados también indican que la inmunidad contra el virus per se, tuvo poco efecto en la etapa inicial de la enfermedad ya que de haberla tenido, CY habría aumentado o reducido el número de partículas virales y por ende, acelerado o retardado la progresión leucémica. Teniendo en cuenta estos datos, la moderada aceleración de las leucemias de Friend y Rasucher obtenida en algunos trabajos (71, 138, 156) -pero, no en todos (127)- utilizando procedimientos inmunodepresores de larga duración de la inmunidad dependiente del timo, probablemente se haya debido a un deterioro de las reacciones inmunológicas que actúan -aunque no en forma suficiente- en una etapa clínica de la leucemia o a mecanismos alternativos relacionados con cambios en el número y propiedades de las células blanco para el virus (127).

Por lo tanto, todos los resultados de este trabajo tomados en conjunto no favorecen la idea de que una respuesta celular dependiente del timo o una respuesta humoral y, por ende, un mecanismo específico, actúen como un sistema de vigilancia inmunológica contra la leucemia PLLV-T₂ y por extensión, contra el tipo de leucemia casuado por los oncornavirus murinos rápidamente letales.

Este hecho no puede, sin duda, ser un argumento decisivo para negar la presencia de mecanismos específicos de vigilancia contra los tumores espontáneos en general. Sin embargo, de existir tales mecanismos, cabría esperar que como subproducto de ellos, algunas neoplasias experimentales fueran controlables por sistemas de vigilancia de este tipo. Dado que esto no ocurre -o a lo sumo, no ha sido comprobado- en la mayoría de los tumores experimentales y especialmente dado los resultados negativos obtenidos al respecto en este trabajo en un sistema de neoplasias virales que era uno de los que mejor parecía adecuarse a varios corolarios de la teoría, puede decirse que la idea de la existencia universal de formas de vigilancia específicas contra los tumores espontáneos, se ha debilitado considerablemente. En un terreno puramente especulativo, puede agregarse además, que de no existir en general un tipo específico de vigilancia, ello implicaría que la aparición de células neoplásicas antigénicas a lo largo de la vida de un individuo no sería un fenómeno habitual porque de serlo, la evolución del sistema in-

mune habría dado lugar a la fijación de un procedimiento que controlara el desarrollo clínico de los tumores. Pero, si no es un hecho común la aparición de células malignas antigénicas no parece haber razón alguna para suponer que lo sea el surgimiento de células tumorales no-antigénicas y por lo tanto, no habría tampoco motivo para que se hubiera elaborado en términos evolutivos un mecanismo inespecífico de vigilancia inmunológica contra las neoplasias espontáneas.

Si bien estos argumentos tienen una naturaleza exclusivamente teórica, están de acuerdo con ciertos datos muy recientes (116, 119, 135, 144) que parecen atenuar la importancia que se había conferido en principio, a algunos mecanismos inmunes alternativos para el control de tumores nacientes. Por ejemplo, si bien se atribuyen comúnmente funciones de vigilancia inespecífica a células tales como las "natural killer" (NK) o macrófagos, los ratones con la mutación "beige" que carecen de actividad NK (116) muestran un patrón de incidencia de enfermedades malignas comparable a su contraparte normal a excepción de los linfomas y la cepa C3H/HeJ que es una cepa genéticamente deficiente en macrófagos con actividad citotóxica antitumoral in vitro (119) tiene una susceptibilidad a los tumores espontáneos equivalente a la de las otras sublíneas de C3H con función macrofágica normal (135).

Si no existiera en la mayoría de los casos, un modo de prevenir a través del sistema inmune la aparición de los tumores espontáneos -cosa que no puede aún saberse

con certeza- ello no significaría de todos modos, que el problema del cancer no pudiera ser abordado inmunológicamente. Sin embargo, las expectativas de curación parecerían de este modo, menos favorables porque no se trataría ya de "normalizar" una falla del sistema inmunológico (como postulaba la teoría de la vigilancia) sino de potenciarlo hasta límites desconocidos y quizá, no fisiológicos. De hecho, en el tratamiento del cancer humano, salvo en tumores superficiales, los procedimientos inmunostimulantes no han encontrado hasta hoy, resultados satisfactorios y en los pocos casos en que ello ha ocurrido, el fenómeno no ha podido ser reproducido como para que pueda otorgársele una razonable confiabilidad.

A la luz de todos los datos anteriores, si bien no parece prudente negarle posibilidades futuras al tratamiento inmunológico del cancer (65) sería apropiado reflexionar sobre dos hechos a veces olvidados: 1) que la antigenicidad no sólo no es una característica definitiva de la célula cancerosa sino que a diferencia de los tumores experimentales inducidos por cancerígenos químicos y virales (7, 80, 95), muchos tumores espontáneos (68, 69, 79, 94) aunque no todos (90, 163) carecen de antigenicidad o inmunogenicidad detectable in vivo; 2) que el sistema inmunológico no es necesariamente el único elemento de un organismo que puede condicionar el crecimiento maligno (el sistema hormonal, el estado nutricional, etc. son algunos ejemplos de lo contrario) (142).

