

Centro de Inmunología Molecular

MODULACION DE LA TOLERANCIA DOMINANTE MEDIANTE INMUNOSUPRESION Y SU IMPACTO EN LA AUTOINMUNIDAD Y EL CANCER

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Médicas.

Autor: José Enrique Montero Casimiro
Doctor en Medicina
Especialista de Segundo Grado en Inmunología

Tutor: Agustín Lage Dávila
Doctor en Medicina
Especialista de Segundo Grado en Bioquímica
Doctor en Ciencias Médicas

**Ciudad de La Habana
2004**



Centro de Inmunología Molecular

MODULACION DE LA TOLERANCIA DOMINANTE MEDIANTE INMUNOSUPRESION Y SU IMPACTO EN LA AUTOINMUNIDAD Y EL CANCER

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Médicas.

Autor: José Enrique Montero Casimiro
Doctor en Medicina
Especialista de Segundo Grado en Inmunología

Tutor: Agustín Lage Dávila
Doctor en Medicina
Especialista de Segundo Grado en Bioquímica
Doctor en Ciencias Médicas

**Ciudad de La Habana
2004**

Exergo



“La ciencia contribuye al triunfo de las grandes ideas”.

Louis Pasteur

SINTESIS

La “Selección Clonal” como paradigma central de la inmunología postula la eliminación de linfocitos autorreactivos para explicar la tolerancia a los antígenos propios y la reactividad contra los foráneos. La “Tolerancia Dominante” (TD) ha emergido recientemente como paradigma alternativo, sustentado en la existencia de células T reguladoras (Treg) que controlan la autorreactividad fisiológica existente.

Este trabajo expone resultados experimentales y teóricos que captan precozmente las consecuencias de la TD para el tratamiento del cáncer y la autoinmunidad. Se encontró que manipulaciones de inmunosupresión, que eliminan transitoriamente las Treg, agravan la enfermedad autoinmune, contrariamente al dogma del beneficio de la inmunosupresión en la autoinmunidad. Asimismo se evaluó la inducción de inmunidad antitumoral mediante inmunosupresión en animales vacunados y no vacunados, evidenciando contra-intuitivamente un aumento de la respuesta a la vacunación consecuente con la depleción transitoria de linfocitos T. Los resultados obtenidos permiten en el plano teórico, proponer la primera definición operacional que estratifica los autoantígenos según su relevancia en la autoinmunidad natural. En el orden práctico conducen al concepto de “dependencia de esquema” en las vacunas de cáncer y al diseño de protocolos combinados de Vacuna+Inmunosupresión/Quimioterapia+Vacuna, que ya han sido introducidos en ensayos clínicos en curso.

Presentaciones previas del trabajo

La mayor parte de los resultados incluidos en este documento han servido en la formación de otros tesantes y han sido publicados y presentados en diferentes eventos o se encuentran en vías de realizarse. Además algunos de ellos han sido premiados en el movimiento de Forum de Ciencia y Técnica, la Academia de Ciencias de Cuba o instituciones extranjeras.

Presentaciones en eventos científicos

- III Congreso Nacional y V Jornada Latinoamericana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia. Palacio de las Convenciones, Habana, Cuba. Abr 22 - Abr 25, 1997. (Mesa Redonda y Cartel)
- Congreso Biotecnología Habana' 97. Aplicaciones Médicas de la Biotecnología. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Habana, Cuba. Dic 1 - Dic 6, 1997. (Presentación oral y Cartel)
- II Jornada Nacional de Inmunología. Centro de Inmunología Molecular, Habana, Cuba. Dic 8 -Dic 10, 1997. (Cartel)
- III International Workshop "Immunotherapy in the 90's - III": Moving basic science to the clinical setting. Centro de Inmunología Molecular, Habana, Cuba. Abr 20 - Abr 24, 1998. (Presentación oral)
- Workshop on Immunology and Emerging Diseases. Mishkenot Sha'ananim, Jerusalem, Israel. Jul 24 - Jul 31, 1998. (Presentación oral)
- I Congreso Nacional y III Jornada Nacional de la Sociedad Cubana de Inmunología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", Habana, Cuba. Dic 3 - Dic 5, 1998. (Cartel)
- Life Science 2000 Open Day, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel. Ene 4, 2000. (Cartel)

- IV International workshop “Immunotherapy for the New Century”: Moving basic Science to clinical setting. Centro de Inmunología Molecular, Habana, Cuba. Nov 20 - Nov 24, 2000. (Presentación oral)
- EAACI meeting “Basic Immunology in Allergy and Clinical Immunology”, Hotel Sunstar, Davos, Suiza. Feb 1 - Feb 4, 2001. (Cartel)
- Jornada de Autoinmunidad. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología y Centro de Investigaciones Biológicas, Habana, Cuba. Ene 18, 2002. (Presentación oral)
- 3rd International Congress on Autoimmunity, Palexpo Congress Center, Ginebra, Suiza. Feb 20 - Feb 24, 2002. (Presentación oral)
- Jornada 20 Aniversario del Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas, Habana, Cuba. Mar 27, 2002. (Cartel)
- V International workshop “Immunotherapy for the New Century”: Back and forth between basic science and clinical triáis. Hotel Palco, Habana, Cuba. Dic 5 - Dic 8, 2002. (Presentación oral)
- 6to Congreso Latinoamericano de Inmunología y el 3er Congreso Nacional de Inmunología, Palacio de las Convenciones, Habana, Cuba. Dic 9 - Dic 13, 2002. (Presentación oral y Cartel)
- VI Congreso Cubano de Reumatología. Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas, Habana, Cuba. Dic 11 - Dic 13, 2002. (Mesa Redonda)
- 3rd Annual Meeting Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS), La Maison de la Chimie, Paris, Francia. May 15 - May 19, 2003. (Cartel)
- Biotecnología Habana 2003. Aplicaciones Médicas de la Biotecnología. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Nov 23 - Nov 28, 2003. (Cartel)

- VII Congreso Cubano de Reumatología. Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas, Habana, Cuba. Dic 10 - Dic 12, 2003. (Presentación oral)
- 6th International Conference on New Trends in Clinical and Experimental Immunosuppression. Renaissance Salzburg Hotel, Salzburg, Austria. Feb 5 - Feb 8, 2004. (Presentación oral)

Conferencias directamente relacionadas con esta temática impartidas por invitación de instituciones extranjeras

- Instituto Gulbenkian de Ciencia, Oeiras, Portugal. May 25 - May 27, 2000.
- Institute for Biochemistry, Swiss Federal Institute of Technology, ETZ-Zentrum, Zurich, Suiza. Feb 4-Feb 5, 2001.

Tesis tuteladas o asesoradas relacionadas con esta temática

- Obtención de formulaciones de Anticuerpos Monoclonales de rata anti-CD4 y CD8 murinos para evaluación terapéutica *in vivo*. Trabajo de Terminación de Residencia en Inmunología. Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana. 1998.
- Modulación de la respuesta inmune frente a un preparado vacunal del EGF humano- recombinante inducida por inmunosupresión. Trabajo de Terminación de Residencia en Inmunología. Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana. 1998.

Publicaciones científicas internacionales

Artículos completos:

1. León K., Carneiro J., Perez R., Montero E., Lage A. Natural and induced tolerance in an immune network model. *Journal of Theoretical Biology* 193(3): 519-534, 1998.
2. Montero E., Amador J.F., Perez R., Lage A. Tumor-specific immunotherapy based on dominant models of natural tolerance. *Medical Hypotheses* 54(4): 531-536, 2000.

3. González G., Montero E., León K., Cohén I.R., Lage A. Autoimmunization to epidemial growth factor, a component of the immunological homunculus. *Autoimmunity Reviews* 1: 89-95, 2002.
4. Montero E., Nussbaum G., Kaye J.F., Perez R., Lage A., Ben-Nun A., Cohén I.R. Regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by CD4+, CD25+ and CD8+ T cells: Analysis using depleting antibodies. *Journal of Autoimmunity* 23(1): 1-7, 2004.
5. Montero E., Lage A., Perez R., León K. Potenciación de vacunas terapéuticas del cáncer mediante inmunosupresión. *Biotecnología Aplicada* 21 (2): 113-117, 2004.
6. García del Barco D., Montero E. Redundant regulatory mechanisms guarantee multiple steps for immunomodulation in Autoimmune Diseases. Lessons from experimentally induced autoimmune encephalomyelitis. *Biotecnología Aplicada*, 2004. (aceptada)
7. Montero E, Quintana F, Bousoleil I, et al. Antitumor immunoresponse following transient immunosuppression in Ehrlich Tumor, (en preparación)
8. Montero E, Quintana F, et al. Immunoresponse modulation against EGF vaccine induced by immunosuppression. (en preparación)

Reportes:

9. Montero E., Nussbaum G., Kaye J., Perez R., Lage A., Cohén I.R. T cell regulation during the induction phase of the immunoresponse against self-antigens. *Autoimmunity Reviews* 1(1-2): 21, 2002.
10. Montero E., Perez R., Cohén I.R., Lage A. Peripheral regulatory mechanisms in antitumor autoimmunity induced by an EGF-based cancer vaccine. *Clinical Immunology* 1: S40-S41, 2003.

Publicaciones científicas nacionales

Artículos completos:

11. Montero E., Lage A. Paradigma Cognitivo en Inmunología *Revista Cubana de Reumatología* IV(1): 27-36, 2002.

Reportes:

12. Montero E., Quintana F., Rojas A., Beausoleil I., Amador J.F., Perez R., Lage A. Tumor growth inhibition induced by immunosuppression. En: *Avances en Biotecnología Moderna*. Vol 4. Cuba: Elfos Scintiae, 1997: N 34. ISSN 1027-2860.
13. Montero E., Quintana F., Rojas A., Beausoleil I., Rengifo E., Amador J.F., Perez R., Lage A. Therapeutic manipulations of natural autoreactivity. *Biotecnología Aplicada* 15(4): 263-264, 1998.
14. León K., Carneiro J., Montero E., Perez R., Lage A. Dominant Tolerance in an Immune NetWork Model. *Biotecnología Aplicada* 15(4): 265, 1998.
15. León K., Carneiro J., Pérez R., Montero E., Lage A. Tolerancia Natural e Inducida en un Modelo de Red Immune. En: *Memorias Joven Ciencia'98*. Habana, Cuba 1998: B15. ISBN: 959-251-002-X
16. Montero E. Dominant tolerance in anti-tumor autoimmunity. *Biotecnología Aplicada* 19(3-4): 198, 2002.

Patentes

17. Montero J.E., Perez R., Lage A., inventors. Center of Molecular Immunology, assignee. Method for the treatment of malignant and infectious diseases. **OCPI: CU 286/2001, USPTO: 10/309,015**

Otras presentaciones en eventos científicos afines con esta temática

- 5th International Conference on New Trends in Immunosuppression, Hotel Intercontinental, Ginebra, Suiza. Feb 7 - Feb 10, 2002. (Cartel)

Otras publicaciones completas afines con esta temática

Temática Inmunosupresión

- Montero E., Falcon L., Morera Y., Delgado J., Amador J.F., Perez R. CD6 molecule may be important in the pathological mechanisms of lymphocytes adhesion to human skin in psoriasis and ior t1 MAb a possible new approach to treat this disease. *Autoimmunity* 29(2): 155-156, 1999.
- Morera Y., Delgado J., González L., Montero E., Tormo B., Barrionuevo C.D., Falcon L., Torres O. Estudio morfométrico comparativo del tratamiento con Calcipotriol y anticuerpo monoclonal ior ti tópico en pacientes psoriáticos. *Revista CENIC* 31(2): 121-127, 2000.

Temática Cáncer

- Bada A, Casaco A, Arteaga M, Martínez J, León A, Santana E, Hernández O, Orpher R, González A, Mesa C, Montero E, Fernandez LE. Toxicity of anti-GM3 cancer vaccine in Macaca fascicularis monkey. A 12-month study. *Human and Experimental Toxicology* 21(5): 263-267, 2002.

Otras patentes aplicadas afines con esta temática

- Montero J.E., Lombardero J., Perez R., Sierra P., Tormo B., inventors. Center of Molecular Immunology, assignee. Anti-CD6 monoclonal antibodies and their uses. PCT No. WO 97/19111. 1997 May 29. **OCPI: CU 1115/1999, USPTO: 6,572,857**

Reconocimientos nacionales recibidos asociados a la temática

- Moneda Conmemorativa 30 Aniversario de la Academia de Ciencias de Cuba a jóvenes investigadores. Academia de Ciencias de Cuba. Ciudad de La Habana, 3 Dic 1998.

- Sello Forjadores del Futuro. Brigadas Técnicas Juveniles. Ciudad de La Habana, 6 Dic 2001.
- Premio Nacional Anual de la Academia de Ciencias de Cuba. Academia de Ciencias de Cuba. Ciudad de La Habana, 15 Ene 2004.
- Premio Especial al Resultado de Mayor Impacto Científico. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Ciudad de La Habana, 27 Ene 2004.

Reconocimientos internacionales recibidos asociados a la temática

- Premio para Asistencia a Evento Internacional concedido por la EAACI (European Academy of Allergology and Clinical Immunology). Evento: Basic Immunology in Allergy and Clinical Immunology, Hotel Sunstar, Davos, Suiza. Feb 1 - Feb 4, 2001.
- Beca para Asistencia a Evento Internacional concedido por el comité organizador del 3rd International Congress on Autoimmunity. Evento: 3rd International Congress on Autoimmunity, Palexpo Congress Center, Ginebra, Suiza. Feb 20 - Feb 24, 2002.
- Beca para Asistencia a Evento Internacional concedido por el Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones, el Instituto Gulbenkian de Ciencia y la EMBO (European Molecular Biology Organization). Evento: Workshop on Molecular and Genetic Basis of Autoimmune Diseases: SLE and RA, Fundação Calouste Gulbenkian Building, Lisboa, Portugal. Abr 7 - Abr 9, 2003.

Premios del Forum de Ciencia y Técnica relacionados con la temática

- XII Forum de Ciencia y Técnica: Natural y Induced Tolerance in an Immune Network Model. Ciudad de La Habana, Nov 15, 1997. (Relevante)
- Joven Ciencia '98: Tolerancia Natural e inducida en un Modelo Matemático de la Red Inmune. Ciudad de La Habana, Feb 7, 1998. (Premio)

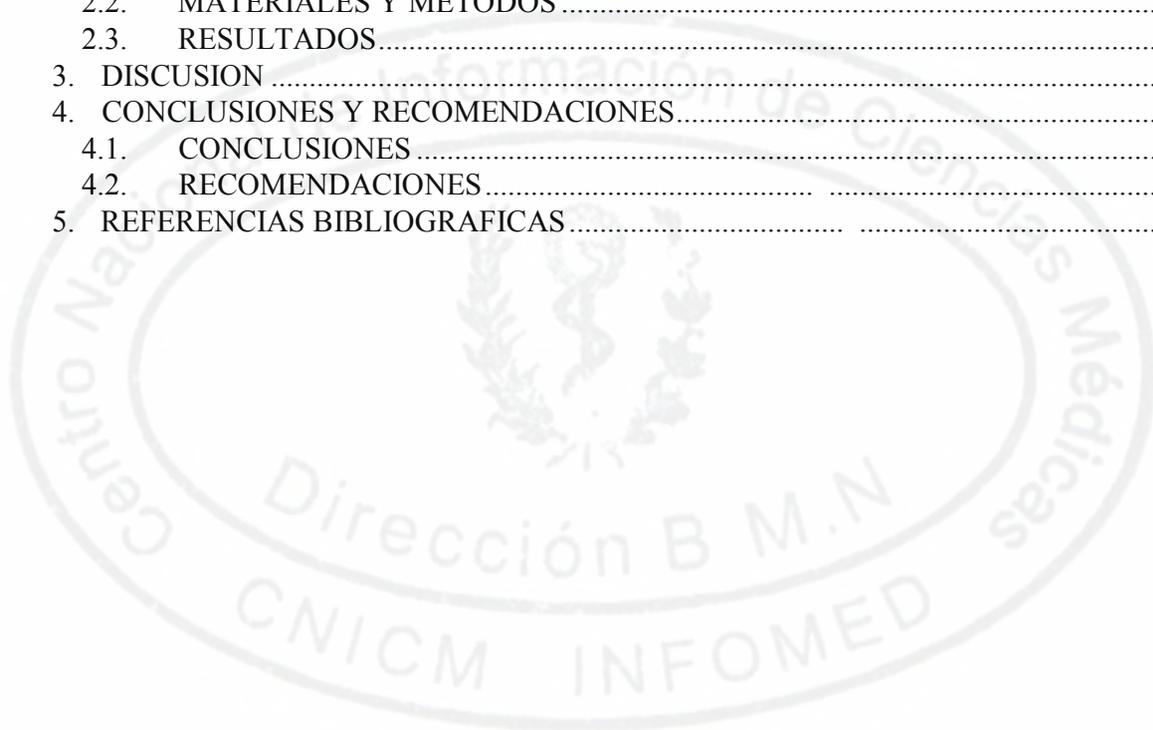
ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

aa:	aminoácidos
AAT:	Antígenos Asociados a Tumores
AcM:	Anticuerpo(s) Monoclonal(es)
ACF:	Adyuvante Completo de Freund
AIF:	Adyuvante Incompleto de Freund
Ag:	Antígeno
ARN:	Acido Ribonucleico
ATCC:	American Type Culture Collection (de las siglas del inglés)
BSA:	Albúmina de Suero Bovino (de las siglas del inglés)
CD:	Grupo de diferenciación (de las siglas del inglés)
CDC:	Citotoxicidad Dependiente de Complemento
CENPALAB:	Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio
CIM:	Centro de Inmunología Molecular
CPA:	Célula Presentadora de Antígenos
CsA:	Ciclosporina A
CTL:	Respuesta linfocitotóxica mediada por células T CD8+ (de las siglas del inglés)
CTLA-4:	Antígeno de Linfocitos T Citotóxicos-4 (de las siglas del inglés)
CY:	Ciclofosfamida
Treg:	Células T reguladoras
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DO:	Densidad Optica
EAE:	Encefalitis Autoinmune Experimental
EAPL:	Enfermedad autoinmune inducida post-linfopenia funcional
ECACC:	European Collection of Cell Cultures (de las siglas del inglés)
EDTA:	Acido Etilendiaminotetracético
EGF:	Factor de Crecimiento Epidérmico (de las siglas del inglés)
ELISA:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (de las siglas del inglés)
FACS:	Citometría de Flujo (denominación a partir del prototipo Fluorescence Activated Cell Sorter, de las siglas del inglés)
FITC:	Isotiocianato de Fluoresceína (de las siglas del inglés)
hu-:	humano
IDDM:	Diabetes Mellitus Insulino-Dependiente (de las siglas del inglés)
IE:	Indice de Estimulación
IFI:	Inmunofluorescencia Indirecta
IFN:	Interferon
IL-:	Interleucina
im:	vía de administración intramuscular
ip:	vía de administración intraperitoneal
iv:	vía de administración intravenosa
IVV:	Esquema de administración secuencial combinada de Inmunosupresión/ Quimioterapia + Vacuna + Vacuna
kDa:	kilodalton
MCC:	Medio de Cultivo Completo
MHC:	Complejo Mayor de Histocompatibilidad (de las siglas del inglés)

MOG:	Glicoproteína de Mielina/Oligodendroito (de las siglas del inglés)
MTLV:	Virus Linfotrópico T Murino (de las siglas del inglés)
mu-:	Múrido o murino (del latín <i>mus</i> , <i>muris</i> , <i>murinus</i> , ratón e — <i>ido</i> ; perteneciente a la Familia Muridae)
naíve:	se refiere a linfocitos no activados previamente (del francés: ingenuo)
NOD:	Ratón No-Obeso Diabético
nu/nu:	animal atímico homocigótico, también conocido como desnudo (del inglés: nude)
PBS:	Tampón Salino Fosfato (de las siglas del inglés)
PNO:	Procedimiento Normalizado de Operación
PPD:	Derivado Proteico Purificado del <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (de las siglas del inglés)
p35-55:	péptido 35-55 del MOG
rec:	proteína recombinante
R-PE:	Ficoeritrina (de las siglas del inglés)
r.p.m.:	revoluciones por minuto
Rad:	Irradiación
RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa con reverso transcripción previa (de las siglas del inglés)
SAS:	Sulfato de Amonio saturado
se:	vía de administración subcutánea
SCID:	Inmunodeficiencia Severa Combinada (de las siglas del inglés)
SEM:	Error estándar de la media (de las siglas del inglés)
SI:	Sistema Inmune
SNC:	Sistema Nervioso Central
SS:	Solución Salina al 0.9%
TAE:	Tumor Ascítico de Ehrlich
TCR:	Receptor de células T (de las siglas del inglés)
Th1/2:	Célula T cooperadora de tipo 1 ó 2 (de las siglas del inglés)
TP:	toxina del bacilo <i>Bordetella pertussis</i>
Tx:	Timectomía
VIV:	Esquema de administración secuencial combinada de Vacuna + Inmunosupresión/ Quimioterapia + Vacuna
xid:	Ratón que expresa la mutación de la inmunodeficiencia ligada al cromosoma X
3LL-D122:	Variante altamente metastásica (D122) del Carcinoma Pulmonar de Lewis (3LL)

INDICE

	Pág.
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Novedad Científica.....	8
1.2. Problema Científico.....	9
1.3. Hipótesis Científica.....	9
1.4. Objetivos.....	10
2. CUERPO DE LA TESIS.....	11
2.1. ANTECEDENTES.....	12
2.2. MATERIALES Y METODOS.....	31
2.3. RESULTADOS.....	52
3. DISCUSION.....	87
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	103
4.1. CONCLUSIONES.....	104
4.2. RECOMENDACIONES.....	106
5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	108





1. INTRODUCCION

La investigación académica y la aproximación terapéutica en Inmunología han estado guiadas desde su fundación como rama de la Microbiología en la aparente “razón de ser” del Sistema Inmune (SI), dada por su capacidad de discriminación de lo propio frente al medio circundante [1-3]. La “Selección Clonal” ha sido el paradigma dominante a partir de los años 60 del siglo XX, para explicar porqué el SI reacciona contra los antígenos (Ag) foráneos y tolera los propios. Conforme a los postulados de esta teoría, la Inmunología como “ciencia de lo propio” se reduce a la noción clásica donde el SI permanece silenciado hasta que es activado por Ag extraños y la regulación de la respuesta inmune primariamente dada en la purga en los órganos linfoides centrales de los clones linfocitarios con un repertorio de receptores potencialmente autorreactivos durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario [4-6]. Bajo este modelo de "tolerancia recesiva o pasiva", trastornos en los mecanismos de delección central permitirían el escape a periferia de linfocitos patogénicos y la aparición de la enfermedad autoinmune [7-10], Consecuentemente, la terapia de estas enfermedades se sustenta en el desarrollo y aplicación de procedimientos inductores de inmunosupresión capaces de eliminar o atenuar las células autorreactivas [11-13].

A pesar de la demostración formal de la existencia de mecanismos de “Selección Clonal” [14], estos no permiten explicar parte de la fenomenología experimental y clínica existente tales como: el desarrollo de efectores de la respuesta inmune en animales libres de gérmenes [15], la existencia de linfocitos y anticuerpos autorreactivos en individuos sanos [16, 17], la existencia de tolerancia inmune en la adultez a pesar de la producción continua de linfocitos durante toda la vida del individuo [18, 19], ni la ineficacia de los mecanismos de vigilancia inmunológica contra tumores si los blancos principales son neo-antígenos tumorales, tal y como esta teoría concibe [20]. Desde el punto de vista inmunoterapéutico este paradigma ha llevado a asumir que el SI es

capaz de desarrollar efectores específicos contra cualesquier Ag extraño al organismo que no guarde similitud con las moléculas propias y consecuentemente desencadenar en cascada un complejo mecanismo efector destructivo contra la célula u organismo que la porte. De esta forma la condición necesaria para desarrollar una terapia inmune efectiva contra una infección, pasa por encontrar esa molécula extraña presente en el patógeno y posteriormente presentársela al SI junto a adyuvantes (o sustancias que aporten señales co-estimuladoras) eficaces, tal que le aporten mayor carácter foráneo al que intrínsecamente porta la molécula encontrada. Alternativamente se pudieran obtener en otras especies animales o por tecnologías *in vitro*, efectores específicos (como por ejemplo Anticuerpos Monoclonales) contra ese Ag extraño y administrarlos al individuo de forma pasiva. Indiscutiblemente, el éxito de esta aproximación es patente en una decena de enfermedades infecciosas, sin embargo para muchos otros patógenos incluyendo los parásitos, la experiencia documenta limitaciones de esta teoría. También en el cáncer, tras casi medio siglo del descubrimiento de los antígenos de rechazo específicos de tumores en neoplasias químicamente inducidas en modelos animales y su uso como vacunas, en analogía con las concepciones provenientes del tratamiento de las enfermedades infecciosas, ha representado de muy escaso impacto terapéutico [21-24]. Por otro lado, recientemente ha sido demostrado que los antígenos propios son los blancos principales sobre los que se garantizaría una respuesta inmune capaz de controlar el crecimiento tumoral [25], de aquí que la posibilidad de desarrollo de inmunoterapias eficaces obviamente estarían limitadas.

Recientes evidencias experimentales sustentan la persistencia de células autorreactivas inmunocompetentes en individuos sanos [26, 27] y la inducción de enfermedades autoinmunes órgano-específicas por linfopenia funcional transitoria de linfocitos T [28, 29]. A partir de estos resultados, en los años 90 emerge el modelo alternativo de la “tolerancia dominante o activa”

(TD), que asume al SI organizado sobre el reconocimiento a lo propio y la existencia de un estado de autoinmunidad fisiológica como mecanismo de homeostasis del individuo, controlado por células con función reguladora (Treg) que contribuyen al mantenimiento de la tolerancia periférica a los antígenos propios [30, 31]. Una de las innovaciones fundamentales que distingue al modelo de TD está dada en la visión de la autoinmunidad como natural y beneficiosa, más que una consecuencia fortuita y negativa de la inmunidad. Aquí, el SI se encuentra en continua activación referenciado en el reconocimiento de un particular conjunto de Ag propios y predice la existencia de una cohorte de clones linfocitarios contra tales especificidades con receptores pre- seleccionados por su alta afinidad que están involucrados en la regulación inmune y la homeostasis [32],

Homúnculo inmunológico (HI) es el término que se aplica para designar el repertorio natural autoinmune dirigido contra los Ag propios dominantes [33, 34], EL HI puede considerarse como una representación interna de ciertas moléculas propias, análogo al homúnculo neurológico, figura funcional del Sistema Nervioso del organismo individual impreso en las cortezas sensoriales y motoras. El homúnculo neurológico está compuesto por redes de neuronas conectadas y el HI por su parte, esta compuesto por linfocitos T y B que reconocen los epítopes dominantes de los Ag propios. Al igual que las neuronas, estos linfocitos autorreactivos se encuentran regulados por redes celulares que incluyen interacciones idiotipo - anti-idiotípicas.

El HI aunque atractivo conceptualmente, se encuentra pobremente operacionalizado, lo que limita su alcance práctico. La estratificación del conjunto de los autoantígenos en homunculares o no, sería relevante para el diseño de vacunas contra Ag propios como blancos de la inmunidad antitumoral. Los antígenos homunculares a diferencia de los no homunculares deben estar sometidos a un nivel de regulación fisiológica, el cual sería preciso romper para inducir respuesta

inmune. La ruptura de esta tolerancia pudiera tener implicaciones a largo plazo en el individuo, sería el equivalente a la inducción de una autoinmunidad patológica, aunque pudiera derivar en una respuesta inmune más eficiente contra los tumores. Este mecanismo no-deleccional de regulación de la tolerancia inmunológica periférica pudiera explicar las limitaciones en la respuesta terapéutica obtenida con tratamientos inmunosupresores en las enfermedades autoinmunes y fundamentar nuevos enfoques terapéuticos en la autoinmunidad patológica y el cáncer [35, 36].

En el presente trabajo se evalúan potenciales implicaciones terapéuticas del modelo emergente de "tolerancia dominante o activa" en la enfermedad. Se examinó el efecto de manipulaciones de la regulación periférica durante la fase de inducción de la respuesta inmune contra antígenos propios en cuatro situaciones biológicas; la enfermedad autoinmune experimentalmente inducida, la inducción de actividad antitumoral sin manipulación antigénica, la inducción de respuesta inmune contra vacunas de cáncer basadas en antígenos propios y la inducción de actividad antitumoral con vacunas de cáncer, todas con unidad experimental común dada por la evaluación de la respuesta inmune frente a antígenos propios en el curso de procedimientos generadores de linfopenia funcional transitoria.

La existencia de Treg de la respuesta inmune es uno de los sustentos teóricos del modelo de tolerancia dominante [37-39], Experimentalmente las Treg están pobremente caracterizadas tanto fenotípica como fisiológicamente, aunque linfocitos CD4+CD25+ [40, 41] y CD8+ [42-46] se asocian con función inmunorreguladora *in vivo* [47], La Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE) inducida con el péptido 35-55 de la Glicoproteína de Mielina/Oligodendrocito (MOG) es un modelo prototípico de enfermedad autoinmune mediada por células Th1 [48-50], La forma crónica progresiva de EAE desmielinizante manifiesta en este modelo es reminiscente en muchos

aspectos de la Esclerosis Múltiple humana [51], por lo que resulta atractivo para investigar la patogénesis e inmunorregulación de la enfermedad autoinmune. La autoinmunidad al MOG es parte del repertorio natural autoinmune en individuos sanos, donde existe respuesta natural de anticuerpos IgG sin enfermedad [52], por lo que es razonable asumir que mecanismos de regulación inmune deben existir para controlar la expresión intrínseca de la autoinmunidad a este antígeno.

Derivado del surgimiento de la Inmunología como rama de la Microbiología sus bases experimentales provienen fundamentalmente de la inmunización con Ag foráneos. Sin embargo, existe una limitada documentación referente a la reactividad del SI a las moléculas propias ya que la mayoría de los experimentos de autoinmunización se restringen a un puñado de enfermedades auto inmunes experimentales en modelos animales [53]. Con el interés de extender el análisis anterior, se evaluó el impacto de los mecanismos de regulación inmune periférica al Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). El EGF resulta de interés ya que es una molécula pequeña de sólo 53 aminoácidos [54-57], contra la que existe respuesta natural de autoanticuerpos IgG en individuos sanos y a diferencia del antígeno MOG, se encuentra en bajas concentraciones en circulación periférica, similar a hormonas que resultan blanco de respuestas autoinmunes patológicas [58].

La respuesta antitumoral puede ser un caso particular de respuesta autoinmune, basado en las múltiples evidencias que sustentan la relevancia de los Ag propios como blancos principales de la respuesta inmune contra las células tumorales [59-61], De ser esta afirmación correcta, ambos tipos de respuestas deben estar sujetos a similares procesos de regulación inmune y manipulaciones que desencadenan enfermedades autoinmunes, deben desencadenar a su vez respuesta antitumoral. La cepa de ratones BALB/c es ordinariamente resistente al desarrollo de

enfermedades autoinmunes espontáneas. Sin embargo, la administración neonatal de la Ciclosporina A (CsA), medicamento con reconocido efecto inmunosupresor, sin otro tipo de manipulación antigénica induce el desarrollo de autoinmunidad patológica [28]. Por homología se evaluó similar intervención en animales portadores de un tumor singénico inerte a algún efecto directo potencial de la CsA.

De los resultados anteriores se extrajeron nociones para la inmunología tumoral tales como: vacunas de cáncer inmunogénicas pueden estar basadas en el uso de antígenos homunculares y no sólo en neo-antígenos tumor específicos, conclusión razonable ya que esta autoinmunidad natural está garantizada en una relativa alta frecuencia de células T y B específicas. Para sobrepasar los mecanismos de regulación que controlan la autoinmunidad natural se requieren altas dosis de antígeno, frecuentes y repetidas inmunizaciones que incluyan adyuvantes contentivos de potentes señales co-estimuladoras. Pero fundamentalmente, los protocolos de vacunación terapéutica del cáncer deben incluir el uso de tratamientos inmunosupresivos o mejor, capaces de eliminar o “relajar” la regulación inmune, entre los que pueden considerarse, los medicamentos citotóxicos y radiación, procedimientos que inducen linfopenias transitorias como efecto secundario.

La demostración formal de estos postulados se realizó utilizando una vacuna de cáncer basada en el EGF conjugado a la proteína P64k de la *Neisseria meningitidis* (EGF-P64k) en el adyuvante Montanide ISA 51 [62, 63]. Esta vacuna se encuentra en evaluación clínica para el tratamiento de pacientes con cáncer de origen epitelial, con la finalidad de aprovechar los autoanticuerpos producidos como vía para inactivar el EGF circulante, castrándolo de la circulación periférica con el propósito de reducir la tasa de crecimiento de los tumores dependientes de este factor de crecimiento [64-67], Desde el punto de vista práctico, una mayor eficacia de este enfoque

terapéutico estaría directamente ligada a la inducción y mantenimiento de mayores títulos de anticuerpos circulantes en los sujetos portadores de tumores.

En general, el presente trabajo tributa al sustento del modelo emergente de "tolerancia dominante" y postula una aplicación práctica para la terapia del cáncer. Protocolos de investigación clínica basados en estos resultados ya se encuentran en ejecución, con resultados preliminares alentadores.

1.1. Novedad Científica

En el presente trabajo se aborda un tema de actualidad científica, como es el caso del cambio de paradigma de la tolerancia inmune recesiva o pasiva a la tolerancia dominante o activa, que es considerado hoy en día una de las posibles causas del insuficiente resultado de la inmunoterapia del cáncer y otras enfermedades. Los resultados obtenidos basados en la combinación teórico- conceptual y experimental aplicada pudieran contribuir a la comprensión de los mecanismos que median el fenómeno de la tolerancia inmune y su posterior aplicación a la práctica médica, dado en que:

- Se demuestra el efecto modulador de las células T reguladoras con fenotipo CD4+CD25+ y CD8+ tanto de la fase inductora como efectora de la respuesta inmune.
- Se demuestra la relevancia de las células T reguladoras en la transición de la autoinmunidad benigna a la inflamación inmune patogénica.
- Se obtienen evidencias a favor de la intervención de los mecanismos de regulación inmune periférica en la respuesta contra antígenos de membrana y solubles.
- Se obtiene una explicación alternativa al efecto rebote de las manifestaciones clínicas de las enfermedades autoinmunes frecuentemente observado tras la interrupción del tratamiento con inmunosupresores, lo que sugiere la re-evaluación conceptual de tal proceder terapéutico.

- Se postula por primera vez una definición operacional que estratifica los autoantígenos por su relevancia en la autoinmunidad natural.
- Derivado de estos resultados se obtienen evidencias sobre el papel de la tolerancia dominante o activa en la inmunidad tumoral y se demuestra la inducción de efecto antitumoral por inmunosupresión.
- Se propone una nueva y contra-intuitiva modalidad de inmunoterapia del cáncer sustentada en la combinación de vacunas de cáncer basadas en antígenos propios con inmunosupresión.

1.2. Problema Científico

- ¿Es posible incrementar la respuesta inmune antígeno-específica combinando la vacunación con la depleción transitoria de subpoblaciones linfoides T?
 - ¿Inducen similar efecto la depleción de las diferentes subpoblaciones linfoides T CD4+, CD8+ ó CD4+CD25+?
 - ¿Existe dependencia de esquema del tratamiento inmunosupresor sobre la respuesta inducida?
 - ¿El aumento de la respuesta inmune producto a tal combinación se traduce en un efecto clínico?
- Acelerando el curso de enfermedades autoinmunes -

Aumentando la respuesta contra tumores

1.3. Hipótesis Científica

El tratamiento inmunosupresor periférico transitorio es capaz de acelerar las enfermedades autoinmunes, potenciar vacunas e inhibir el crecimiento de tumores.

Definición Operacional: Inmunosupresor periférico transitorio es el tratamiento que provoque una reducción mayor del 80% de la cantidad total de linfocitos T CD4+, CD8+ ó CD4+CD25+ en órganos linfoides periféricos (sangre o bazo) con recuperación de al menos el 10% del valor máximo reducido en las 2 semanas siguientes al tratamiento.

1.4. Objetivos

1.4.1. General

- Evaluar la modulación de la Tolerancia Dominante mediante inmunosupresión y su impacto en la Autoinmunidad y el Cáncer.