Si como parece razonable, una neoplasia e inclu-

so una célula neoplásica no pueden ser entendidas por la comprensión de un solo elemento -célula per se, huésped per se- sino por la relación de ambos, parece un camino fecundo analizar junto con el inmunológico otros factores del organismo que condicionen el desarrollo tumoral. Estas investigaciones, asociadas a aquéllas realizadas sobre la naturaleza molecular de la pérdida del control de la división celular, probablemente a corto a mediano plazo, proporcionarán la solución del problema del cancer.

D. RESUMEN

La teoría de la vigilancia inmunológica ha ejercido una gran influencia en los estudios destinados a comprender la naturaleza de los procesos malignos. Según esta teoría, las células neoplásicas surgen habitualmente en el organismo portando neo-antígenos que el sistema inmunológico del huésped reconoce como no-propios, promoviéndose en consecuencia, una respuesta que destruye tales células antes de que se establezcan como un tumor clínico. Si bien en la forma propuesta por Burnet, esto es, vigilancia llevada a cabo por linfocitos T, dependientes del timo, la teoría parece aplicarse sólo a casos muy restringidos, ello no significa que otros mecanismos específicos o inespecíficos no puedan ser operativamente más importantes.

En esta Tesis se ha evaluado la posible existencia de un sistema de vigilancia inmunológica en las neoplasias producidas por los oncornavirus murinos altamente patógenos, tomando como modelo el virus leucemógeno PLLV-T₂.

El plan de la investigación consistió en analizar en este sistema viral, dos predicciones esenciales de la teoría, a saber: 1°) que el agente oncogénico debe deprimir la respuesta inmune del huésped como medio para disminuir la vigilancia inmunológica; 2°) que agentes inmunodepresores o inmunoestimuladores deben facilitar o dificultar respectivamente la aparición de la leucemia.

Los resultados de este trabajo revelaron en

primer lugar, que la inmunidad celular dependiente del timo, medida in vivo como reacción de rechazo de tejido alógeno o reacción de injerto contra huésped no fue afectada por PLLV-T₂ en un período temprano de esta leucemia viral, lo cual sugiere que aquélla no cumpliría un papel importante como mecanismo de vigilancia en este sistema.

En lo que respecta a la inmunidad humoral, el PLLV-T₂ produjo un profundo deterioro de la respuesta a glóbulos rojos de carnero (GRC) y un efecto más moderado sobre la respuesta a lipopolisacáridos (LPS) en la cepa BALB/c. No obstante, se demostró que este fenómeno no era universal ya que no sólo no había una relación directamente proporcional entre la inmunodepresión temprana a GRC y la leucemogénesis en distintas cepas de ratones sino que había algunas, -como la DBA/2- que teniendo una susceptibilidad a los efectos oncogénicos de PLLV-T₂ comparable a la de la cepa BALB/c no evidenciaron una respuesta inmune deteriorada en una etapa temprana del desarrollo leucémico. Asimismo, en la propia cepa BALB/c cuando se estudió más detenidamente la inmunidad humoral en los animales infectados con PLLV-T₂, se comprobó que la inmunodepresión efectiva contra el antígeno de prueba comenzaba a revelarse sólo cuando el bazo alcanzaba un tamaño perceptible -es decir, cuando la leucemia se hacía evidente- aún cuando el antígeno hubiera sido inoculado en la fase pre-clínica de la enfermedad. Por último, la utilización de ciclofosfamida (CY), tres días antes del desafío viral en una dosis que deprimía la inmunidad humoral (300mg/Kg) y en otra que aumentaba la inmunidad celular (20mg/Kg) no modificó el cur

so de la leucemia provocada por PLLV-T₂ en un rango que abarcaba desde la dilución 10⁻¹ a la 10⁻⁷.

Todos estos resultados muestran que en la leucemia provocada por PLLV-T₂ y por extensión en las neoplasias causadas por los restantes oncornavirus altamente patógenos, no sería necesario un componente de inmunodepresión como condición previa para el desarrollo de la enfermedad.