1.4.2. Específicos

- Evaluar el efecto de tratamientos inmunosupresores sobre la Encefalitis Autoinmune Experimental inducida por inmunización con el péptido 35-55.
- Determinar la dependencia del esquema de tratamiento inmunosupresor sobre la respuesta clínica e inmune inducida.
- Comprobar el efecto de tratamientos inmunosupresores sobre la evolución de tumores trasplantados, en ausencia de manipulación antigénica.
- Evaluar el efecto de tratamientos inmunosupresores sobre la respuesta a la vacuna de cáncer basada en el antígeno propio Factor de Crecimiento Epidérmico.
- Evaluar el efecto sobre la evolución de tumores de tratamientos inmunosupresores combinados con la vacuna de cáncer basada en el antígeno propio Factor de Crecimiento Epidérmico.

2. CUERPO DE LA TESIS



2.1 ANTECEDENTES

2.1.1. Inmunidad, tolerancia y evolución

La evolución del Sistema Inmune como mecanismo para el reconocimiento y respuesta a la invasión microbiana constituye la base racional fundamental para la investigación en Inmunología [68, 69]. La extensión del Darwinismo a la inmunobiología se interpreta como la necesidad de la supervivencia del individuo sustentada en la habilidad de desencadenar una respuesta inmune contra lo extraño y la inhabilidad para el desarrollo de una respuesta inmune destructiva contra lo propio [70], Por inducción, la inhabilidad para reaccionar contra lo propio se asume como definición apta de Tolerancia. Consecuentemente, la tolerancia inmune implica clásicamente que en un individuo sano no pueden existir componentes del SI capaces de interactuar con las estructuras propias o la visión más contemporánea dada por la incapacidad de dichos componentes de activarse en su interacción con lo propio [10, 71].

Basado en tales consideraciones, la defensa exitosa frente a los microorganismos patógenos constituiría la presión selectiva necesaria y suficiente para la aparición de una inmunidad adaptativa a través de la evolución; y la autoinmunidad la consecuencia fisiopatológica producto a la existencia de una mayor diversidad del repertorio inmune. No obstante, la respuesta inmune sucesiva a un patógeno evidencia características distintivas de la inmunidad adaptativa: especificidad, memoria y amplificación de la respuesta inmune; requerimientos implícitos para la co-evolución de mecanismos de regulación inmune capaces de controlar dicha respuesta.

2.1.2. Discriminación entre lo propio y lo no propio. Teorías de la regulación inmune.

La capacidad discriminatoria entre lo propio de lo extraño constituye la base conceptual fundamental de la inmunología contemporánea y por ende la fundamentación teórica para el estudio del SI se ha estructurado sobre la capacidad explicativa de esta asunción [72, 73],

La doctrina prevaleciente en los estudios sobre inmunidad durante los últimos 50 años se reconoce como la Teoría de la Selección Clonal [4], Su enunciado clásico se reduce a la idea que la activación y control de la respuesta inmune ocurre por el encuentro entre el Ag con los receptores antigénicos específicos. Teniendo en cuenta que la noción clásica concibe que el SI responda siempre que un Ag es reconocido, esto implica que la falta de respuesta inmune es producto a la no presencia de antígenos que desafíen al sistema o la ausencia de linfocitos con receptores específicos para el antígeno en cuestión [71]. Bajo esta concepción el único mecanismo necesario de retroalimentación del SI estaría dado por la eliminación del Ag desencadenante de dicha respuesta, además la regulación de la respuesta inmune ocurre primariamente por la purga de clones linfocitarios con un repertorio de receptores potencialmente autorreactivos [4-6], Aquí, la discriminación entre lo propio y lo extraño resulta fundamental y de acuerdo con la Teoría de la Selección Clonal, el SI permanece silenciado hasta que es activado por un Ag extraño.

Sin embargo, esta teoría no explica hallazgos experimentales tales como el desarrollo de efectores de la respuesta inmune en animales libres de gérmenes [15], la existencia de linfocitos y anticuerpos autorreactivos en individuos sanos [16, 17], la singularidad de que enfermedades autoinmunes experimentales inducidas por inmunización con antígenos propios co-administrados con microorganismos (Micobacterias) son autolimitadas, con curso clínico monofásico [17]; más aun, la contra-intuitiva aparición de enfermedades autoinmunes en animales sanos subsiguiente a manipulaciones inductoras de inmunosupresión transitoria [53], ni la aparición de enfermedades

autoinmunes por la eliminación de mediadores de la inmunidad como la Interleucina-2 [74, 75], pueden inferirse con tal razonamiento. Adicionalmente, la ineficacia de los mecanismos de vigilancia inmunológica contra tumores si los Ag blancos principales son los neo-antígenos tumorales como se asume generalmente [22], queda fuera de sustento experimental. Recientemente, modelos teóricos alternativos con variable grado de adherencia a la Teoría de la Selección Clonal han emergido con el interés de fundamentar la fenomenología experimental no explicada bajo dicha concepción. Las teorías emergentes se pueden categorizar en diferentes variantes producto a su alcance y distanciamiento o no de la corriente teórica de la Selección Clonal.

La Categoría Neo-Ortodoxa, aunque con discretas diferencias entre los postulantes [76-78] mantiene como doctrina fundamental de la Inmunología la purga clonal central, adicionando la tolerancia periférica al concepto clásico de la discriminación entre lo propio de lo extraño. Esta aproximación incorpora mecanismos regulatorios explicativos de la existencia de tolerancia periférica tales como el papel de las células presentadoras de antígenos, el requerimiento de múltiples señales para la inducción de inmunidad (segunda señal), la existencia de células T cooperadoras con sus citocinas, la existencia de fenotipos de células T con capacidad regulatoria y la anergia.

A la Categoría Conservadora tributan diferentes tendencias [79-81] aunque comparten su conformidad con los principios fundamentales de la categoría anterior, se distancian al refutar la existencia de una capacidad intrínseca del repertorio de receptores inmunes para discriminar los Ag propios de los extraños. Visiones alternativas en esta categoría proponen que el SI se activa para responder a Ag específicos en el contexto de especiales “señales de peligro” o en el contexto tejidos particulares por donde penetran los Ag al organismo, asumiendo como crítica la rama

innata del SI como fuente de estas señales especiales. Esta fundamentación teórica al igual que la anterior considera que el SI permanece silenciado hasta que es activado por una infección o por señales especiales de peligro.

2.1.3. Problemas fundamentales que desafían la base teórico-conceptual contemporánea de la inmunidad.

El marco conceptual descrito aparentemente renovador, resulta aun insuficiente para explicar mucha de la fenomenología experimental heterodoxa emergente; no obstante, concepciones teóricas aparte, la inmunología como ciencia médica tiene un compromiso social y su limitado impacto en terapia contemporánea impone una revisión a fondo de sus bases teóricas [82].

El asedio permanente de nuestro organismo por patógenos no justifica la desproporcionadamente baja prevalencia de enfermedades autoinmunes, por el contrario, la incidencia de estas enfermedades se encuentra en franco incremento en países con sistemas sanitarios altamente desarrollados [83]; las enfermedades autoinmunes deberían ser aleatorias teniendo en cuenta la diversidad de los patógenos, sin embargo existen órganos, tejidos y antígenos blancos definidos y preferenciales contra los cuales se desarrolla la inmunopatología; incluso conservándose patrones similares en animales de diferentes especies (ejemplo la Diabetes Mellitus Insulino-Dependiente) [17, 53, 83],

Por otro lado, recientemente ha sido demostrado que los antígenos blancos principales sobre los que se garantizaría una respuesta inmune capaz de controlar el crecimiento tumoral son antígenos propios [25], de aquí que la posibilidad de desarrollo de inmunoterapias eficaces obviamente estarían limitadas.

Paradójicamente, en el campo de la infectología, sólo ha logrado desarrollarse vacunas eficaces contra un limitado número de enfermedades infecciosas y contra los patógenos que han co-

evolucionado con el hombre son prácticamente inexistentes (por ejemplo la Malaria), sorprendentemente, muchos de los antígenos expresados por estos patógenos y que definen su ciclo vital, son de estructura conservada filogenéticamente (ejemplo los dominios similares al Factor de Crecimiento Epidérmico) [84, 85],

2.1.4. La Tolerancia Dominante y la Autoinmunidad Fisiológica. Cambio de paradigma en inmunología.

Evidencias experimentales sustentan la persistencia de células autorreactivas inmunocompetentes en individuos sanos [16, 17, 27] y la inducción de enfermedades autoinmunes órgano-específicas por linfopenia funcional transitoria de linfocitos T [53]. Los mecanismos no-delecionales de regulación de la tolerancia inmunológica periférica a los antígenos propios comienzan a caracterizarse [38, 39, 86]. Este modelo emergente de "tolerancia dominante o activa" permite asumir al SI organizado sobre el reconocimiento a lo propio y la existencia de un estado de autoinmunidad fisiológica como mecanismo de homeostasis del individuo, controlado por células con función reguladoras que contribuyen al mantenimiento de la tolerancia periférica a los antígenos propios [32, 87],

Recientemente una Categoría Reformadora de la Teoría de la Selección Clonal, aunque con variados matices según sus postulantes, pudiera conducir a una valoración substancialmente diferente de la inmunobiología [88-91], Las innovaciones fundamentales que caracterizan el distanciamiento radical de esta categoría referente a las anteriormente descritas están dadas en, la visión de la autoinmunidad como natural y beneficiosa, más que una consecuencia fortuita y negativa de la inmunidad. El SI se encuentra en continua activación referenciado en el reconocimiento de los antígenos propios y no solamente en los patógenos invasores. La existencia de una retroalimentación activa tanto negativa como positiva como elemento crítico

para el mantenimiento del accionar del sistema en su conjunto; aquí el SI no es la mera colección inconexa de clones. Predice la existencia de una cohorte de clones linfocitarios con especificidades autorreactivas y receptores pre-seleccionados por su alta afinidad contra un particular conjunto de Ag propios, los que están involucrados en la regulación inmune y garantizan la capacidad del SI para reaccionar contra los patógenos. Este postulado, metafóricamente designado como homunculus inmunológico [33], aunque atractivo conceptualmente, se encuentra pobremente operacionalizado lo que limita su alcance.

2.1.5. Mecanismos periféricos de inducción de tolerancia

Los mecanismos que median la discriminación de las células T entre lo propio y lo no-propio han sido clasificados en dos amplios tipos. El primer grupo de mecanismos son los pasivos o recesivos ya que subyacen en la ausencia funcional de células autorreactivas o la presentación de antígenos propios en una forma no-inmunogénica [92], El segundo grupo de mecanismos son los activos o dominantes ya que estos previenen la activación de otras células T que tienen la potencialidad de causar autoinmunidad [10, 93],

2.1.6. Regulación periférica de la respuesta de células T

Recientemente múltiples evidencias provenientes de estudios en sujetos sanos sustentan la existencia de forma espontánea de células T con la capacidad de controlar células T autorreactivas. Estas células mantienen la tolerancia natural inmune a los antígenos propios y se designan células T reguladoras (Treg) o células T supresoras [38, 39, 86].

Esta denominación surge de la demostración *in vivo* del desarrollo de enfermedades autoinmunes como resultado de manipulaciones experimentales inductoras de linfopenia funcional en individuos sanos. Característicamente, producto a estas intervenciones existe un déficit

permanente o transitorio de células T o reducción del repertorio de receptores de células T (TCR) [94-96]. Alternativamente la capacidad funcional o fisiológica queda demostrada tras la transferencia adoptiva de poblaciones celulares T capaces de prevenir el desarrollo de enfermedades autoinmunes órgano-específicas en modelos animales [31, 95].

2.1.7. Células T reguladoras (Treg) de origen natural

La existencia espontánea de Treg ha sido fundamentalmente investigada en roedores [97], no obstante recientemente han sido caracterizadas en sujetos humanos células provenientes de timo y sangre periférica con similar función [40, 98],

El interés por diferenciar fenotípicamente las Treg de otras poblaciones linfoides T ha conducido al hallazgo de múltiples marcadores de diferenciación linfocitarios asociados con una función reguladora tanto *in vitro* como *in vivo* tales como el CD5 [96], CD45RC [99], RT6.1 [100], CD45RB [101] y el CD25 [31] entre otros, constituyendo este último el candidato más aceptado distintivo de este tipo de células [102].

2.1.8. Células con actividad reguladora con fenotipo CD4+CD25+

El cluster de diferenciación 25 (CD25) es la cadena α del receptor de Interleucina 2 (IL-2). Adicionalmente, las cadenas β (CD122) y γ (CD132) conforman estructuralmente el receptor de esa citocina y se expresan constitutivamente en los linfocitos T en reposo y la activación de éstas células induce la síntesis de la cadena α , la formación del receptor heterotrimérico de alta afinidad y la secreción de IL-2 [75]. El CD25 se expresa constitutivamente en el 5 - 10 % de los linfocitos T CD4+ y en menos del 1 % de los linfocitos CD8+ periféricos. Estas células son anérgicas y presentan actividad supresora *in vitro* y su depleción conduce a la aparición de múltiples enfermedades autoinmunes en individuos sanos no predispuestos a las mismas [31].

Las Treg CD4+CD25+ se producen en el timo normal [103, 104] y en su mecanismo de regulación periférica de la respuesta inmune pueden participar tanto mediadores solubles, como las citocinas anti-inflamatorias Interleucina-4, la Interleucina-10 y el Factor de Crecimiento Transformante-P [105], además que pudieran actuar por contacto directo con las células efectoras o a través de las células presentadoras de antígenos (CPA) [106, 107] .

2.1.9. Especificidad del ataque autoinmune post-linfopenia

En los modelos experimentales murinos una variedad muy infrecuente de enfermedades órgano-específicas espontáneas aparecen post-linfopenia, con diferencial susceptibilidad según el fondo genético de la cepa animal. Estas incluyen diabetes, tiroiditis, gastritis, orquitis, ooforitis, prostatitis y adenitis coagulante entre otras, resultando significativa la superposición en el espectro de estas enfermedades fundamentalmente dirigidas contra órganos endocrinos y estómago, clusters similares a los observados en similares entidades órgano-específicas humanas. Resulta destacable la similitud existente entre al menos algunos de los autoantígenos diana de estas enfermedades inducidas por linfopenia y las correspondientes enfermedades autoinmunes humanas [29, 53].

2.1.10. Papel del antígeno en la inducción y progresión de la enfermedad autoinmune post-linfopenia

En los modelos de enfermedades autoinmunes post-linfopenia (EAPL) la inducción del proceso patológico no depende en la inmunización con el autoantígeno en adyuvantes, como generalmente están descritos y establecidos múltiples modelos experimentales de estas enfermedades [17]. Por el contrario, en las EAPL los autoantígenos naturales tisulares son blancos de los mecanismos efectoras producto a una perturbación del SI y no, producto a la inmunización con un inmunógeno subrogado, por ejemplo, proveniente de otra especie animal.

Evidencias experimentales sustentan que la respuesta autoinmune en las EAPL es conducida por el Ag endógeno. La relevancia de su persistencia para la inducción y progresión de la EAPL queda manifiesta en varios modelos experimentales donde el momento de extirpación y la persistencia de los órganos diana referente al proceder inductor de linfopenia define la intensidad de la respuesta autoinmune. Así, la temprana y continua estimulación por el Ag endógeno conduce al desarrollo y progresión de la enfermedad autoinmune [29, 108],

2.1.11. Evidencias que sustentan que las enfermedades autoinmunes son debidas a las respuestas inmunes específicas

Las EAPL presentan características patológicas similares a las correspondientes enfermedades autoinmunes humanas espontáneas. Característicamente se observa presencia de linfocitos infiltrantes en los órganos diana, presencia de autoanticuerpos circulantes tejido-específicos y es demostrable la habilidad de los esplenocitos de los animales enfermos para transferir la enfermedad a receptores naïve inmunodeficientes [29, 53].

2.1.12. Inmunidad antitumoral

La potencialidad del SI para reconocer y eliminar células tumorales fue inicialmente postulada por Paul Ehrlich en 1909 (revisado en [109]). La prueba de la existencia de reacción inmune antitumoral surge por la demostración de regresión de tumores trasplantados en animales genéticamente homólogos, fundamento sobre el que se sustentó la hipótesis formal de la “inmunovigilancia del cáncer” por Sir Macfarlane Burnet [20]. Esta hipótesis concibe que los linfocitos actúan como centinelas al reconocer y eliminar células transformadas que continuamente se están generando en el organismo, destruyéndolas antes que los tumores puedan expresarse clínicamente. Adicionalmente concibe el retardo del crecimiento tumoral o la inducción de regresión de tumores establecidos como funciones básicas del SI.

Fundamental

aporte a esta hipótesis constituyó el hallazgo de la existencia de “Antígenos Específicos de Tumores”, consecuente al desarrollo de inmunidad contra tumores singénicos trasplantables inducidos por carcinógenos químicos y virus en animales de experimentación [110].

2.1.13. Evidencias experimentales y clínicas documentan la hipótesis de la “inmunovigilancia del cáncer”

En modelos animales se ha demostrado:

1 -Incremento de la incidencia tumoral a dosis inferiores de carcinógenos, con menores períodos de latencia en ratones inmuno-comprometidos con déficit inmune genético o inducido por la depleción funcional con AcM de subpoblaciones celulares tales como células NK, NKT, linfocitos T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, así como Interferón γ e Interleucina 12, comparados con sus contrapartes inmuno-competentes. Por el contrario, ratones normales tratados con inmunoestimulantes tales como la Interleucina 12 o la α -galactosilceramida muestran incremento de la resistencia a la formación de tumores inducidos por MCA (3-metilcolantreno) [111].

2- Los tumores inducidos por carcinógenos en ratones inmunodeficientes son más inmunogénicos que aquellos derivados de ratones con SI normal [112]. Este resultados demuestra una función dual de la inmunidad tanto protegiendo al huésped contra el desarrollo de tumores así como seleccionando las células tumorales con menor inmunogenicidad, las que estarían más adaptadas para escapar a la detección y eliminación por el SI, proceso que ha sido denominado “inmuno- edición del cáncer” [111].