Dr. CHRISTIANE DOSNE PASQUALINI
JEFE SECCION LEUCEMIA EXPERIMENTAL



LICENCIADO RAÚL A. RUGGIERO

E. BIBLIOGRAFIA

BIBLOGRAFIA

1. Alexander P: Surveillance against neoplastic cells- Is it mediated by macrophages?. Br J Cancer 33: 345, 1976.
2. Anderson DD, Beckmann RP, Harms EH, Nakamura K, Weber MJ: Biological properties of "partial" transformation mutants of Rous Sarcoma Virus and characterization of their pp60^{src} kinase. J Virology 37: 445, 1981.
3. Askenase PW, Hayden BJ, Gershon RK: Augmentation of delayed-type hypersensitivity of doses of Cyclophosphamide which do not affect antibody responses. J Exp Med 141: 697, 1975.
4. Balouet G, Poder M: A proposal for classification of normal and neoplastic types of blood cells in molluscs. En: Advances in Comparative Leukemia Research 1979. Ed DS Yohn, BA Lapin y JR Blakeslee. Elsevier North Holland Amsterdam: 1980, pp 205.
5. Barbacid M, Breitman ML, Lauver AV, Long LK, Vogt PK: The transformation-specific proteins of avian (Fujinami and PRC-II) and feline (Snyder-Theilen and Gardner-Arnstein) sarcoma viruses are immunologically related. Virology 110: 411, 1981.
6. Basombrío MA, Genovese J: Bioensayo de neutralización para el virus de leucemia de Friend. Medicina (Bs Aires) 38: 245, 1978.
7. Benacerraf B, Unanue ER: Tumor Immunology. Textbook of Immunology. The Williams y Wilkins Company, Baltimore, 1979, p 196.
8. Bendinelli M: Haemolytic plaque formation by mouse peritoneal cells and the effect on it of Friend Virus Infection. Immunol 14: 837, 1968.
9. Beng H, Clariez M, Jockusch BM, Graf T: Differential expression of Rous sarcoma virus-specific transformation parameters in enucleated cells. Cell 14: 843, 1978.
10. Bennett M, Steeves RA: Immunocompetent cell functions

in mice infected with Friend leukemia virus. J Natl Cancer Inst 44: 1107, 1970.

11. Berenson JR, Einstein AB Jr, Fefer A: Syngeneic adoptive immunotherapy and chemoimmunotherapy of a Friend leukemia: requirement for T cells. J Immunol 115: 234, 1975.
12. Bishop MS: The Molecular Biology of RNA tumor viruses: A physician's guide. Basic science for clinicians. N Engl J Med 303: 675, 1980.
13. Bondía M: Fisiopatología del crecimiento y desarrollo morfogénico. En: Patología General. Toray SA, Barcelona, 1965, p 293.
14. Burnet FM: Immunological aspects of malignant disease. Lancet 1: 1171, 1967.
15. Burnet FM: Impression and comments. En Immune Surveillance. Ed Richard T Smith-Maurice Landy. Academic Press, New York, 1970, p 512.
16. Byers VS, Baldwin RW: Inmunología de los tumores. En Inmunología Clínica. Ed HH Fudenberg, DP Stites, JL Caldwell, JV Wells. El Manual Moderno SA, México, 1980, p 316.
17. Cairns J: El problema del cancer. Investigación y Ciencia 1: 88, 1976.
18. Cairns J: Cancer: Science and Society. WH Freeman & Co, San Francisco, USA, 1978.
19. Callahan RM, Marx PA, Marum WG, Wheelock EF: Effect of serum from mice with dormant Friend leukemia viral infections on synthesis and modulation of erythroleukemia cell surface gp70. J Immunol 125: 616, 1980.
20. Capalbo EE, Correa JE, Lema AE, Bonaparte YP: Cellular events in gross splenomegaly induced by PLLV-T₂ murine leukemia virus. XVI Congress International Society of Hematology, Montreal, Canadá, 1980.
21. Carter RL, Chesterman FC, Rowson KEK, Salaman MH, Wedderburn N: A new virus of minimal pathogenicity associated

- with Friend virus. II Histological changes and immunodepressive effect. *Int J Cancer* 5: 103, 1970.
22. Casas J, Salmerón O, Zarco O: Concepto de la Patología General. En *Patología General*. Toray SA Barcelona, 1965, p 5.
 23. Ceglowski WS, Campbell BP, Friedman H: Immunosuppression by leukemia viruses. XI. Effect of Friend leukemia virus on humoral immune competence of leukemia-resistant C57BL/6 mice. *J Immunol* 114: 231, 1975.
 24. Ceglowski WS, Friedman H: Immunosuppression by leukemia virus. I. Effect of Friend Disease Virus on Cellular and Humoral Hemolysin Responses of Mice to a Primary Immunization with Sheep Erythrocytes. *J Immunol* 101: 594, 1968.
 25. Ceglowski WS, Friedman H: Immunosuppressive effects of Friend and Rauscher leukemia disease viruses on cellular and humoral antibody formation. *J Natl Cancer Inst* 40: 983, 1968.
 26. Ceglowski WS, Friedman H: Immunosuppression by leukemia virus. III. Adoptive transfer of antibody-forming cells to Friend Disease virus-infected mice. *J Immunol* 103: 460, 1969.
 27. Ceglowski WS, Friedman H: Murine virus leukaemogenesis Relationship between susceptibility and immunodepression. *Nature* 224: 1318, 1969.
 28. Cerny J, McAlack RK, Ceglowski WS, Friedman H: Divergence between immunosuppression and immunocompetence during virus-induced leukaemogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 68: 1862, 1971.
 29. Cheever MA, Greenberg PD, Fefer A: Tumor neutralization, immunotherapy and chemoimmunotherapy of a Friend leukemia with cells secondarily sensitized in vitro: II. Comparison of cells cultured with and without tumor to noncultured immune cells. *J Immunol* 121: 2220, 1978.
 30. Chirigos MA, Perk T, Tumer W, Burka B, Gomez M: Increased oncogenicity of the murine sarcoma virus (Moloney)