3- Ratones inmunocomprometidos desarrollan más tumores epiteliales y linfomas espontáneos que los ratones normales. La deficiencia de Interferón γ o perforina en ratones C57BL/6 se asocia con el incremento de linfomas espontáneos mientras que en BALB/c con el desarrollo de linfomas y adenocarcinomas pulmonares espontáneos, así como ratones deficientes en el

proteasoma multifuncional grande 2 muestran una incidencia incrementada de cáncer de ovario [109],

Estos hallazgos se extienden a pacientes donde se ha encontrado que:

- 1- Los análisis de autopsias indican una incidencia de tumores mayor que el número de tumores clínicos aparentes [113].
- 2- El incremento de la incidencia de tumores no virales en individuos inmunocomprometidos, como son los pacientes receptores de trasplantes de órganos inmunodeprimidos terapéuticamente. Se ha observado incremento en cuatro veces de la incidencia *de novo* de melanomas malignos [114, 115]; tres veces los sarcomas diferentes al de Kaposi [116] y 25 veces los tumores pulmonares en pacientes con trasplantes cardiacos [117] respecto a individuos normales. Adicionalmente, la incidencia de tumores es mayor en el período neonatal y en la senectud, extremos donde existen trastornos de la inmunidad [118].
- 3- Detección de incremento natural de la respuesta inmune en pacientes con cáncer contra el tumor que portan [119, 120].
- 4- Establecimiento de una correlación positiva entre la presencia de infiltración tumoral por linfocitos y la supervivencia de pacientes con melanomas cutáneos, así como en carcinomas de mama, próstata, ovario, renal, esófago y colorectal, signo de control inmune [121].
- 5- Además, se ha reportado la regresión espontánea de tumores [122],

En general, múltiples evidencias sustentan la existencia de un mecanismo natural de vigilancia inmunológica que puede ser una fase de un proceso más global denominado “inmuno-edición del cáncer” que comprende el espectro completo de efectos de la inmunidad innata y adquirida en el desarrollo tumoral que comprende desde el reconocimiento tumoral y la eliminación hasta la “escultura” y la evasión tumoral [109, 111]. Sorprendentemente, tumores formados en ausencia

de un SI intacto son más inmunogénicos que aquellos surgidos en hospederos inmunocompetentes; lo que documenta el papel del SI no sólo en la protección del huésped al desarrollo de tumores, sino su influencia en la selección de variantes tumorales en base a su inmunogenicidad. Esta concepción incluye tres procesos secuenciales (“las tres Es”): 1- Eliminación, correspondiente a la inmunovigilancia; 2-Equilibrio, representa el proceso por el cual el SI iterativamente selecciona y/o promueve la generación de variantes celulares tumorales con capacidades incrementadas para sobrevivir al ataque inmune; y 3-Escape, es el proceso en el cual el tumor “esculpido” inmunológicamente se expande de forma incontrolada en el hospedero inmunocompetente. Cuando el proceso de eliminación resulta exitoso representa el proceso completo de edición sin progresión a las fases subsecuentes. Al alcanzar el proceso de escape las variantes tumorales no son eficientemente reconocidas y eliminadas por el SI y resulta en la enfermedad maligna clínicamente manifiesta que resulta en la muerte del huésped si el tratamiento médico resulta ineficaz.

2.1.14. Mecanismos de evasión inmune de los tumores

Básicamente se considera la respuesta linfocitotóxica mediada por células T CD8+ (CTL) frente a Ag presentados en el contexto MHC clase I como la rama efectora principal de la inmunidad adaptativa en la respuesta inmune antitumoral. Igualmente, se asume el reconocimiento de los antígenos tumorales como moléculas extrañas por estas células y el inicio de una cascada de eventos que resultan en la destrucción tumoral [22].

De esta manera, las principales tendencias en las estrategias de inmunoterapia activa antitumoral están diseñadas con el interés de incrementar la respuesta CTL. Consecuentemente, el estudio de los mecanismos de escape de los tumores a la respuesta inmune han estado fundamentalmente dirigidos a la caracterización de las vías que utilizan los tumores para bloquear o evadir este tipo

de respuesta aunque la inducción o reforzamiento de los mecanismos de tolerancia por los Ag propios expresados en los tumores puede constituir una de las vías principales de evasión inmune tumoral [123, 124],

Ejemplos de mecanismos de evasión inmune de los tumores

Categoría	Vía	Mecanismos	Ref.
Global	Secreción de factores inmunosupresores Ej.: TGF- β	Interfieren múltiples pasos y vías en la generación de una respuesta inmune efectiva, incluyendo la activación o función de la CTL y de las células T cooperadoras CD4+. Ej.: gliomas	[125]
	Crecimiento tumoral en sitios parcialmente inmunoprivilegiados		
Regulación negativa de la vía de presentación por MHC clase I	Las mutaciones en la vía de presentación por MHC clase I debe ser la manera más simple para los tumores escapar la eliminación por CTL. Una mutación da lugar a un inhibidor negativo dominante y dos mutaciones inactivan ambos alelos.	La pérdida completa de la expresión de MHC clase I en los tumores murinos no es común. Un ejemplo típico es la línea tumoral B16/F10.9 derivada del melanoma original B16 obtenida por selección repetida dada por su incrementado potencial metastásico.	[126]
		La regulación negativa de la expresión de la molécula MHC clase I se aprecia frecuentemente en los tumores humanos y es particularmente pronunciada en las lesiones metastásicas.	[127-130]
Antígeno-específica	Variantes tumorales con pérdida de antígenos	Selección de variantes virales con mutaciones en los epítopes T resistentes a la CTL	[131]
		Pérdida del AAT MART-I/Melan-A en pacientes con Melanoma Metastásico recurrente	[132]
		Pérdida del AAT gp100 en pacientes con Melanoma inmunizados con un péptido de ese Ag	[133]
	Tolerancia	La posibilidad que los tumores pudieran desencadenar un estado de tolerancia hacia un antígeno específico del tumor ha sido demostrada un estudio que utiliza un modelo de ratón transgénico. En este estudio, tumores de células B que expresan moléculas de MHC clase II y un antígeno tumoral no propio indujeron una tolerancia rápida de células T CD4+ que portan un TCR transgénico.	[134]

2.1.15. Factor de Crecimiento Epidérmico

El Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) es miembro de una familia de factores de crecimiento peptídicos de mamíferos, que incluye además al Factor de Crecimiento Transformante α (TGF α), al Factor de Crecimiento similar a EGF que se une a heparina (HB-EGF), la anfiregulina (AR), la betacelulina (BTC), la epiregulina (EPR) y el EPIGEN [135-137]. Estas moléculas se expresan como precursores transmembrana de tipo I y los ectodominios escindidos por proteasas de la superficie celular son liberados como factores de crecimiento solubles [137, 138]. El EGF es un polipéptido de 53 aa con peso molecular de 6.045 kDa, derivado por proceso proteolítico a partir de un precursor de membrana de 1217 aa en roedores y 1207 aa en humanos [54, 139]. El receptor del EGF (EGFR/ErbB-1/HER1) fue el primer receptor tirosina cinasa descubierto [140, 141], así como el primer receptor de superficie celular que se relacionó directamente con el cáncer al observarse la modulación de expresión en fibroblastos infectados con virus oncogénicos [142].

El EGFR interviene en el control de respuestas celulares durante el desarrollo embrionario y en la regulación de procesos metabólicos y fisiológicos en varios tejidos y órganos [143, 144]. Diferentes evidencias sustentan la relevancia del modelo del EGF-EGFR en la oncología. La identificación de la sobre-expresión en aproximadamente el 30% de los cánceres epiteliales de varias localizaciones, como pulmón de células no pequeñas, mama, cabeza y cuello, esófago, vejiga, carcinomas de ovario y cuello uterino; se asocia a la progresión, con un fenotipo tumoral más metastásico y de peor pronóstico de la enfermedad. Ha sido demostrado que muchos carcinomas son promovidos por la activación del EGFR, lo que puede ser resultado de la mutación del receptor [145, 146], de su sobre-expresión [147] o a partir de la estimulación del EGFR por lazos autocrinos [148]. Interesantemente, la expresión transgénica del EGFR humano

en epitelio mamario murino provoca cambios hiperplásicos, displásicos y neoplásicos en este tejido, confirmando la relevancia del EGFR en la facilitación de la transformación celular [149] Además, a pesar de la observación de que la inactivación genética del EGFR en ratones conduce a una severa alteración en el desarrollo epitelial e incluso a la letalidad durante el desarrollo embrionario [150-152], la falta de un irremplazable rol fisiológico del EGFR en el adulto, constituyen los hallazgos que han servido de fundamento para el desarrollo de estrategias terapéuticas novedosas con la finalidad de inhibir o prevenir la activación los receptores Erb-B, uno de los objetivos principales en las investigaciones actuales en la lucha contra el cáncer [153]. La generación de pequeñas moléculas que compiten con el trifosfato de adenosina (ATP) por la unión al bolsillo cinasa del receptor, conduciendo al bloqueo de la activación del receptor y la transducción de señales post-receptor; así como el uso de Anticuerpos Monoclonales (AcM) que reconocen el dominio extracelular del EGFR son dos de las aproximaciones terapéuticas que se encuentran en ensayo clínico [154],

Teniendo en cuenta que la disponibilidad de ligandos resulta primordial para el control de la actividad biológica de los miembros de la familia del EGFR [155], otro potencial enfoque terapéutico estaría dado en el empleo de una vacuna terapéutica que promueva la inducción de autoanticuerpos contra algunos de los ligandos de la familia del EGFR, con la finalidad de aprovechar los autoanticuerpos producidos como vía para inactivar el ligando en cuestión circulante, castrándolo de la circulación periférica con el propósito de reducir la tasa de crecimiento de los tumores dependientes de este factor de crecimiento.

Basado en tal razonamiento se encuentra en evaluación clínica para el tratamiento de pacientes con cáncer de origen epitelial una vacuna de cáncer basada en el EGF [62, 63]. Desde el punto de vista práctico, una mayor eficacia de este enfoque terapéutico estaría directamente ligada a la

inducción y mantenimiento de altos títulos de anticuerpos circulantes en los sujetos portadores de tumores.

2.1.16. Inmunidad al EGF

La capacidad de inducción de respuesta inmune contra el EGF se evaluó desde la descripción inicial de esta molécula y tempranamente quedó demostrado que anticuerpos anti-EGF pueden revertir *in vitro* la activación inducida por el EGF [156]. Adicionalmente, anticuerpos heterólogos anti-EGF obtenidos en conejos y administrados pasivamente en ratones neonatos o en animales embarazadas conduce al incremento de la mortalidad perinatal y la adición de tales anticuerpos a la leche indujo retardo en la maduración del tracto digestivo [157-159]. Alternativamente, se demostró la posibilidad de inducción de autoanticuerpos anti-EGF por la inmunización activa con esta molécula. Con este modelo de autoinmunidad se demostró la capacidad de los autoanticuerpos inducidos de inactivar al EGF y abolir la unión a su receptor, sin afectar el crecimiento ni las características histológicas de los tejidos de animales adultos, aunque tal deficiencia inducida de EGF condujo al incremento de la mortalidad perinatal y el nacimiento de animales con bajos pesos y trastornos pulmonares, cutáneos y hepáticos, revelando una contribución ontogénica diferencial de esta molécula [160, 161].

2.1.17. Ciclosporina A

La Ciclosporina A (CsA) es un polipéptido cíclico hidrofóbico de 11 aminoácidos y peso molecular de 1202 que se aisló originalmente a partir del cultivo del hongo *Tolypocladium inflatum* obtenido de una muestra de tierra colectada en Noruega. La CsA ejerce una potente actividad inmunosupresora *in vivo* sin provocar mielotoxicidad. Este efecto resulta primariamente de su interferencia de la función normal de los linfocitos T al alterar un grupo de eventos de

señalización involucrados en la regulación de la expresión de genes de linfocinas, la muerte de células T inducida por activación y la exocitosis; consecuentemente afecta tanto la proliferación Ag-específica de clones cooperadores y citotóxicos y la respuesta mixta de linfocitos. La CsA interactúa con una proteína de 17 kDa denominada ciclofilina e interfiere directamente en la transcripción del gen de la Interleucina 2 (IL-2), principal vía a través de la cual ejerce su acción inmunosupresora. La inhibición de la secreción de la IL-2 es crucial para el bloqueo de la activación de los linfocitos T y el efecto de la CsA puede contrarrestarse parcialmente por la adición de IL-2 exógena a las células T en cultivo [162, 163].

Las propiedades inmunosupresoras de la CsA permitieron su introducción en 1983 como medicamento para el tratamiento del rechazo renal alogénico, con un profundo impacto en el trasplante de órganos y posteriormente la extensión de su uso terapéutico a Enfermedades Autoinmunes y en la Enfermedad de Injerto contra Huésped [164].

Paradójicamente, la administración de CsA bajo ciertas condiciones experimentales desencadena el desarrollo de Enfermedades Autoinmunes tales como esclerodermia y Enfermedad de Injerto contra Huésped autóloga en ciertas cepas de animales [165, 166]. Este efecto se asocia a defectos en la selección positiva y negativa de timocitos producto a interferencia en la activación de calcineurina y alteración en la expresión de moléculas de MHC clase II y menos de clase I por las células epiteliales tónicas y dendríticas [167, 168]. Estos defectos conducen a la detención de la ontogenia linfocítica [169-171],

Característicamente, la administración por 7 días consecutivos de 1 Omg/kg/día de CsA en ratones BALB/c a partir del día 0 de nacidos, conduce al desarrollo de enfermedades autoinmunes en esta cepa animal normalmente resiste al desarrollo espontáneo de las mismas [28]. Tres meses después del tratamiento los animales desarrollan autoanticuerpos contra células parietales, oocitos

y espermatozoides confirmándose el desarrollo de gastritis y ooforitis por estudio histológico. Este tratamiento provoca la reducción del peso del timo y su celularidad a un tercio del valor normal y fundamentalmente, elimina timocitos CD4+CD8- y CD4-CD8+ aunque retornan sus valores a la normalidad dos semanas luego de concluido el tratamiento. Además, en órganos linfoides periféricos se constata similar linfopenia transitoria que afecta las subpoblaciones celulares CD4+ y CD8+.

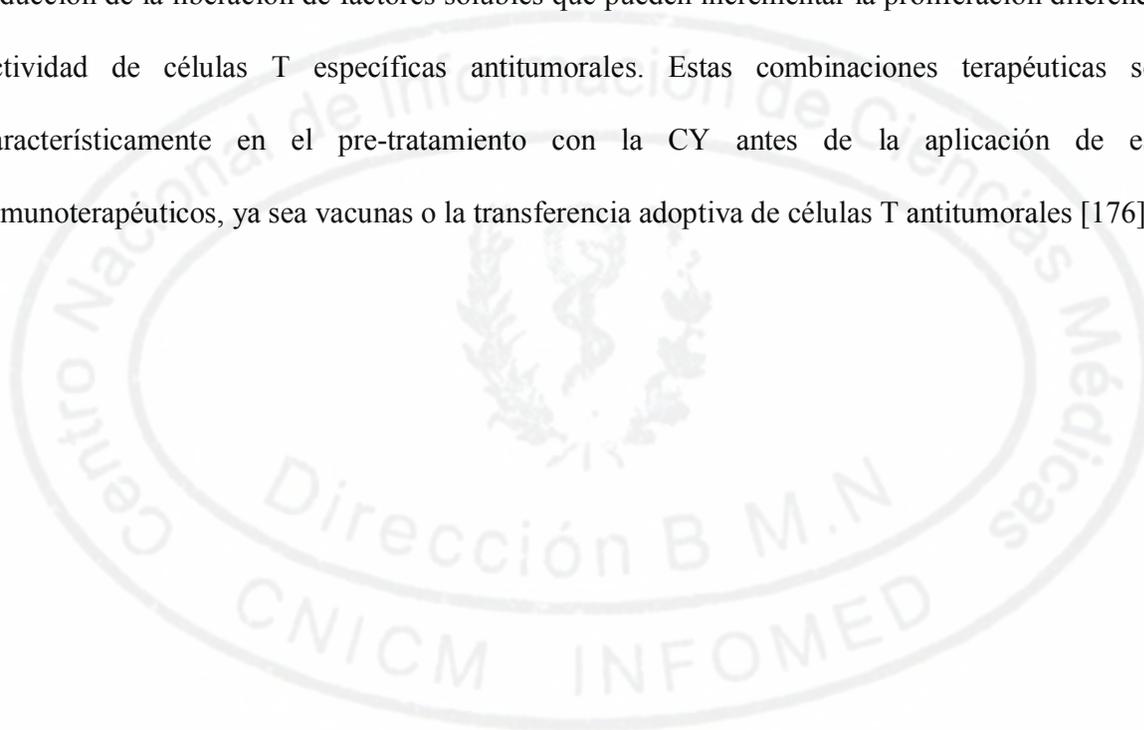
La intensificación de la deficiencia de células T inducida por timectomía un día después de concluido el tratamiento con CsA anteriormente descrito incrementa la incidencia de gastritis y ooforitis, pero además amplía el espectro de las enfermedades autoinmunes inducidas, tales como tiroiditis, insulinitis, adrenalitis, sialoadenitis y orquitis. La intensidad de la respuesta de autoanticuerpos específicos se relaciona con el grado de las lesiones histológicas, observándose destrucción tisular con infiltración de células inflamatorias principalmente mononucleares. La inmunopatología de estas enfermedades autoinmunes es similar a la de enfermedades autoinmunes órgano-específicas humanas. En individuos adultos tales aproximaciones experimentales tienen sólo discreto impacto en la inducción de enfermedades autoinmunes, aun bajo condiciones de inmunosupresión más estrictas [28],

2.1.18. Ciclofosfamida

La Ciclofosfamida (CY) es una fosfamida cíclica que para su activación requiere metabolizarse en el hígado debido a que los sitios alquilantes no se pueden ionizar hasta que se escinde el anillo en los enlaces de fósforo y nitrógeno. La CY es un medicamento quimioterapéutico que se utiliza en el tratamiento del cáncer; aunque es primariamente activo durante la fase S, puede afectar células en todas las fases del ciclo celular. Este agente alquilante provoca linfopenia con nadir

progresivamente más bajo dependiendo de la dosis administrada *in vivo*, aunque no provoca su incremento progresivo con dosis subsecuentes [172, 173],

La administración combinada de la CY durante esquemas de inmunización incrementa la respuesta inmune específica [174], además con esquema de regímenes inmunoterapéuticos presenta efecto sinérgico antitumoral [175]. Diferentes mecanismos han sido propuestos para explicar tal efecto como la reducción de la carga tumoral, la eliminación de células T supresoras inducidas por tumores y la inducción de la liberación de factores solubles que pueden incrementar la proliferación diferenciación y actividad de células T específicas antitumorales. Estas combinaciones terapéuticas se basan característicamente en el pre-tratamiento con la CY antes de la aplicación de esquemas inmunoterapéuticos, ya sea vacunas o la transferencia adoptiva de células T antitumorales [176].