- by coinfection with murine leukemia virus. Cancer Res 28: 1055, 1968.
31. Chow DA, Greene MI, Greenberg AH: Macrophage-dependent, NK-cell independent "natural" surveillance of tumors in syngeneic mice. Int J Cancer 23: 788, 1979.
 32. Colvin M, Brundrett RB, Kan MN, Jardine I, Fenselau C: Alkylating properties of phosphoramidate mustard. Cancer Res 36: 1121, 1976.
 33. Correa JE: comunicación personal.
 34. Correa JE, Basombrío MA, Pasqualini CD: Murine leukemia induced by ultrafiltrates negative for XC plaque activity. Arch Geschwulstforsch 46: 555, 1976.
 35. Correa JE, Lema AE, Pasqualini CD: Esplenomegalia como parámetro para la titulación del virus leucémico PLLV-T₂ en ratones BALB. VIII Congreso Latinoamericano de Microbiología, 1977, resúmenes p 247.
 36. Correa JE, Tkaczewski LZ, Colmerauer MEM, Pasqualini C D: Murine leukemogenic effect of smaller than conventional C type particles. Medicina (Bs Aires) 36: 29, 1976.
 37. Costa J, Howley PM, Bowling MC, Howard R, Bauer WC: Presence of human papilloma viral antigens in juvenile multiple laryngeal papilloma. Am J Clin Pathol 75: 194, 1981.
 38. Dawe CJ: Rapporteur's resumé and comments on session on leukemias and related diseases in Poikilotherms. En Advances in Comparative Leukemia Research 1979. Ed: DS Yohn, BA Lapin, JR Blakeslee. Elsevier North Holland Amsterdam, 1980, p 193.
 39. Deinhardt F: Biology of primate retroviruses. En Viral Oncology, Raven Press, New York, 1980, p 357.
 40. Dent PB: Immunodepression by oncogenic viruses. Prog Med Virol 14: 1, 1972.
 41. Deodhar SD, Chiang T: Immunosuppression with Friend virus in allogeneic murine tumor system. Fed Proc 29:560, 1970.

42. Domeyer BE, Sladek NE: Kinetics of Cyclophosphamide biotransformation in vivo. *Cancer Res* 40: 174, 1980.
43. Dracott BN, Wedderburn N, Doenhoeff MJ: The immunodepressive effect of Friend virus. III. Effects on spleen T cells. *Immunology* 33: 573, 1977.
44. Dracott BN, Wedderburn N, Doenhoeff MJ: The immunodepressive effect of Friend virus. IV. Effects on spleen B lymphocytes. *Immunol* 34: 679, 1978.
45. Duesberg PH, Vogt PK, Bister K, Troxler D, Scolnik EM: Oncogenic (onc) genes of sarcoma, leukemia and carcinoma viruses. En *Oncogenic Viruses and Host Cell Genes*, Academic Press, New York, 1979, p 95.
46. Dulbecco R: La biologie du cancer. *La Recherche* 10: 434, 1979.
47. Dulbecco R: Contributions of microbiology to eucaryotic cell biology. *New directions for microbiology. Microbiol Rev* 43: 443, 1979.
48. Elkins WL: Cellular immunology and the pathogenesis of Graftversus Host reactions. *Prog Allergy* 15: 78, 1971.
49. Essex M: Immunity to leukemia, lymphoma and fibrosarcoma in cats: a case for immunosurveillance. En *Contemporary Topics in Immunobiology*. Vol 6. Plenum Press, New York, 1977, p 71.
50. Feunten J: La cancérogenese virale. *La Recherche* 11: 1386, 1980.
51. Flickinger JT, Gentile JM: Effects of Friend leukemia virus on the immune response of mice to bacterial antigens. *Can J Microbiol* 16: 741, 1970.
52. Friedman H, Ceglowski WS: Cellular immunity and leukemia virus infection. En *Virus, Tumorigenesis and Immunogenesis*. (Eds) WS Ceglowski, H Friedman. Academic Press New York, 1973, p 299.
53. Friedman H, Specter S: Interaction of leukemia viruses with cells of the Immune Response System. *Transplanta*

tion Proc 11: 1060, 1979.

54. Gateff E: Hematopoietic malignancies of genetic origin in *Drosophila Melanogaster*. En *Advances in Comparative Leukemia Research 1979*. (Eds) DS Yohn, BA Lapin, JR Blakeslee. Elsevier North Holland Amsterdam, 1980, p 231.
55. Genovesi EY, Marx PA, Wheelock EF: Susceptibility of Friend virus antigen- modulated erythroleukemic cells to lysis by T lymphocytes from mice with dormant Friend virus infections. *J Immunol* 122: 795, 1979.
56. Götze D: The major histocompatibility complex. En *Fundamentals of Immunology*. (Eds) OG Bier, W Dias da Silva, D Götze, I Mota. Springer-Verlag, New York, 1981, p 131.
57. Grant J: Immunological methods in bacteriology. En *Handbook of Experimental Immunology 3. Application of Immunological Methods*. (Ed) DM Weir. Blackwell Scientific Publications, Victoria, Australia, 1978, p 39.
58. Greenberg AH, Greene M: Non-adaptive rejection of small tumor inocula as a model of immune surveillance. *Nature* 264: 356, 1976.
59. Gross L: The Friend Virus. En *Oncogenic Viruses*. Pergamon Press, 1970, p 553.
60. Habu S, Fukui H, Shimamura K, Kasai M, Nagai Y, Okumura K, Tamaoki N: In vivo effects of anti-asialo GM₁. I. Reduction of NK activity and enhancement of transplanted tumor growth in nude mice. *J Immunol* 127: 34, 1981.
61. Hanna MG Jr, Walburg HE Jr, Tyndall RL, Snodgrass MJ: Histoproliferative effect of Rauscher leukemia virus on lymphatic tissue. II. Antigen-stimulated Germfree and Conventional BALB/c mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 134: 1132, 1970.
62. Havas FH, Schiffman G: Effect of Cyclophosphamide on the Immune response of BALB/c mice bearing an Immunoglobulin M Plasmacytoma (TEPC-183). *Cancer Res* 41:801, 1981.

63. Häyry P, Rago D, Defendi V: Inhibition of phytohemagglutinin and allo-antigen induced lymphocyte stimulation by Rauscher leukemia virus. J Natl Cancer Inst 44: 1311, 1970.
64. Hellström KE, Helström I: Immunologic enhancement of tumor growth. En Mechanisms of tumor immunity. (Eds) Green I, Cohen S, Mc Cluskey R, New York, 1977, p 147.
65. Herberman RB: Existence of Tumor Immunity in Man. En Mechanisms of Tumor Immunity. (Eds) Green I, Cohen S, Mc Cluskey RT. New York, 1977, p 181.
66. Herberman RB, Holden HT: Natural cell-mediated immunity. En Advances in Cancer Res 27: 305, 1978.
67. Herberman RB, Ortaldo JR: Natural Killer Cells: Their role in defenses against malignant disease. Science 214: 24, 1981.
68. Hewitt HB: The Choice of Animal Tumors for Experimental Studies of Cancer Therapy. Advances in Cancer Research 27: 149, 1978.
69. Hewitt HB, Blake ER, Walder AS: A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin. Br J Cancer 33: 241, 1976.
70. Hill M, Hillova J: Genetic transformation of animal cells with viral DNA of RNA tumor viruses. Adv Cancer Research 23: 237, 1976.
71. Hirsch MS, Murphy FA: Effects of anti-thymocyte serum on Rauscher virus infection of mice. Nature 218: 478, 1968.
72. Howard RJ, Notkins AL, Mergenhagen SE: Inhibition of cellular immune reactions in mice infected with Lactic dehydrogenase virus. Nature 221: 873, 1969.
73. Isaak DD, Price JA, Reinisch CL, Cerny J: Target cell heterogeneity in murine leukemia virus infection. I. Differences in susceptibility to infection with Friend leukemia virus between B lymphocytes from spleen, bone marrow and lymph nodes. J Immunol 123: 1822, 1979.

74. Kateley JR, Kamo I, Kaplan G, Friedman H: Supressive effect of leukemia virus-infected lymphoid cells on in vitro immunization of normal splenocytes. J Natl Cancer Inst 53: 1371, 1974.
75. Kaye AM: A study of the relationship between the rate of ethyl carbamate (urethan) catabolism and urethan carcinogenesis. Cancer Res 20: 237, 1960.
76. Kaye AM, Trainin N: Urethan carcinogenesis and nucleic acid metabolism: factors influencing lung adenoma induction. Cancer Res 26: 2206, 1966.
77. Keats D: Immunosurveillance and cancer. Lancet 2: 710, 1970.
78. Kelly MG, O'Gara RW: Induction of tumors in newborn mice with dibenzanthracene and methylcholantrene. J Natl Cancer Inst 26: 651, 1961.
79. Klein G: Immune and non-immune control of neoplastic development: contrasting effects of host and tumor evolution. En Accomplishments in Cancer Research, 1979, Prize Year, General Motors Cancer Research Foundation. (Eds) Rhoads JE, Fortner JJ, Lippincott JB, Co, Philadelphia, 1980, p 123.
80. Klein G, Klein E: Rejeatability of virus-induced tumors and non-rejeatability of spontaneous tumors: A lesson in contrasts. Transplantation Proc 9: 1095, 1977.
81. Kline I, Levi IS, Shkodinska YN, Belousova AK, Lagova ND: Drugs included in the Joint Research Program of the United States and Soviet Union. En Experimental Evidence of Antitumor Drugs in the USA and USSR. (Eds) USA: A Goldin, I Kline. USSR: ZP Sofina, AB Syrkin. National Cancer Institute, 1980, p 5.
82. Kline I, Platonova GN: Methods of selecting antitumor drugs in the United States and Soviet Union. En experimental evidence of antitumor drugs in the USA and USSR and clinical correlations. (Eds) USA: A Goldin, I Kline, USSR: ZP Sofina, AB Syrkin. National Cancer Institute, 1980, p 111.