2.2. MATERIALES Y METODOS

Se emplearon varios modelos animales murinos con el objetivo de obtener un conocimiento básico. Se exploró el efecto de la manipulación del SI, mediante la aplicación de terapias inmunosupresoras, sobre la respuesta inmune antígeno-específica en la autoinmunidad y el cáncer. Este trabajo experimental se realizó en el Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba y en el Instituto Weizmann de Ciencia, Rehovot, Israel.

2.2.1. Obtención de formulaciones terapéuticas de AcM inmunosupresores.

2.2.1.1 Hibridomas

Se utilizaron cuatro hibridomas de rata productores de AcM depletantes específicos de diferentes antígenos de diferenciación leucocitarios murinos. Estos hibridomas parentales fueron adquiridos en la ECACC o en la ATCC.

El hibridoma YTS 191.1.1.2 produce AcM dirigidos contra el epítipo A del antígeno murino L3T4, equivalente al CD4 en humanos. El hibridoma YTS 169.4.2.1 produce AcM dirigidos contra el epítipo A del antígeno Lyt-2, equivalente al CD8 de cadena α en humanos [12], Ambos AcM son del isotipo IgG2b. El hibridoma PC 61 5.3 produce AcM de isotipo IgG1 dirigidos contra la cadena α del receptor de IL-2 (CD25) murino [177].

2.2.1.2 Cultivo celular

Las formulaciones de AcM se prepararon a partir de ascitis o de sobrenadante de cultivo celular. Las líneas celulares se resuspendieron en medio de cultivo completo (DMEM o RPMI-1640, Suero Fetal de Ternera del 8 al 20%, L- glutamina 2 mM, Piruvato de sodio 1mM, HEPES 18mM, Carbonato de sodio - NaHCO₃- 26 mM, 2- β -mercaptoetanol 5×10^{-4} M, Penicilina 200 U, y Estreptomicina 200 μ g/ml. Se ajustó el pH a 7.2). Luego se centrifugaron a 1000 r.p.m. (rotor

Rotanta/TR, Hettich), durante 5 min a 25°C, para eliminar el dimetilsulfóxido (DMSO), repitiendo la operación en tres ocasiones. Se determinó la viabilidad celular por tinción con Tripán Azul y se contó el número de células en una cámara de Neubauer (Assistant), según fórmula: Células/ml = (Conteo/4) x Factor de la cámara x Factor de dilución. Las líneas celulares se expandieron *in vitro* a razón de 2×10^5 células/ml en medio de cultivo completo (MCC), en frascos de cultivo de 25 cm² (Corning).

2.2.1.3 Animales

Se utilizaron ratones atímicos NMRI, BALB/c y NOD nu/nu de ambos sexos, entre 6 y 12 semanas de edad y con 20 ± 2 g de peso. Estos son producidos en el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) y en el Centro de Inmunología Molecular (CIM), ambos de Ciudad de La Habana, Cuba y el Instituto Weizmann de Ciencia, Rehovot, Israel. Estos animales fueron mantenidos bajo condiciones gnotobióticas, según los procedimientos normalizados de operación (PNOs) establecidos en los bioterios de estas instituciones.

2.2.1.4 Producción de líquido ascítico

La producción de líquido ascítico se realizó a partir de un modelo xenogénico utilizando los ratones NMRI nu/nu. Estos fueron administrados con 0.2 ml de Pristano o Adyuvante Incompleto de Freund (AIF) (Sigma), tres días antes de la inoculación de los hibridomas. Ambas administraciones se realizaron por vía ip. El inoculo celular se preparó a partir de las líneas de hibridomas expandidas. Estas se desprendieron de forma mecánica y se centrifugaron a 1000 r.p.m. (rotor Rotanta/TR, Hettich), durante 5 min a 25°C. El sobrenadante se conservó como fuente de AcM a -70°C hasta su purificación.

Las células se lavaron tres veces con medio sin suero, en iguales condiciones de centrifugación y se ajustaron por tinción con Tripán Azul a concentraciones que oscilaban entre 1×10^6 y 5×10^6 células/ml/animal. Los animales se evaluaron tres veces por semana y se realizó la extracción del líquido ascítico en el momento de máximo desarrollo del tumor. Se puncionó la cavidad abdominal con una aguja larga No.20, coleccionándose el líquido ascítico en un frasco limpio con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) disódico para evitar la coagulación. Luego se centrifugó durante 20 min a 3000 r.p.m. (rotor Rotanta/TR, Hettich) a 4°C, se desechó la pelleta y se obtuvo el sobrenadante, que se conservó a 4°C hasta completar la recolección. La extracción de líquido ascítico se realizó en días alternos hasta el sacrificio del animal. El sobrenadante se conservó a -70°C.

2.2.1.5 Purificación de los AcM

Los AcM se purificaron a partir del líquido ascítico o del sobrenadante de cultivo. En las muestras de líquido ascítico se eliminó el exceso de lípidos por precipitación con solvente orgánico (Cloroformo). El líquido ascítico se centrifugó a 15000 r.p.m. (rotor A8.20, Centrikon T-124) durante 40 min a 4°C y se diluyó en cloroformo, dejándose reposar durante 15 min. Luego se centrifugó nuevamente a 25000 r.p.m. (rotor A8.20, Centrikon T-124) durante 15 min, a 4 °C, y se dializó en Solución Salina al 0.9% a igual temperatura.

Como método de purificación se empleó la precipitación por sulfato de amonio al 50%, para las muestras obtenidas de la ascitis y del sobrenadante de cultivo, como se describe a continuación. La muestra se diluyó dos veces en Solución Salina al 0.9% y se precipitó a 4°C en Sulfato de Amonio saturado (SAS) hasta una concentración final del 50%, durante toda la noche. Luego se centrifugó a 9800 r.p.m. (rotor A8.20, Centrikon T-124) durante 30 min, a 4 °C. El precipitado se lavó dos veces con SAS diluido al 50% en iguales condiciones de centrifugación y se resuspendió

en Solución Salina al 0.9%. Se dializó contra la misma solución tampón (no menos de 10 veces del volumen de la muestra) por 72 h con agitación continua a 4°C y cambios reiterados (3 ó más) cada día.

Una parte de las muestras de AcM precipitadas por SAS (a partir de líquido ascítico) se purificaron además, por cromatografía de intercambio iónico, en dietilaminoetil Sepharosa (DEAE- Sepharosa), como se describe brevemente. Se dializó la muestra resultante de la precipitación en tampón Tris-HCL 0.05 M, pH=8 con el cual se equilibró la columna (HR 10/10, Pharmacia) de 2 ml de gel (DEAE- Sepharosa Fast Flow, Pharmacia). La muestra se aplicó a la columna a una velocidad de 30 ml/h y se lavó con el mismo tampón. Las proteínas adsorbidas a la matriz se eluyeron con un gradiente lineal de incremento molar de la concentración iónica desde 0 hasta 0.5 M de Cloruro de Sodio en Tris-HCL 0.01 M a pH=8 (Gradient Mixer GM-1, Conductivity Monitor, Pharmacia).

Se determinaron los porcentos de recobrado de las inmunoglobulinas (Igs) de rata en cada uno de los pasos de purificación, según fórmula: % de recobrado = (Cantidad final de Igs / Cantidad inicial de Igs) x 100

2.2.1.6 Control de la calidad

Para comprobar la pureza de las muestras en cada uno de los pasos de purificación se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% en presencia de duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones no reducidas, tomándose un control comercial de anticuerpo IgG de rata (Jackson).

Se determinó la concentración de proteínas por diferentes métodos según el grado de pureza de la muestra. Tomando como base la corrida en SDS-PAGE de muestras de ascitis o semi-purificadas, se calculó el porcentaje que representaba la banda de anticuerpo con respecto al total por

procesamiento de imágenes de geles, mediante el programa de computación Molecular Analyst Software (versión 1.4.1 Bio-Rad). Además, para cada una de las muestras se determinó la concentración total de proteínas según el método de Lowry. A partir de estos datos se estimó la concentración de proteínas para la banda de anticuerpos. Para muestras precipitadas por SAS al 50 % o puras, se estimó la concentración de inmunoglobulinas de rata por densidad óptica a través del coeficiente de extinción de rata (0.687), según fórmula: Concentración de proteínas (mg/ml) = absorbancia a 280 nm x dilución de la muestra x 0.687.

Se utilizó el método de Lowry modificado para microtécnica, lo cual se describe a continuación. En viales Eppendorf se añadieron 10, 30, 50, 70 y 90 μ l de las muestras y del patrón, y se completaron en cada uno de los casos hasta 100 μ l de agua destilada. Como patrón se tomó Albúmina de Suero Bovino al 0.2% (BSA) (Sigma). Cada muestra se montó por duplicado y se le añadió 300 μ l de solución de Sulfato de Cobre (CuSO_4) al 4% C, con agitación y se dejó en reposo durante 30 min. Luego se adicionaron 30 μ l de Folin Ciocatten (Merck) (diluido a la mitad en agua destilada), agitándose rápidamente y se dejó reposar durante 45 min. Después se añadieron 200 μ l de cada vial a los pozos de una placa de ELISA (Costar, High binding) y se midió la absorbancia del producto de la reacción en un lector de ELISA (Organon Technica) a 620 nm.

2.2.2. Evaluación de la actividad biológica *in vitro*

2.2.2.1 Reconocimiento de células mononucleares periféricas

Separación de células mononucleares: se extrajo el bazo a ratones BALB/c adultos y se colocó el órgano fresco en una placa de Petri con 5 ml de tampón salino fosfato (PBS). Se cortó uno de sus extremos y se realizó perfusión del mismo con jeringuilla de 5 ml y aguja #27-28. En tubos de centrifuga de 15 ml (TPP) se aplicó 3 ml de Ficoll-Paque (Pharmacia LKB) y se adicionó muy

lentamente 10 ml de la suspensión de células de bazo, centrifugándose a 2000 r.p.m. (rotor Sepatech, Heraeus), durante 40 min a 20°C. Se aisló el anillo de células sobre la superficie de Ficoll-Paque y se resuspendió en PBS, lavándose en tres ocasiones a 1000 r.p.m. (rotor Sepatech, Heraeus) durante 5 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se ajustó la concentración de células por tinción con Tripán Azul.

Estudio de subpoblaciones linfocitarias: El reconocimiento por los AcM de marcadores de superficie linfocitaria de ratón, para demostrar la actividad biológica *in vitro*, se realizó por la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), descrita a continuación. Las suspensiones de células de bazo de ratón BALB/c se ajustaron a razón de 1×10^6 células en 200 μ l de PBS IX/BSA/Azida en placas de cultivo de 96 pozos de fondo en U (Costar) y se centrifugaron a 1000 r.p.m. (rotor Sepatech, Heraeus), durante 5 min. a 4°C, en tres ocasiones. Las células se incubaron con 50 (al de la muestra (AcM anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25 y como control negativo se utilizó un hibridoma de rata dirigido contra la Eritropoyetina) durante 30 min a 4°C en cámara húmeda, luego se lavaron en tres ocasiones en iguales condiciones de centrifugación. Se incubaron nuevamente con 50 (al de anticuerpo anti-rata biotilado diluido 1/200 (Dako) durante 30 min a 4°C en cámara húmeda y luego se lavaron. La última incubación se realizó con 50 μ l de Estreptavidina-Fluoresceína (FITC) 1/25 (Dako) durante 30 min a 4°C en cámara húmeda y después se lavaron en iguales condiciones. Se añadió una gota de PBS/glicerol y se analizaron cada una de las muestras en el microscopio de fluorescencia (Aristoplan, Leitz) tomándose fotos de algunas de ellas (Orthomat, Leitz).

2.2.2.2 Citotoxicidad dependiente de complemento

La citotoxicidad dependiente de complemento de los AcM se determinó a través de la incorporación de colorantes vitales por tinción con Tripán Azul, a partir de células

mononucleares de bazo de ratones BALB/c adultos, como se describe a continuación. En tubos LP3 se colocó 2×10^6 células en 1 ml de PBS y se centrifugó a 2000 r.p.m. (rotor Sepatech, Heraeus) durante 7 min a 4°C. Luego las células se incubaron con AcM anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD25 a diferentes diluciones (100, 10, 5, 1, 0.5 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 h a 4°C. Como control se utilizó el anticuerpo ior-R3 (reconoce el receptor del EGF humano). Después se lavaron en tres ocasiones en iguales condiciones de centrifugación y se incubaron con complemento de conejo (CENPALAB) a diluciones 1/2 durante 2 h a 37°C. Luego se lavaron nuevamente en tres ocasiones, en iguales condiciones de centrifugación y se determinó la viabilidad celular por tinción con Tripán Azul (66). Para determinar el porcentaje de citotoxicidad se empleó la fórmula: % de Citotoxicidad = $(\text{células muertas} / (\text{células muertas} + \text{células vivas})) \times 100$.

2.2.3. Evaluación de la actividad biológica *in vivo*

2.2.3.1 Depleción de subpoblaciones linfocitarias

Anticuerpos Monoclonales: La demostración del efecto depletante *in vivo* del tratamiento con los AcM anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD25 se realizó utilizando ratones machos BALB/c adultos, los cuales se dividieron en grupos de 5 a 15 animales a los que se les administró 200 μl de los AcM respectivos, a una concentración de 0.5 mg y 1 mg en dosis única, por vía ip e iv. Los grupos controles recibieron IgG normal de rata o Solución Salina al 0.9%.

Agentes quimioterapéuticos: se realizó estudio comparativo del efecto inmunosupresor sobre las células mononucleares periféricas de los AcM obtenidos, con medicamento quimioterapéutico o citostático. Se utilizó la Ciclofosfamida (CY) a dosis entre 50 a 350 mg/kg administradas por vía iv o ip. Todos los tratamientos fueron administrados en dosis única.

Se realizó exéresis quirúrgica del bazo y extracciones de sangre periférica a través del plexo retro-ocular a razón de 200 μl por animal como fuente de células linfoides. Para la extracción

sanguínea se emplearon capilares de microhematocrito heparinizados y viales Eppendorf que contienen 10 μ l de EDTA disódico como anti-coagulante. Las extracciones se realizaron los días -1, 1, 2, 3, 7 y 14 del experimento, tomando como día 0 la fecha de administración del AcM respectivo.

2.2.3.2 Citometría de Flujo

Se realizó este análisis para verificar la eficiencia de los protocolos de depleción de células T y seguir la repoblación linfoide en periferia. Se evaluó la expresión de antígenos de diferenciación leucocitaria sobre la superficie de linfocitos a partir de sangre periférica y células de bazo por el método directo de doble mareaje, el cual se describe a continuación.

En viales independientes se aplicaron 50 μ l de la muestra y se le adicionó 1 μ l de AcM conjugados, anti-CD4 Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) o Ficoeritrina (R-PE), anti-CD8 R- PE, anti-CD25 FITC y sus combinaciones (PharMingen, San Diego, CA). Las muestras de sangre se incubaron 30 min en cámara oscura en baño de hielo y seguidamente se aplicó 1 mL de Solución Lisante de hematíes durante 10 min a temperatura ambiente. El análisis citofluorométrico se realizó con un Citómetro de Flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) y los datos fueron analizados con el programa de computación Lysys II software.

2.2.4. Modelo de Encefalitis Autoinmune Experimental

2.2.4.1 Animales

Se utilizaron ratones de la cepa salvaje C57BL/6 H-2^b hembras entre 8 y 12 semanas de edad, obtenidos del animalario del Instituto Weizmann de Ciencia, Rehovot, Israel. La reproducción y mantenimiento de los animales se realizó bajo condiciones convencionales (libre de gérmenes no específicos), recibiendo una dieta regular y el agua sin antibióticos.

2.2.4.2 Inmunógeno

El péptido 35-55 (p35-55) con la secuencia de aminoácidos MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK de la Glicoproteína de Mielina/Oligodendrocito (MOG) se sintetizó en el Instituto Weizmann de Ciencia, Rehovot, Israel [178]. La pureza del péptido fue mayor del 90%.

2.2.4.3 Estudios *in vivo* en el modelo murino de la EAE

Inducción de EAE: se inmunizaron los ratones por vía se los días 0 y 7 en dos sitios con 200 µg del péptido del MOG emulsionado en Adyuvante Completo de Freund (CFA; Difeo) suplementado con el *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA inactivado por calor (500 µg por ratón; Difeo) en un volumen total del 100 µL. Estos recibieron además 200 ng de la toxina del bacilo *Bordetella pertussis* (List Biological, Campbell, California, USA) en 200 µL de PBS en la vena de la cola inmediatamente tras la inmunización y 72 h después [49],

Para inducir la depleción transitoria de células T células CD4+, CD8+ y CD25+ los animales recibieron una dosis de 1mg de AcM en 0.2ml en la vena de la cola. Los controles recibieron IgG normal de rata o Solución Salina al 0.9%.

Evaluación clínica de la EAE: los ratones fueron examinados diariamente y la expresión clínica de la enfermedad se estratificó en una escala de 0-5 con las gradaciones de 0.5 para valores intermedio. Los signos clínicos puntuaron según los siguientes criterios: grado 0 = sin enfermedad, grado 1 = debilidad o parálisis de la cola, grado 2 = paraparesis de las extremidades posteriores o hemiparesis, grado 3 = parálisis de las extremidades posteriores o hemiparálisis, grado 4 = parálisis completa (tetraplegía), grado 5 = estado moribundo, o muerte.

2.2.4.4 Estudios *in vitro*

Respuesta de anticuerpos: Los anticuerpos anti-MOG fueron evaluados por ensayo de ELISA utilizando placas de microtitulación con fondo plano (Maxisorb, Nunc, Denmark) según

protocolo descrito previamente [52], Brevemente, las placas fueron recubiertas toda la noche 500ng / pozo del péptido 35-55 del MOG en buffer carbonato a 4°C y luego para el bloqueo se utilizó leche descremada al 1% por lh a 37°C. EL reconocimiento de los anticuerpos se detectó utilizando un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con Fosfatasa Alcalina (Jackson ImmunoResearch, USA). Las placas fueron reveladas con el sustrato p-nitrofenilfosfato (Sigma, Israel) y la absorbancia se midió a 405 nm utilizando un lector de placas de ELISA.

Respuesta celular: La respuesta proliferativa anti-MOG se evaluó *in vitro* utilizando células de bazo no fraccionadas. Se tomaron los esplenocitos 56 días después de la primera inoculación y 3×10^5 células por pozo se incubaron como se describió previamente [49, 179] por cuádruplicado en placas de fondo redondeado (Nunclon, Nunc, Denmark) por 72 h en presencia de diferentes concentraciones del péptido del MOG p35-55 o Albúmina de Suero Bovino. Posteriormente se le añadió a los cultivos la [³H]Timidina (0.5 μCi de 5 mCi/mmol; Amersham, England) durante las últimas 18 h de incubación. La Concanavalina A (Con A; Sigma) 1.25 [μ/ml se utilizó como control positivo. Seguidamente se cultivaron las células y se determinaron los conteos por minuto (cpm). Los resultados se expresaron como Índice de Estimulación calculado como la media de los cpm de los cultivos incubados con Ag dividido por la media de las cpm de los cultivos incubados sin Ag.

Citocinas: La producción de IL-2, IL-4, IL-10 e IFN-γ se evaluó en los sobrenadantes coleccionados a las 72 h de cultivo por ELISA según instrucciones del juego diagnóstico comercial (Pharmingen, San Diego, USA). Las muestras se analizaron utilizando el par apropiado de AcM de captura y detección y la concentración de las citocinas se determinaron en pg/ml en base a una curva de calibración construida utilizando cantidades conocidas de las correspondientes citocinas recombinantes (Pharmingen). Los resultados se expresaron como un

índice de la cantidad de la citocina producida por la estimulación dividida por la cantidad producida en ausencia del péptido 35-55 del MOG.

2.2.5. Estudios *in vivo* de la respuesta inmune en el modelo del EGF

2.2.5.1 Inmunógeno

Se utilizó el Facto de Crecimiento Epidérmico humano obtenido por tecnología recombinante (EGF hu/rec) (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba). El EGF murino (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania) se utilizó para evaluaciones *in vitro*.

2.2.5.2 Animales

Ratones BALB/c H-2^d adultos (8 a 12 semanas), machos, de 20 ± 2 g de peso, procedentes del CENPALAB y mantenidos en el bioterio del CIM con las condiciones de alimentación y manipulación establecidas en los PNO según las Buenas Prácticas de Trabajo con Animales de Experimentación.

2.2.5.3 Inducción de tolerancia al EGF hu/rec

Para demostrar la capacidad inmunorreguladora de los AcM anti-CD4 y anti-CD8, se determinó la respuesta humoral contra un antígeno proteico, específicamente el EGF hu/rec, en animales tratados con estos AcM. Se emplearon grupos de 5 ratones machos BALB/c adultos según los diferentes AcM en evaluación. Se administró 200 μ /dosis de cada AcM a una concentración de 2.5 mg/ml, en tres dosis consecutivas, por vía iv (plexo retro-ocular o vena de la cola) la primera e ip las otras dos. El grupo control fue tratado de igual forma, pero recibió Solución Salina al 0.9%. Dos días después de terminado el tratamiento todos los grupos fueron inmunizados con 200 μ l de EGF hu/rec, a una concentración de 500 mg/ml, en dosis única, por vía ip. El día 80 del

experimento los animales recibieron un segundo reto con EGF hu/rec, a una concentración de 50 mg/ml, por igual vía.

Se realizaron extracciones de sangre del plexo retro-ocular el día 0 y los días 10, 24, 38 y 48 posteriores a la inmunización con EGF hu/rec, a razón de 200 µl por animal. Además se extrajo sangre nuevamente el día 90 del experimento. A partir de la sangre se obtuvieron sueros, como se describe a continuación. Con capilares de microhematocrito heparinizados se extrajo la sangre hacia viales Eppendorf secos y se mantuvo en reposo durante 1 h a 37 °C y luego 1 h a 4 °C, para lograr retracción del coágulo. Luego se centrifugó a 3000 r.p.m. (rotor Mikroliter, Hettich) durante 10 min a 20 °C. Se extrajo el suero y conservó a -20 °C.

2.2.5.4 Estudio de la influencia de las depleciones de subpoblaciones linfoides sobre la respuesta de anticuerpos contra el preparado vacunal que contiene el EGF hu/rec

Se analizó la influencia de la depleción de células linfoides periféricas sobre la respuesta inmune humoral antígeno-específica en el mismo modelo animal. El diseño implicó el uso combinado de los agentes inmunosupresores con dos administraciones del preparado vacunal. Se ejecutaron dos esquemas de experimentación teniendo en cuenta el momento en que se realizó la terapia inmunosupresora respecto a la vacunación con el preparado vacunal de EGF hu/rec. En el esquema 1, la inmunosupresión se efectuó en el día 0 del experimento y posteriormente se administraron dos dosis del preparado vacunal. La primera dosis en Adyuvante Completo de Freund (ACF) en el día 3 al 5 y la segunda en Adyuvante Incompleto de Freund (AIF), 14 días después. En el esquema 2 se administró inicialmente una primera dosis del inmunógeno en ACF seguida de la inmunosupresión 14 días después. Por último se aplicó una segunda dosis del preparado vacunal en el día 3 al 5 posterior a la terapia supresora.

Para cada esquema se utilizaron cuatro grupos de animales con cinco o más animales por grupo. Tres grupos recibieron los diferentes tratamientos basados en el agente inmunosupresor utilizado y el grupo control recibió Solución Salina. Los cuatro grupos de ambos esquemas recibieron la administración de dos dosis del preparado vacunal. Las terapias inmunosupresoras fueron suministradas por vía iv y el preparado vacunal por vía se, realizándose extracciones de sangre los días 0, 19, 33 y 47 del experimento según el siguiente diseño experimental.

Los AcM anti-CD4 y anti-CD8 se administraron a 0.5 mg/dosis. La CY se administró a la dosis de 250 mg/kg, todos en volumen final de 200 μ l. EL preparado vacunal contenía 50 μ g de EGF hu/rec por dosis.

Esquema 1: Inmunosupresión + Vacuna + Vacuna

Inmunosupresión:	⇓					
Vacunas:		↓		↓		
Días:	0	3-5	14	19	33	47

Esquema 2: Vacuna + Inmunosupresión + Vacuna

Inmunosupresión:			⇓			
Vacunas:	↓			↓		
Días:	0	5	14	17-19	33	47

2.2.6. Estudios *in vitro* de la respuesta inmune en el modelo del EGF

Titulación de la respuesta de anticuerpos anti-EGF hu/rec: La presencia de anticuerpos se estudió mediante técnicas de ELISA (Enzimed Linked Inmunosorbent Assay) diseñadas para ello [62, 63]. Las placas de ELISA de 96 pozos (Costar, High Binding, USA) se recubrieron con 50 μ l/pozo de EGF hu/rec (10 μ g/ml), diluido en tampón de recubrimiento y se incubó durante toda la noche a 4°C ó durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Se lavó con 200 μ l de solución de tampón fosfato-Tween 0.05%, se bloqueó durante 1 h a 37°C con tampón fosfato-Tween-suero de

temerá 5% y se repitieron los lavados de la forma descrita. Se añadió cada muestra de suero diluida en tampón fosfato-Tween-suero de ternera 5% a razón de 50 μ l/pozo, se incubó 1 h a 37 °C en cámara húmeda y se repitió el lavado. Se adicionaron 50 μ l/pozo del anticuerpo anti- inmunoglobulinas de ratón (IgG+IgM) conjugado con Fosfatasa Alcalina (Jackson) diluido en tampón fosfato-Tween-suero de ternera 5% (1:5000), se incubó durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda y se lavó de igual modo. Se añadió el sustrato Para-nitrofenilfosfato (Sigma), disuelto en tampón de Dietanolamina (1 mg/ml) (50 μ l/pozo) y se incubó durante 20-30 min antes de leer a 405 nm en un lector de ELISA (Organon Teknica).

La respuesta de anticuerpos séricos contra el EGF hu/rec fue titulada por diluciones seriadas de las muestras. En cada ensayo se utilizaron controles positivos y negativos. Como control positivo se empleó un suero de ratón previamente inmunizado, con altos niveles de anticuerpos contra EGF, en dilución 1/10000. Como control negativo se usó suero de animales no inmunizados y como blanco tampón fosfato-Tween-suero de ternera 5%, que fue el disolvente empleado en la preparación de los sueros. Todas las muestras, en las diluciones descritas, se evaluaron por duplicado en cada placa de ELISA. Se tomó como valor positivo aquella lectura de densidad óptica mayor que la suma del valor promedio de las muestras en el tiempo cero con tres desviaciones estándar. Se reportó el título correspondiente a la mayor dilución en que los sueros resultaron positivos.

Caracterización de las subclases de IgG: Para el estudio de las subclases de IgG de la respuesta anti-EGF hu/rec se utilizó el método inmunoenzimático anteriormente descrito pero se sustituyó el anticuerpo conjugado por los anticuerpos anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b y anti-IgG3, conjugados con Biotina, en correspondencia con la subclase a identificar y se reveló con el sistema estreptavidina-FITC (PharMingen).

Titulación de la respuesta de anticuerpos anti-EGF murino: Para el estudio de la respuesta anti-EGF murino, se utilizó el mismo método enzimático pero se recubrió con EGF murino ($1\mu\text{g/ml}$) diluido en tampón de recubrimiento.

2.2.7. Manipulación terapéutica inductora de linfopenia transitoria *in vivo* en modelos tumorales murinos

2.2.7.1 Animales

Ratones BALB/c y BALB xid fueron reproducidos y mantenidos bajo condiciones convencionales (libres de patógenos no específicos) en el bioterio del CIM y se utilizaron en grupos concordantes en sexo y edad.

Los parentales de la cepa BALB xid fueron gentilmente cedidos por la Dra. Paola Minoprio de la Unidad de Parasitología Experimental del Instituto Pasteur, París, Francia. Durante la experimentación los animales se mantuvieron bajo condiciones convencionales, recibiendo una dieta estándar de alimentación y agua sin antibióticos. La manipulación se realizó según las Buenas Prácticas de Trabajo con Animales de Experimentación establecidas en los PNO del CIM.

Los parentales de la cepa BALB/c, así como los animales para la experimentación con sujetos adultos de la misma cepa (8 a 12 semanas de edad) y peso de $20 \pm 2\text{g}$ fueron procedentes del CENPALAB. Para la obtención de animales neonatos para la experimentación, ratones adultos de ambos sexos fueron pareados sincronizadamente en el bioterio del CIM y los grupos experimentales se establecieron según el momento de nacimiento.

2.2.7.2 Tumor Ascítico de Ehrlich

El Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) es un carcinoma de origen mamario de la cepa de ratón BALB/c [180], Esta línea tumoral se mantuvo por pase *in vivo* a través de trasplantes seriados en

ratones singénicos y en este estudio se emplearon las células generadas hasta en el quinto trasplante. Se realizó la extracción de ascitis (según método descrito con anterioridad) y se ajustó la concentración de células por tinción con Tripán Azul. El modelo tumoral consistió en la administración a ratones BALB/c neonatos de 5×10^4 células del TAE en 50 μ l de PBS y en ratones BALB/c adultos se administraron con 2×10^5 células de TAE en 200 μ l de PBS; en ambos casos la inoculación se realizó en la porción dorsal caudal por vía se. A estas dosis se logró un 100% de prendimiento con inducción de tumoración sólida en el sitio de inoculación.

2.2.7.3 Inmunosupresión en el modelo del TAE

Neonatos: La inoculación del TAE se realizó siempre dentro de las 72 h del nacimiento del animal y simultáneamente se inició la administración de la Ciclosporina A (Sandoz) a la dosis de 10mg/kg de peso de animal, disuelta en 50 μ l de Aceite de Oliva (Sigma) por vía ip. Similar dosis de CsA se administró por 7 días y el grupo control sólo recibió el Aceite de Oliva. Cada grupo constó de al menos 15 animales.

Adultos: Se evaluó el efecto de la inmunosupresión con AcM combinados o no con la CsA. Los animales se inocularon el día 0 del estudio con el TAE y al cuarto día comenzó el tratamiento. Los grupos de animales se establecieron según tratamiento y constaron de 10 ó más animales cada uno. Los animales recibieron tres dosis consecutivas de AcM anti-CD4 y anti-CD8 (200 μ l/dosis), con una dosis diaria de 0.5 mg por vía iv (plexo retro-ocular) la primera, e ip las otras dos. El grupo control se trató de igual forma, pero recibió Solución Salina al 0.9%.

A continuación del ciclo con AcM, cada grupo se subdividió para continuar tratamiento con Ciclosporina A (Sandoz) disuelta en Aceite de Oliva (Sigma) o con el diluyente. La Ciclosporina A se administró a razón de 10 mg/kg de peso, en dosis contenida en un volumen final de 200 μ l. Se aplicó una dosis diaria durante 7 días, por vía ip.

2.2.7.4 Monitoreo del crecimiento tumoral y la sobrevida

El diámetro tumoral se monitoreó en el tiempo. Los ratones que presentaban tumor palpable se consideraron como positivos. El tamaño tumoral se midió en milímetros usando un pie de rey; se midió el diámetro mayor del tumor (a) y el diámetro perpendicular a este (b) y el tamaño del tumor se reportó como el producto $a \times b$ (mm²). La sobrevida fue objeto de seguimiento diario durante el curso del experimento.

2.2.7.5 Análisis histológico en el modelo del TAE

Se practicó la necropsia en los animales a las dos semanas de concluido el tratamiento con CsA. Se realizó estudio histológico del tejido subcutáneo en el sitio del desafío con el TAE. Los fragmentos de tejido se fijaron en una Solución de Formalina al 10% e incluidos en bloques de parafina, posteriormente fueron seccionados cada 5 micras y teñidos con hematoxilina y eosina. El análisis histológico se realizó a 100x y 200x de visión.

2.2.7.6 Carcinoma Pulmonar de Lewis

El Carcinoma Pulmonar de Lewis o 3LL es un tumor espontáneo aparecido en un ratón C57BL y se utiliza como modelo murino de tumor trasplantable. La variante DI22 es un clon poco inmunogénico y altamente metastásico en ratones C57BL/6 singénicos. Estas células expresan bajos niveles del antígeno H-2K^b del MHC clase I [181].

2.2.7.7 Determinación de la expresión del receptor de EGF en la línea celular 3LL-D122

La expresión del receptor de EGF se evaluó en células tumorales 3LL-D122 mantenidas en cultivo. Se tomaron 1×10^6 células y previo lavado con PBS se extrajo el ARN con Trizol (Gibco). Para la reacción de amplificación en cadena de la polimerasa, con reverso transcripción previa (RT-PCR) se utilizó $1 \mu\text{g}$ total de ARN de la línea celular y se procedió según las condiciones recomendadas por el fabricante del juego comercial *Access RT-PCR* (Promega).

Se utilizaron los siguientes juegos de oligonucleótidos específicos sintetizados en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba. Para el receptor de EGF murino (directo 5' ATG TGC AAA GGA ATT ACG ACC TTT, 264-288; reverso 3' GCA ACT GCT CGG ATG GCT CTG TAA, 620-596). Las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa fueron las siguientes, previamente se desnatura el ADN complementario por espacio de 4 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 60 °C (hibridación de los oligonucleótidos) y 1 minuto a 72 °C para la extensión. El producto de este PCR es una banda de 332 pares de bases, correspondientes al dominio extracelular de ese receptor.

Como control se utilizó el gen de la enzima Gliceraldehído 3 Fosfatodeshidrogenasa (GPDH) (directo 5' ATC TCT GCC CCC TCT GCT GAT 3'; reverso 5' AGT GTA GCC CAG GAT GCC CTT 3'). Para este juego de oligonucleótidos se usaron las mismas condiciones que en el PCR anterior, con excepción de la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos que fue de 58 °C. El producto de este PCR es una banda de 440 pares de bases. En la electroforesis se utilizó un marcador comercial de peso molecular de 100 pares de bases (Biolabs).

2.2.7.8 Inmunoterapia combinada en el modelo del 3LL-D122

Inmunógeno: se utilizó un preparado vacunal que contiene 4µg ó 7µg equivalentes del Factor de Crecimiento Epidérmico humano conjugado a la proteína P64k de la *Neisseria meningitidis* (EGF-P64k) en los adyuvantes Montanide ISA 51o Alúmina.

Evaluación de la respuesta contra el EGF hu/rec contenido en el preparado vacunal EGF- P64k:

Grupos de al menos cinco ratones C57BL/6 se inyectaron por vía im con el preparado vacunal EGF-P64k (100 µl volumen final) y dos semanas después se re-inmunizaron por vía im con una segunda dosis de dicha vacuna. A un grupo de estos animales se les inoculó el tumor

singénico 3LL-D122 (2×10^5 células/animal) en la almohadilla plantar derecha 2 días previos a la primera inmunización.

Protocolo de terapia combinada antitumoral: Se inocularon los animales con el tumor 3LL- D122 (2×10^5 células/animal) en la almohadilla plantar derecha. La evolución del tumor se evaluó por medición de sus diámetros cada 3 días y se practicó cirugía del tumor primario (amputación) cuando alcanzó los 8-9 mm de diámetro. Dos días posterior a la inoculación del tumor se inocularon los ratones por vía im con el preparado vacunal EGF-P64k (100 μ l volumen final) y dos semanas después tratados por vía iv con una dosis de 50 mg/kg de CY, con 1mg de Anticuerpos Monoclonales (AcM) depletantes anti-CD4, anti-CD8 o anti-CD25 o con Solución Salina al 0.9% que se utilizó como control. Tres días más tarde, los ratones fueron re- inmunizados por vía im con una segunda dosis de la vacuna de EGF-P64k.

Respuesta anti-metastásica: Se inocularon ratones C57BL/6 con el tumor singénico 3LL-D122 (2×10^5 células/animal) en la almohadilla plantar derecha. La evolución del tumor se evaluó por medición de sus diámetros cada 3 días y se practicó cirugía del tumor primario (amputación) cuando alcanzó los 8-9 mm de diámetro. Se evaluó sistemáticamente la sobrevida de los animales, que depende del desarrollo de metástasis pulmonares espontáneas [181].

Esquema VIV antitumoral:

	3LL-D122 Inoculación	3LL-D122 Crecimiento Local	Vacuna 1 ^{ra} dosis	IS	Vacuna 2 ^{da} dosis	Tumor Primario Ø 8-9mm	Metástasis o Sobrevida
	↓	↓↓↓↓↓	↓	↓	↓	✂	✂
Día	0	Cada 3 días	+ 2	+ 16	+ 19	~25 a ~29	+ 21

Evaluación de la respuesta de anticuerpos anti-EGF hu/rec: Los títulos individuales de respuesta de anticuerpos IgG+IgM por cada grupo al día 47 posterior a la primera inmunización se evaluaron por ELISA siguiendo el procedimiento establecido [62, 63].