83. Lattime EC, Pecoraro GA, Stutman O: Natural cytotoxic cells against solid tumors in mice. III. A comparison of effectors cell antigenic phenotype and target cell recognition structures with those of NK cells. J Immunol 126: 2011, 1981.
84. Levy MH, Wheelock EF: Impaired macrophage function in Friend virus leukemia: restoration by statolon. J Immunol 114: 962, 1975.
85. Maugh II TH, Marx JL: Seeds of destruction. Plenum Press, New York, 1975, p 3.
86. Ménard S, Colnaghi MI, Della Porta G: Natural anti-tumor serum reactivity in BALB/c mice. I. Characterization and interference with tumor growth. Int J Cancer 19: 267, 1977.
87. McCoy JL, Fefer A, Ting RC, Glynn JP: The development of Specific Cellular and Humoral Immunity in mice infected with Rauscher Leukemia Virus as Neonates or Adults. Cancer Res 32: 1671, 1972.
88. Macmillian JR, Landolt M, Mulcahy D: An Erythroleukemic like disease in fish. En Advances in Comparative Leukemia Research 1979 (Eds) DS Yohn, BA Lapin, JR Blakeslee. Elsevier North Holland, Amsterdam, 1980, p 219.
89. Millian SJ, Schaeffer M: Antibody production by mice infected with selected murine oncogenic agents. Cancer 21: 989, 1968.
90. Morgan AC Jr, Galloway DR, Imai K, Reisfeld RA: Human melanoma-associated antigens: role of carbohydrate in shedding and cell surface expression. J Immunol 126: 365, 1981.
91. Mortensen RF, Ceglowski WS, Friedman H: In vitro assessment of cellular immunity to Rauscher leukemia virus. J Immunol 111: 657, 1973.
92. Mortensen RF, Ceglowski WS, Friedman H: Leukemia virus-induced immunosuppression. X. Depression of T cell-mediated cytotoxicity after infection of mice with Friend leukemia virus. J Immunol 112: 2077, 1974.

93. Murphy JB, Sturm E: J Exp Med 38: 183, 1926 (citado por Stutman O: Immunodepression and malignancy. Advances in Cancer Research 21: 261, 1975.
94. Nossal GJV: The case history of Mr TI Terminal patient or still curable?. Immunology Today 1: 5, 1980.
95. Old LJ: Inmunología del cancer. Investigación y ciencia 10: 42, 1977.
96. Old LJ, Boyse EA, Stockert E: Typing of mouse leukemias by serological methods. Nature 201: 777, 1964.
97. Old LJ, Clarke DA, Benacerraf B, Goldsmith M: The reticuloendothelial system and the neoplastic process. Ann NY Acad Sci 88: 264, 1960.
98. Opperman H, Levinson A, Varmus H: The structure and protein activity of proteins encoded by non conditional mutants and back mutants in the src gene of Avian Sarcoma Viruses. Virology 108: 47, 1981.
99. Parker RE: Estadística para Biólogos. Ediciones Omega SA, Barcelona, 1976.
100. Parmiani G, Colnaghi MI, Della Porta G: Immunodepression during urethane and N-Nitrosomethylurea leukemogenesis in mice. Brit J Cancer 25: 354, 1971.
101. Pasqualini CD, Di Girolamo MTV, Segal A, Laguens RP: Reacción cruzada entre el virus de Gross y anticuerpos séricos de pacientes con leucemia aguda y enfermedad de Hodgkin. Medicina (Bs Aires) 39: 741, 1979.
102. Pasqualini CD, Laguens RP, Colmerauer MEM, Segal A: Por qué crece un tumor?. Medicina (Bs Aires) 34: 659, 1974.
103. Pearson GR, Redmon LW, Bass LR: Protective effect of immune sera against transplantable Moloney virus-induced sarcoma and lymphoma. Cancer Res 33: 171, 1973.
104. Perryman LE, Hoover EA, Yohn DS: Immunologic reactivity of the cat: Immunosuppression in Experimental Feline Leukemia. J Natl Cancer Inst 49: 1357, 1972.

105. Peto R, Roe FJ, Lee PN, Levy L, Clack J: Cancer and aging in mice and men. *Br J Cancer* 32: 411, 1975.
106. Pitot HC: *Fundamentals of Oncology*. Marcel Dekker inc New York, 1978.
107. Pitot HC, Heidelberger C: Metabolic Regulatory Circuits and Carcinogenesis. *Cancer Res* 23: 1695, 1963.
108. Pizzo PA, Chattopadhyay SK, Magrath IT, Del Giacco E, Sherrick D, Gray T: Examination of Epstein-Barr Virus and C-Type proviral sequences in American and African Lymphomas and derivative cell lines. *Cancer Res* 41: 3165, 1981.
109. Pizzo PA, Magrath IT, Jay G: Characterization of the Epstein-Barr Virus isolated from a Cell Line derived from a patient with American Burkitt's Lymphoma. *Cancer Res* 41: 3161, 1981.
110. Precerutti A, Law LW: Isolation of a murine leukemogenic virus, PLLV. *Nature* 198: 801, 1963.
111. Prehn RT: Function of depressed immunologic reactivity during carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 31: 791, 1963.
112. Prehn RT: A clonal selection theory of chemical carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 32: 1, 1964.
113. Rabasa SL: El crecimiento tumoral: sarcoma E100. *Medicina (Bs Aires)* 41 (Supl): 196, 1981.
114. Reynolds CW, Timonen T, Herberman RB: Natural Killer (NK) cell activity in the rat. I. Isolation and characterization of the effector cells. *J Immunol* 127: 282, 1981.
115. Ristow S, McKhann Ch F: Tumor-Associated Antigens. *En: Mechanisms of Tumor Immunity*. (Eds) I Green, S Cohen, RT Mc Cluskey. New York, 1977, p 109.
116. Roder J, Duwe A: The beige mutation in the mouse selectively impairs natural killer cell function. *Nature* 278: 451, 1979.

117. Rowe WP, Brodsky I: A graded-response assay for the Friend-Leukemia Virus. J Natl Cancer Inst 23: 1239, 1959.
118. Rowson KEK, Parr IB: A new virus of minimal pathogenicity associated with Friend virus. Isolation by end-point dilution. Int J Cancer 5: 96, 1970.
119. Ruco LP, Meltzer MS: Defective tumoricidal capacity of macrophages from C3H/HeJ mice. J Immunol 120: 329, 1978.
120. Ruggiero RA, Carrizo D, Correa JE, Pasqualini CD: Propiedades biofísicas y biológicas de un retrovirus inductor de una leucemia murina. Medicina (Bs Aires) 41(Supl):207, 1981.
121. Salaman MH, Wedderburn N: The immunodepressive effect of Friend virus. Immunol 10: 445, 1966.
122. Sandford BH, Kohn HI, Daly JJ, Soo SF: Longterm spontaneous tumor incidence in neonatally thymectomized mice. J Immunol 110: 1437, 1973.
123. Schäfer W, Bolognesi DP: Mammalian C-Type Oncornavirus: Relationships between Viral Structural and Cell-Surface Antigens and their possible significance in immunological defense mechanisms. En Contemporary Topics in Immunology. Vol 6. Plenum Press, New York, 1977, p 127.
124. Shih TY, Scolnick EM: Molecular Biology of mammalian Sarcoma Virus. Viral Oncology. (Ed) G Klein. Raven Press, New York, 1980, p 135.
125. Shin HS, Johnson RJ, Pasternak GR, Economu JS: Mechanisms of tumor immunity: The role of antibody and non immune effectors. Prog Allergy 25: 163, 1978.
126. Siegel BV, Morton JI: Depressed antibody response in the mouse infected with Rauscher leukemia virus. Immunol 10: 559, 1966.
127. Siegel BV, Morton JI: Rauscher viral leukemogenesis in BALB/c mice treated with rabbit antimouse thymocyte serum. J Natl Cancer Inst 44: 573, 1970.

128. Siegel BY, Morton JI: Immunologic stimuli in relation to leukemogenesis: The hematopoietic stem cell as target cell for Rauscher leukemia virus. En Virus, Tumorigenesis and Immunogenesis. (Eds) WS Ceglowski, H Friedman. Academic Press, New York, 1973, p 271.
129. Simpson E, Nehlsen SL: Prolonged administration of antithymocyte serum in mice. II. Histopathological investigation. Clin Exp Immunol 9: 79, 1971.
130. Sonstegard RA: Virus associated hematopoietic neoplasia in shell-fish and fish. En Advances in Comparative Leukemia Research 1979. (Eds) DS Yohn, BA Lapin, JR Blakeslee. Elsevier North Holland, Amsterdam, 1980, p 227.
131. Stutman O: Immunodepression and malignancy. En Advances in Cancer Research 21: 261, 1975.
132. Stutman O: Immunodeficiency and Cancer. En Mechanisms of Tumor Immunity. (Eds) J Green, S Cohen, R Mc Cluskey. New York, 1977, p 27.
133. Stutman O: Immunologic Surveillance. En Origins of Human Cancer. (Ed) Cold Spring Harbor Laboratory, 1977, p 729.
134. Stutman O: Spontaneous, viral and chemically induced tumors in the nude mouse. En The nude mouse in experimental and clinical research. Academic Press, New York, 1978, p 411.
135. Stutman O: Immunological surveillance and cancer. En The Handbook of Cancer Immunology. Vol 7. Immune function and dysfunction in relation to cancer. (Ed) H Waters, National Institutes of Health, Garland STPM Press, New York, 1980, p 1.
136. Stutman O: Some thoughts on tumor immunology and immunotherapy. En Proc Immunology and the Eye: Workshop I (Eds) GM Steinberg, Y Gery, R Nussenblatt, New York, 1980, p 179.
137. Stutman O: NK cells, anti-tumor surveillance and interleukins. Immunology-Today 17: 205, 1981.