2.2.8. Análisis de los resultados y procesamiento estadístico

Los resultados cuantitativos se tabularon y procesaron utilizando métodos estadísticos descriptivos. Todos los valores del índice clínico de la EAE se expresan como medias aritméticas \pm SEM, al igual que las respuestas de anticuerpos, las respuestas proliferativas celulares y la producción de IFN- γ . Las comparaciones se realizaron según Prueba de *t* de Student y el análisis de varianza (ANOVA), así como comparaciones pareadas utilizando las pruebas de Tukey-B, Bonferroni y Duncan. Valores de $p < 0.05$ se consideraron que representaban una diferencia significativa.

En los experimentos de titulación del suero por método de ELISA se calculó la media de los valores obtenidos en los duplicados de cada muestra y se consideraron como títulos los valores superiores a la media obtenida pre-inmunización (tiempo 0) más tres desviaciones estándares. Se graficaron los resultados expresados como media geométrica y la desviación estándar utilizando el programa de computación GraphPad Prism™ Versión 2.00. Las comparaciones de los títulos entre 3 ó más grupos se determinó por el método de ANOVA no paramétrico (Prueba de Kruskal- Wallis) y la comparación entre pares de grupos según Prueba de Comparaciones Múltiples de Dunn. La diferencia entre dos grupos se evaluó según la Prueba de Mann-Whitney. Para los análisis estadísticos se utilizó el programa de computación GraphPad InStat® Versión 3.05. Se consideró como significativo los valores de $p < 0.05$. Se determinó la media y la desviación estándar a todos los valores de tamaño tumoral y las comparaciones se realizaron por el Prueba

de t de Student. Las figuras muestran la media del tamaño tumoral con las barras de error que representan el SEM entre los animales que componen cada grupo. Las curvas de sobrevida se construyeron por el método de Kaplan-Meier y se compararon las curvas de sobrevida con la Prueba de Log-rank (la $p < 0.05$ se consideró como una diferencia significativa). Se grafican los resultados representando el porcentaje de animales que sobreviven (ordenadas) en cada momento después del trasplante del tumor (abscisas).



2.3. RESULTADOS

2.3.1. Capítulo 1. Producción y caracterización de los tratamientos inmunosupresores.

2.3.1.1 Producción de formulaciones enriquecidas en Anticuerpos Monoclonales de rata depletantes de subpoblaciones linfoides murinas.

A partir de las líneas comerciales de hibridomas de rata YTS 191.1.1.2, YTS 169.4.2.1 y PC 61 5.3 productoras de AcM anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD25 murino respectivamente, se produjeron formulaciones terapéuticas para tratamiento *in vivo*. Estas líneas celulares fueron expandidas tanto *in vivo* como en cultivo celular. En ratones atímicos NMRI, BALB/c y NOD se produjo líquido ascítico que contenía los AcM respectivos. El prendimiento de los hibridomas se observó aproximadamente a los 10 días de la inoculación y la concentración para la cual se obtuvo un mejor rendimiento por mililitro de ascitis por animal fue de 2×10^6 células/ml. Para esta concentración, aunque no se obtuvo el mejor prendimiento, el volumen de ascitis producida fue el más alto. Además, no se produjeron tumoraciones sólidas, las cuales se observaron en más de un 20% de los animales cuando se administraron concentraciones mayores del inoculo celular. La concentración promedio de inmunoglobulinas de rata en el líquido ascítico se encontró en el rango 10 a 11 mg/ml.

En el proceso de purificación del líquido ascítico, primeramente se eliminaron los lípidos por precipitación con solvente orgánico (Cloroformo), evitándose de esta forma la formación de agregados y la turbidez de la solución. Después, y como principal método de purificación, se empleó la precipitación con el Sulfato de Amonio al 50% debido a que las inmunoglobulinas secretadas por estos hibridomas de ratas presentan muy baja afinidad por las proteínas A y G, lo que impide su utilización. La precipitación con el Sulfato de Amonio eliminó la mayor parte de la albúmina y la transferrina, principales impurezas del líquido ascítico, lográndose como promedio

un 67 % de pureza para estos anticuerpos. El recobrado promedio se encontró en el rango del 80 al 83 %. Una parte de las muestras precipitadas fueron además purificadas por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sepharosa, en busca de un mayor grado de pureza. Por este método el recobrado fue muy bajo, alcanzando sólo un 35 % aproximadamente. Por SDS-PAGE se obtuvo una banda mayoritaria de anticuerpo y ligeras trazas de contaminantes, lo que representó un 89 % de pureza como promedio, muy similar a la pureza de la IgG comercial de rata (Jackson) que se usó como patrón, con un 90 %.

Además, las líneas comerciales de hibridomas de rata YTS 191.1.1.2 y YTS 169.4.2.1 se expandieron *in vitro* para obtener el sobrenadante de cultivo enriquecido en AcM. Como método de purificación en este caso, se empleó también la precipitación por Sulfato de Amonio al 50%, con niveles de recobrado del 40%.

2.3.1.2 Actividad biológica *in vitro* e *in vivo* de los AcM

El éxito de la aplicación de formulaciones enriquecidas de AcM en esquemas de tratamiento esta condicionado a la demostración de la preservación de la actividad biológica de las moléculas durante el proceso de producción. Para la expansión *in vivo* de estos hibridomas se utiliza rutinariamente la rata DAxLOU, no obstante en el presente trabajo se utilizaron otros modelos animales al no disponerse del modelo de referencia, por lo que fue necesario demostrar que se mantenía la actividad biológica *in vitro* e *in vivo*.

En la Figura 2-1 se resume el proceso de caracterización de la actividad biológica a la que fueron sometidos los AcM depletantes de interés. Cada lote de AcM obtenido se caracterizó *in vitro* y su efecto depletante *in vivo* se evaluó de igual forma en las cepas animales BALB/c y C57BL/6. En la Figura 2-1A se muestra, a través de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), el

reconocimiento por el AcM anti-CD4 de la subpoblación linfoide correspondiente en células de bazo de ratones adultos, observándose un patrón de fluorescencia periférica que se manifiesta por un halo en la superficie celular.

La capacidad depletante por fijación del complemento sérico de este AcM se evaluó *in vitro* por la técnica de Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC). Se calculó el porcentaje de lisis celular por incorporación del colorante vital Tripán Azul y por conteo de la subpoblación celular específica por Citometría de Flujo (FACS) previa incubación de células mononucleares de bazo de ratones adultos con el AcM y en presencia de Complemento de conejo.

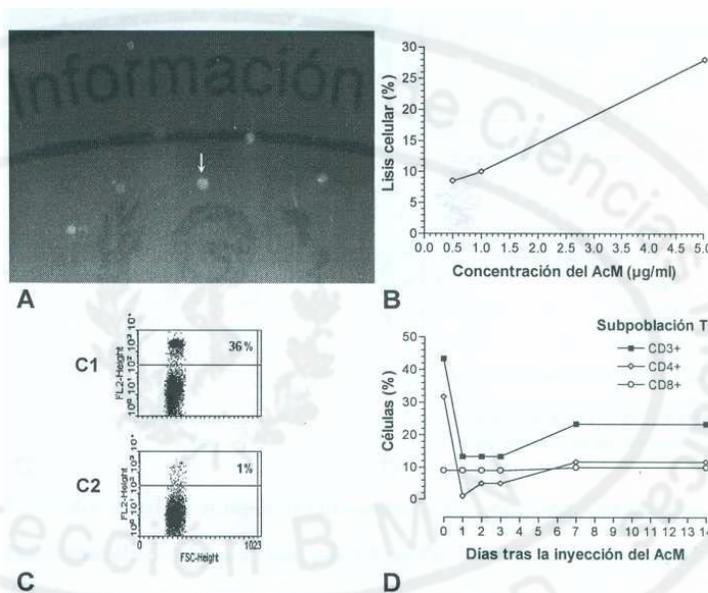


Figura 2-1. Actividad biológica de la formulación terapéutica del AcM anti-CD4. A)

El establecimiento de la dependencia de la dosis *in vitro* del efecto depletante del AcM (Figura 2-IB) facilitó el ajuste de la dosis de AcM a administrar *in vivo* para

Reconocimiento de células de bazo por IFI (la flecha señala una célula positiva), B) Dependencia de la dosis de AcM para la CDC inducida en células de bazo, C) Corroboración del efecto depletante por FACS (se muestra análisis en células de bazo a las 72 h de la administración *in vivo* C1) Solución Salina - C2) AcM anti-CD4), D) Cinética de subpoblaciones T en sangre periférica tras depleción transitoria de células CD4+ (se muestra la media de tres animales) evaluada por FACS

garantizar una reducción mayor del 80% de la cantidad total de la subpoblación linfoide T correspondiente a cada AcM en órganos linfoides

periféricos (sangre y bazo) (Figura 2-1C).

La actividad biológica *in vivo* de los AcM se demostró según protocolo de depleción en animales adultos a los que se les administró una dosis única de anticuerpo por vía ip o iv en el rango entre 0.5 a 1 mg de AcM. Se

evaluó además la dinámica de recuperación de subpoblaciones linfoides.

En la Figura 2-ID se muestra la cinética del efecto depletante del AcM anti-CD4 en sangre periférica. Se observó la depleción de las subpoblación T CD4+

en más de un 95 % a las 24 h del tratamiento. A las 72 h los niveles de depleción se

mantuvieron en un 90 % aproximadamente. Se observó una recuperación paulatina del número de

linfocitos durante los 14 días siguientes, con aproximadamente el 40% de recuperación. La especificidad del tratamiento inmunosupresor se demostró al no observarse modificación del número de linfocitos CD8+ (Figura 2-ID).

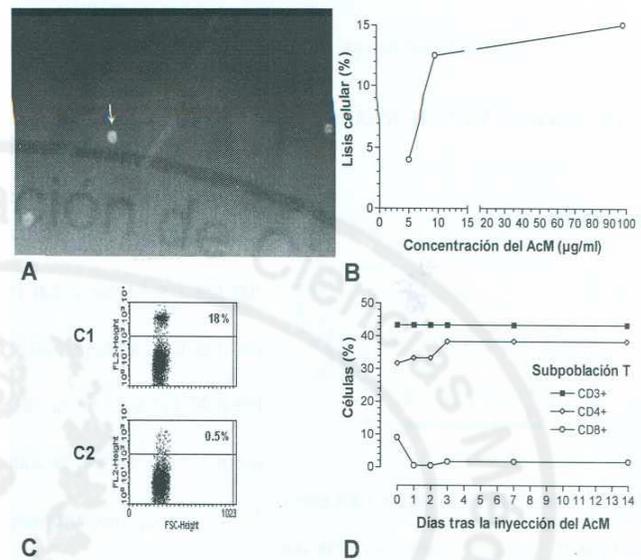


Figura 2-2. Actividad biológica de la formulación terapéutica del AcM anti-CD8. A)

Reconocimiento de células de bazo por IFI (la flecha señala una célula positiva), B) Dependencia de la dosis de AcM para la CDC inducida en células de bazo, C) Corroboración del efecto depletante por FACS (se muestra análisis en células de bazo a las 72 h de la administración *in vivo* C1) Solución Salina - C2) AcM anti-CD8), D) Cinética de subpoblaciones T en sangre periférica tras depleción transitoria de células CD8+ (se muestra la media de tres animales) evaluada por FACS

Similar evaluación se realizó de las formulaciones obtenidas con los AcM anti-CD8 y anti-CD25. En la Figura 2-2A se muestra el reconocimiento de células de bazo del AcM anti-CD8 por técnica de IFI. La lisis celular inducida por el AcM anti-CD8 se evaluó por CDC en células esplénicas. La capacidad depletante de este AcM fue inferior al AcM anti-CD4, requiriendo mayores concentraciones de anticuerpo para inducir la lisis del 15 % de las células blanco.

La actividad biológica *in vivo* se evaluó tras administración del AcM anti-CD8 tanto por vía ip o iv, lográndose depleción de más del 80 % de la subpoblación celular específica en bazo (Figura 2-2C) o en sangre periférica en el rango de 0.5 a 1 mg por dosis (Figura 2-2D). Con este esquema se logró una depleción linfoide de más de un 98 % a las 24 h del tratamiento, para ambos anticuerpos. A las 72 h los niveles de depleción se mantuvieron en un 90 % aproximadamente. Se observó una recuperación paulatina del número de linfocitos durante los 14 días

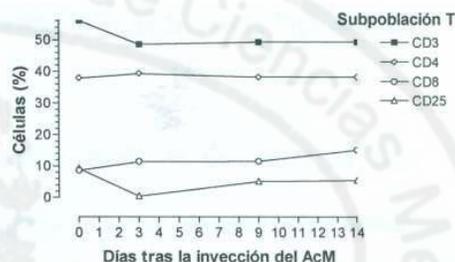


Figura 2-3. Cinética de subpoblaciones T en bazo tras depleción transitoria con el AcM anti-CD25 (se muestra la media de tres animales) evaluada por FACS

de seguimiento, la cual fue más evidente en el grupo tratado con el anti-CD4, con un 40% de recuperación (Figura 2-ID), comparado con solo un 20% en el grupo tratado con el anti-CD8 (Figura 2-2D). En este último grupo se observó además, que el tratamiento inmunosupresor no sólo produjo una disminución intensa del número de linfocitos CD8, sino que esto se acompañó de un discreto aumento de la subpoblación CD4, de manera que el número total de linfocitos T se mantuvo aproximadamente igual.

En las Figura 2-ID, Figura 2-2D y Figura 2-3 se muestran, en gráficos obtenidos por FACS, los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos T de órganos linfoides periféricos en ratones

normales. Estos porcentajes de linfocitos se reducen drásticamente en animales tratados con los anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD25. El grado de depleción alcanzado a las 24 h del tratamiento con anti-CD4 se muestra en la Figura 2-ID, donde persiste solo el 0.6 % de linfocitos T CD3+CD4+. La especificidad de este anticuerpo en estos grupos se demuestra en la Figura 2-ID, donde los porcentajes de linfocitos T CD3+CD8+ se comportan de forma similar a los controles. En el caso de los grupos tratados con el AcM anti-CD8 y anti-CD25, los niveles de depleción y la especificidad fueron muy semejantes a los obtenidos para los grupos tratados con anti-CD4 y según se ha descrito previamente [12, 177], como se muestra en la Figura 2-2D y la Figura 2-3 para el caso del AcM anti-CD25.

Para evaluar *in vivo* el potencial inmunosupresor de estos AcMs se determinó el nivel de supresión de la respuesta de anticuerpos contra un antígeno proteico soluble administrado en dosis única por vía intraperitoneal. En ratones BALB/c adultos se administró un esquema inmunosupresor con anti-CD4 y anti-CD8, por tres días consecutivos, seguido de una inmunización con EGF hu/rec al quinto día. En la Figura 2-17 se muestran los títulos de anticuerpos séricos contra el EGF hu/rec. Los grupos tratados con estos AcMs mostraron una marcada disminución de la respuesta de anticuerpos con relación al control. Un segundo reto el día 80 con EGF hu/rec en algunos de los animales provocó respuestas tres veces menores en los grupos tratados que en los controles (no mostrado en la figura).

2.3.1.3 Evaluación de la capacidad depletante de subpoblaciones linfoides murinas de medicamentos quimioterapéuticos.

Se evaluó en las cepas animales murinas BALB/c y C57BL/6 la capacidad depletante *in vivo* de subpoblaciones linfoides de la Ciclofosfamida (CY), medicamento quimioterapéutico o citostático. Diferentes dosis de la CY, incluidas en el rango de uso terapéutico en pacientes se administraron independientemente como dosis única por vía iv o ip. Se evaluó por Citometría de Flujo su efecto depletante sobre células mononucleares de sangre periférica. Bajo nuestras condiciones experimentales, la dosis máxima tolerada para la CY fue de 300 mg/kg con la que se observó una disminución en el conteo absoluto de leucocitos y de linfocitos totales (Figura 2-4). Los valores más bajos (por debajo del 50% del valor inicial) se observaron en el período comprendido entre los días 2 y 7 del tratamiento. El punto de máxima depleción del número de leucocitos se obtuvo el día 4, con una disminución del 85 % y del conteo de linfocitos totales el día 7, con una disminución del 94 %. El conteo absoluto de las subpoblaciones linfoides CD4+, CD8+ y CD25+ disminuyó

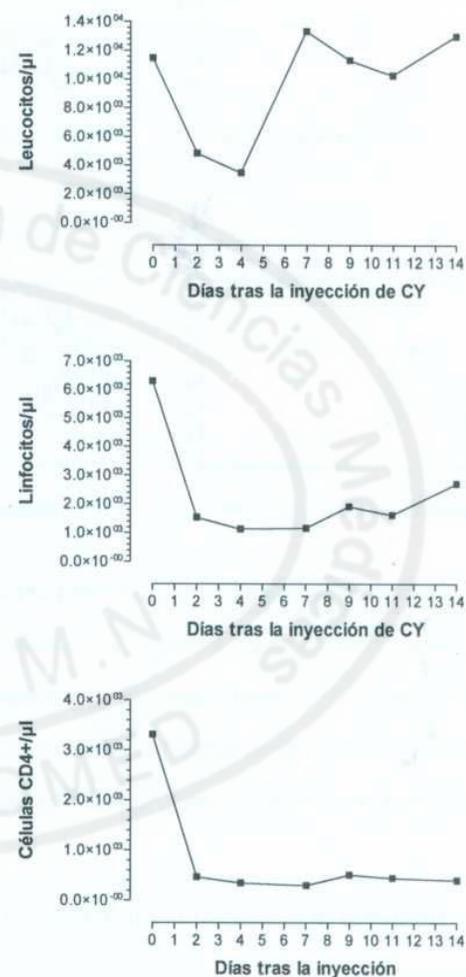


Figura 2-4. Efecto de la Ciclofosfamida sobre poblaciones de sangre periférica evaluada por FACS. Se muestra la media de tres animales.

marcadamente a partir del día 2 del tratamiento con una depleción máxima superior al 90 % en el día 7 (Figura 2-4), este efecto disminuyó relativo a la dosis de CY empleada según se ha descrito previamente [29],

2.3.2. Capítulo 2. Evaluación del efecto de tratamientos inmunosupresores sobre enfermedades autoinmunes inducidas por inmunización.

2.3.2.1 La depleción transitoria de células T CD4+CD25+ y CD8+ incrementa la EAE inducida por MOG en dependencia del esquema de tratamiento.