138. Stutman O, Dupuy JM: Resistance to Friend leukemia virus in mice: effect of immunosuppression. J Natl Cancer Inst 49: 1283, 1972.
139. Stutman O, Paige CJ, Figarella EF: Natural cytotoxic cells against solid tumor in mice. J Immunol 121: 1819, 1978.
140. Sung JL, Chen DS, Lin WS: Hepatocellular carcinoma and Hepatitis B virus. Excerpta Med Int Congr Ser 502(part1): 631, 1980.
141. Suntzeff V, Carruthers C, Cowdry EV: The role of sebaceous glands and hair follicles in epidermal carcinogenesis. Cancer Res 7: 439, 1947.
142. Süß R, Kinzel V, Scribner JD: Cancer Experiments and Concepts. Springer-Verlag, New York, 1973.
143. Taffet SM, Russell SW: Macrophage-mediated tumor cell killing. Regulation of expression of cytolytic activity by prostaglandin E. J Immunol 126: 424, 1981.
144. Talmadge JE, Meyers KM, Prieur DJ, Starkey JR: Role of NK cells in tumor growth and metastasis in beige mice. Nature 284: 622, 1980.
145. Tambourin PE, Wendling F, Jasmin C, Smadja-Joffe F: The physiopathology of Friend Leukemia. Leukemia Res 3: 117, 1979.
146. Teller MN, Eilbert M: Aging and cancerigenesis. IV. Interrelationships among age, immune response and tumor incidence in several strains of mice. J Natl Cancer Inst 39: 231, 1967.
147. Teller MN, Stohr G, Curlett W, Kubisek ML, Curtis D: Aging and cancerigenesis. I. Immunity to tumor and skin grafts. J Natl Cancer Inst 33: 649, 1964.
148. Thomas L: Discussion. En Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. (Ed) HS Lawrence. Hoeber-Harper, New York, 1959, p 529.
149. Ting CC, Bushar GS, Rodrigues D, Herberman RB: Cell-mediated immunity to Friend virus-induced leukemia. I. Modifi-

- cation of ^{125}I UdR release cytotoxicity assay for use with suspension target cells. *J Immunol* 115: 1351, 1975.
150. Ting CC, Rodrigues D, Bushar GS, Herberman RB: Cell-mediated immunity to Friend virus-induced leukemia. II. Characteristics of primary cell-mediated cytotoxic response. *J Immunol* 116: 236, 1976.
 151. Tooze J: The RNA tumor viruses: morphology composition and classification. En *The Molecular Biology of tumor viruses*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1973, p 510.
 152. Tooze J: The cancer cell defined. En *Molecular Biology of Tumor Viruses. Part 2. DNA tumor virus*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1980, p 1.
 153. Toth B: A critical review of experiments in chemical carcinogenesis using newborn animals. *Cancer Res* 28: 727, 1968.
 154. Turk JL, Parker D: Further studies on B-Lymphocyte suppression in delayed hypersensitivity, indicating a possible mechanism for Jones-Mote hypersensitivity. *Immunol* 24: 751, 1973.
 155. Turk JL, Parker D, Poulter LW: Functional aspects of the selective depletion of Lymphoid tissue by cyclophosphamide. *Immunol* 23: 493, 1972.
 156. Varet B, Levy JP, Leclerc JC, Kourilsky FM: Effect of anti-thymocytic serum on viral leukemia, erythroblastosis and sarcoma in mice. *Int J Cancer* 7: 313, 1971.
 157. Vesselinovitch SD, Mihailovich N: Significance of newborn age and dose of urethan in leukemogenesis. *Cancer Res* 26: 1633, 1966.
 158. Walters MA: The induction of lung tumours by the infection of 9-10 dimethyl-1,2 benzathracene (DMBA) into newborn, suckling and young adult mice. A dose response study. *Brit J Cancer* 20: 148, 1966.
 159. Watson JD: *Biología molecular del gen*. Fondo educativo Interamericano. SA., 1974, p 545.
 160. Wedderburn N, Salaman MH: The immunodepressive effect of Friend Virus. II. Reduction of splenic haemolysin-producing cells in primary and secondary responses. *Immunol* 15:439, 1968.

161. Weston BJ: Effect of route of administration on immunosuppression by DMBA in CBA mice. *Nature* 215: 1497, 1967.
162. Wheelock EF, Weislow OS, Toy ST: Suppression of established Friend virus leukemia by statolon. VI. Mechanisms involved in production and maintenance of a dormant infection. *Virus, Tumorigenesis and Immunogenesis*. (Eds) WS Ceglowsky, H Friedman. Academic Press, New York, 1973, p 351.
163. Yeh MY, Hellström I, Brown JP, Warner GA, Hansen JA, Hellström KE: Cell surface antigens of human melanoma identified by monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci* 76: 2927, 1979.
164. Yoo TJ, Bennet M: Effect of Herpes simplex virus Type 2 and Friend Erythroleukemia virus infection of IgE antibody responses to Ascaris Antigen in mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 65: 235, 1981.
165. zur Hausen H: The Role of viruses in human tumors. *En Advances in Cancer Research* 33: 77, 1980.