El antígeno MOG se ha estudiado extensamente como blanco relevante del ataque autoinmune en la Esclerosis Múltiple y en su modelo animal experimental. El papel de los linfocitos T en la EAE inducida por el p35-55 en ratones C57BL/6 está bien documentado [49, 182], sin embargo, el papel de los mecanismos inmunorregulatorios está definido pobremente. Células T regulatorias CD8+ han sido involucradas en el control de la

respuesta autoinmune para otros antígenos blanco en la EAE [45], pero no para el p35-55.

Adicionalmente, las células T CD4+CD25+ han sido implicadas en la regulación de la respuesta inmune en otros modelos animales de enfermedades autoinmunes [86],

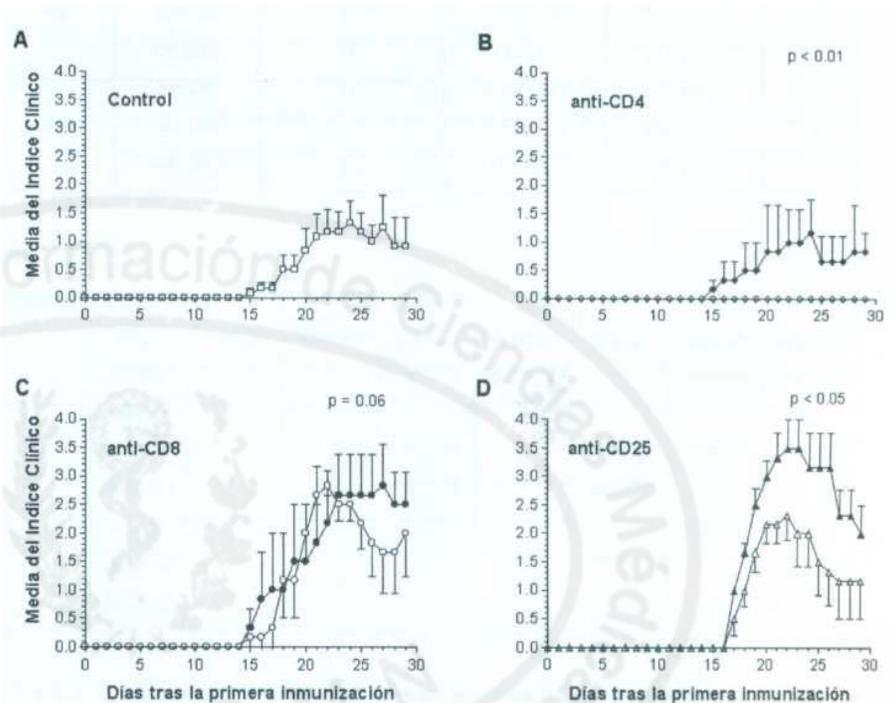


Figura 2-5. Inducción de EAE según protocolo convencional combinado con depleción transitoria de subpoblaciones de células T. Se administró por vía iv una dosis de 1 mg de AcM depletante o IgG control basado en 2 esquemas diferentes: 24 h antes de primera inmunización (símbolos vacíos) o 24 h antes de la segunda inmunización (símbolos llenos). Se representa la media y el SEM. Los valores de significación estadística se representan en el extremo superior derecho.

Por esta razón, se evaluó inicialmente el efecto de la depleción transitoria de diferentes subpoblaciones celulares T en diferentes momentos durante la fase de inducción de la respuesta inmune anti-p35-55. AcM depletantes han sido extensamente caracterizados previamente [12, 177]. Una dosis consistente en la inyección intravenosa de 1mg de AcM depletó más del 95% de la población correspondiente en sangre periférica y el (IW) bazo dentro de 72 h después de la administración y posteriormente comenzaron a recuperarse paulatinamente.

A

Esquema	Tratamiento	Incidencia de la Enfermedad (%)	Día del debut (Media ± SEM)	Pico del Índice Clínico [#]	
				(Media ± SEM)	Máximo
IVV	Control	83	18.40 ± 1.43	1.18 ± 0.18	2.5
	anti-CD4	0	-	0	0
	anti-CD8	100	17.00 ± 1.00	2.62 ± 0.10	3
VIV	anti-CD25	100	17.33 ± 0.33	2.12 ± 0.21	3
	anti-CD4	100	22.00 ± 4.04	1.00 ± 0.28	2.5
	anti-CD8	100	17.67 ± 1.33	2.33 ± 0.42	4.5
	anti-CD25	100	17.00 ± 0.00	3.37 ± 0.22	4

B

Esquema	Grupo	Control	IVV			VIV		
			anti-CD4	anti-CD8	anti-CD25	anti-CD4	anti-CD8	anti-CD25
IVV	Control	-	*	p<0.0001	p=0.0033	ns	p=0.0060	p<0.0001
	anti-CD4	-	-	*	*	*	*	*
	anti-CD8	-	-	-	ns	p<0.0001	ns	p=0.0083
VIV	anti-CD25	-	-	-	-	p=0.0044	ns	p=0.0005
	anti-CD4	-	-	-	-	-	p=0.0156	p<0.0001
	anti-CD8	-	-	-	-	-	-	p=0.0405

Tabla 2-1. Comparación entre los esquemas combinados de inmunización y depleción transitoria de células T en la inducción de EAE. , A) Expresión clínica de la enfermedad, B) Análisis entre grupos individuales (se muestra el valor de significación estadística). Para la inducción de la EAE se inmunizaron los animales por vía subcutánea dos veces con 200 µg del péptido p35-55 del MOG emulsificado en Adyuvante Completo de Freund suplementado con 500 µg de *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA inactivado por calor y siguiendo el protocolo estándar, 200 ng de la toxina del bacilo *Bordetella pertussis* se inoculó inmediatamente después de la primera inmunización y 72 horas más tarde. Se administró por vía intravenosa una dosis de 1 mg de AcM depletante o IgG control basado en dos esquemas diferentes: 24 horas antes de la primera inmunización (IVV) ó 24 horas antes de la segunda inmunización (VIV). (#) La significación estadística se calculó mediante la prueba de *t* de Student (ns, no significativo), (*) La incidencia de la EAE igual a cero en el grupo tratado con el AcM anti-CD4 según esquema IVV.

Los animales fueron inmunizados dos veces con MOG 35-55 para la inducción de la EAE y siguiendo el protocolo estándar, la TP se administró inmediatamente después de la primera inmunización y 72 h más tarde. Se administró por vía iv una dosis de 1 mg de AcM depletante o IgG control basado en 2 esquemas diferentes: 24 h antes de primera inmunización (símbolos vacíos en la Figura 2-5) o 24 h antes de la segunda inmunización (símbolos llenos en la Figura 2-5).

Se observó que las células T CD4+CD25+ y CD8+ están involucradas en la regulación periférica de la respuesta inmune contra el MOG y la depleción transitoria de ambas subpoblaciones celulares T incrementaron la expresión clínica de la EAE inducida. Sin embargo, dos factores independientes influyeron en la evolución clínica de la EAE, por un lado el tipo de subpoblación celular T y por otro, el momento de la depleción de las células T (Tabla 2-1).

Células T CD4+: el tratamiento con AcM anti-CD4 antes de la primera inmunización completamente abrogó la inducción de EAE y los animales persistieron libres de la enfermedad. Sin embargo, el mismo tratamiento 24 h antes de la segunda inmunización no modifica substancialmente el curso clínico normal para esta enfermedad, induciendo una ligera reducción en el índice clínico pero no significativamente diferente comparado con el grupo control. La diferencia entre estos esquemas resultó significativa para el tratamiento con el anti-CD4 ($p < 0.01$) (Figura 2-5)

Células T CD8+: el tratamiento con AcM anti-CD8 tanto antes de la primera o la segunda inmunización reforzó la inducción de EAE sin una diferencia significativa entre ambos esquemas ($p = 0.06$) (Figura 2-5). El índice clínico de la EAE para ambos grupos tratados con AcM anti-CD8 resultaron significativamente superiores comparados con el grupo control ($p < 0.001$).

Células T CD25+: el tratamiento con AcM anti- CD25 antes de la primera o segunda inmunización reforzó la inducción de EAE ($p < 0.001$) comparado con el grupo control. Sin embargo, la depleción de células T CD25+ antes de la segunda inmunización indujo un mayor impacto en la expresión clínica de la enfermedad. Estos animales desarrollaron una enfermedad clínica más intensa comparados con los que fueron depletados de células CD25+ antes de la primera inmunización ($p < 0.05$) (Figura 2-5).

El análisis entre los grupos tratados antes de la primera inmunización muestra que no existe diferencia estadística en la inducción de EAE entre los animales tratados con los AcM anti-CD8 y anti-CD25.

Además, la depleción de células T CD25+ antes de la primera inmunización indujo un incremento de la EAE similar a ambos esquemas de depleción empleados con el AcM anti-CD8, sin embargo la expresión clínica inducida por el tratamiento con el AcM anti-CD25 antes de la segunda inmunización fue significativamente superior a cualquier otro tratamiento ($p < 0.05$ vs. el anti-CD8 antes de la segunda inmunización y $p < 0.001$ vs. cualquiera de los otros tratamientos).

2.3.2.2 Dependencia de la dosis en la depleción de células T CD4+CD25+ y CD8+ en el incremento de la EAE inducida por MOG y su superioridad al efecto de la toxina del bacilo *Bordetella pertussis*.

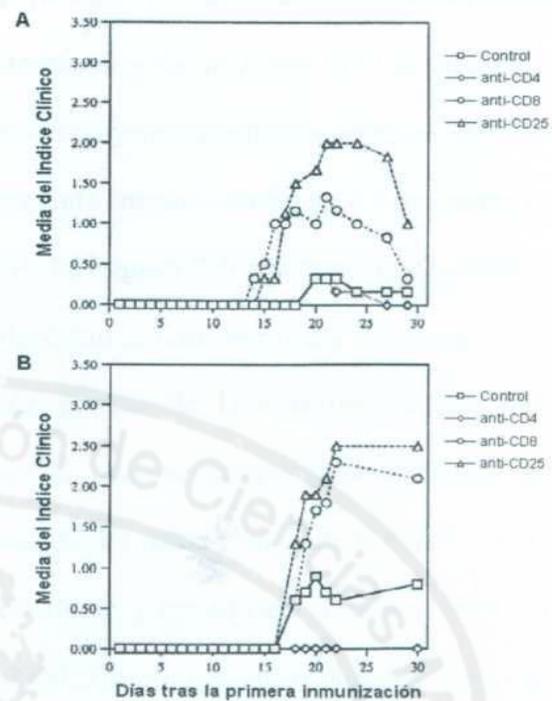


Figura 2-6. Dependencia del número de dosis de los AcM depletantes de células T en la inducción de EAE. A) Una dosis de AcM sin la administración de PT, B) Dos dosis de AcM, sólo el grupo control recibió PT

Basado en los resultados anteriores, se evaluó comparativamente la contribución de la depleción de células T y el efecto adyuvante de la toxina del bacilo *Bordetella pertussis* (TP) al facilitar la inducción de EAE por el MOG [183]. Al considerar que los mejores resultados se obtuvieron por la administración de los AcM depletantes antes de la segunda inmunización, se inmunizaron los animales dos veces con el p35-55 pero no recibieron TP. La Figura 2-6 muestra que aun sin la administración TP se indujo la EAE en los animales depletados con una dosis de 1 mg de los AcM anti-CD8 y anti-CD25. El pico de la expresión clínica de la enfermedad con estos tratamientos fue similar al protocolo regular que contiene TP pero los animales desarrollaron una enfermedad menos intensa y se recuperaron más rápidamente del primer brote de la enfermedad. Seguidamente se evaluó la dependencia de dosis de este efecto y basado en el mismo protocolo de inducción de la enfermedad, diferentes grupos de animales fueron tratados con dos dosis de 1 mg de los AcM depletantes, 24 h y 1 h antes de la segunda inmunización; el grupo control recibió 200 ng de TP inmediatamente después de la primera inmunización y 72 h más tarde. Interesantemente, como se muestra en Figura 2-6, se encontró una dependencia de dosis del efecto clínico y un incremento de la dosis de AcM anti-CD8+ y anti-CD25+ empeoran la expresión clínica de la enfermedad. Estos tratamientos indujeron una enfermedad más grave comparado con el protocolo estándar donde se utiliza la TP y sobre el día 30 en los animales aun persistía un elevado índice clínico de la enfermedad ($p < 0.05$).

2.3.2.4 La depleción de células T CD4+CD25+ induce un incremento de larga duración en la respuesta de células T anti-MOG.

La frecuencia de células T anti-MOG aumenta en el bazo y el SNC de animales inmunizados y este incremento se correlaciona con la expresión clínica de la enfermedad [49]. Sin embargo, cuando se estabilizan los signos clínicos de la enfermedad, 5 a 6 semanas después de la

inmunización, la frecuencia de estas células comienza a disminuir tanto en el bazo como en el SNC. Por esa razón, se estudió la proliferación específica celular T para relacionar esta variable con la expresión clínica de la EAE observada en los animales tratados con los AcM depletantes. En el día 56 se extrajeron los bazos de animales inmunizados los días 0 y 7 con 200 μ g del péptido del MOG emulsionado en ACF que contiene 500 (ag del *Mycobacterium tuberculosis* y que recibieron dos dosis de 1 mg de AcM depletantes administrados iv 24 h y 1 h antes de la segunda inmunización, sólo el grupo control recibió 200 ng de la TP inmediatamente después de la primera inmunización y 72 h

más tarde. Se cultivaron las células del bazo en medio solo o se estimularon con p35-55. El PPD se utilizó como control. Sorprendentemente, como se muestra en la Figura 2-7, se encontró que en el grupo tratado con AcM anti-CD25 persistía, a las 8 semanas de la inducción de la enfermedad, una elevada respuesta proliferativa contra el péptido encefalitogénico. La proliferación contra el antígeno MOG fue superior comparado con el resto de los grupos ($p < 0.05$), aunque la diferencia no fue significativa respecto al grupo tratado con el AcM anti-CD8 ($p > 0.05$). Sin embargo, la respuesta proliferativa anti-PPD fue similar entre todos los animales inmunizados Figura 2-7B.

2.3.2.5 El tratamiento con el AcM anti-CD25 induce el incremento de la producción de IFN- γ por los linfocitos T en respuesta al MOG.

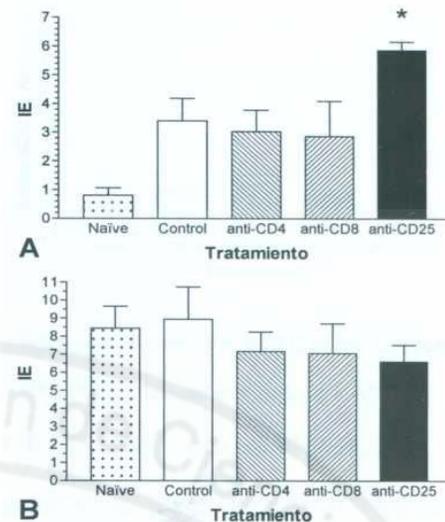


Figura 2-7. Respuesta proliferativa de células de bazo. A: MOG, B: PPD (* significación estadística $p < 0.05$)

En la EAE inducida por MOG es característica la inflamación y la desmielinización. La inmunización con el p35-55 estimula en el bazo principalmente las células del tipo Th1 y citocinas de tipo Th1 [182]; así, el IFN- γ juega un importante papel en la EAE inducida por MOG. La TP se ha descrito como la responsable del desencadenamiento de este tipo de respuesta celular durante la fase de inducción de la

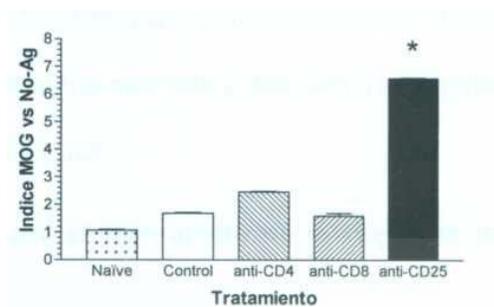


Figura 2-8. Producción de IFN- γ en respuesta al MOG (* significación estadística $p < 0.001$).

EAE [184]. Las células de tipo Th1 productoras de IFN- γ aumentan tanto en el bazo como en el SNC durante el pico de la enfermedad clínica aunque su frecuencia en el bazo disminuye subsecuentemente, probablemente debido a un cambio del fenotipo Th1 a un fenotipo Th2 [185]. Este cambio puede contribuir a la resolución de los signos clínicos en esta enfermedad autoinmune; no obstante los mecanismos inmunorregulatorios que gobiernan la cinética de este proceso no están bien caracterizados.

La producción de las citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ se evaluó por ELISA en los sobrenadantes colectados a las 72 h de cultivo de células no fraccionadas de bazo incubadas con el péptido del MOG. Los animales habían sido inmunizados los días 0 y 7 con 200 μ g que el péptido del MOG emulsionado en ACF que contiene 500 μ g del *Mycobacterium tuberculosis* y recibieron dos dosis de 1 mg de AcM depletantes por vía iv 24 h y 1 h antes de la segunda inmunización; sólo el grupo control recibió 200 ng de TP inmediatamente después de la primera inmunización y 72 h más tarde. El experimento se realizó al día 56 después de la primera inmunización.

Se observó que la producción de IFN- γ en el grupo tratado con el AcM anti-CD25 se encontraba significativamente aumentada ($p < 0.001$) comparado con el resto de los grupos Figura 2-8. Es de

notar que esta diferencia se demostró 8 semanas después de la primera inmunización y demuestra la persistencia en ese momento de esa citocina pro-inflamatoria asociada al fenotipo Th1, similar al descrito característicamente en el pico de la enfermedad [182],

2.3.2.6 El tratamiento con el AcM anti-CD25 induce el incremento de la respuesta de anticuerpos anti-MOG.

Autoanticuerpos naturales anti-MOG están presentes en sujetos normales [52], no obstante la severidad clínica y la desmielinización en la EAE inducida por MOG se asocia consistentemente con el aumento de los anticuerpos MOG-específicos en suero [50, 51]. Este hallazgo junto con la contribución de las citocinas en la patogenia de esta enfermedad autoinmune puede ser el reflejo de una compleja

interacción entre mecanismos efectores y regulatorios en una relación armónica.

Se evaluó la contribución de las células T CD4+, CD8+ y CD25+ en la respuesta de anticuerpos anti-MOG y su asociación con el incremento de la EAE observada después de la depleción transitoria de estas subpoblaciones de células T. Los ratones C57BL/6 fueron inmunizados los días 0 y 7 con 200 µg del péptido del MOG emulsionado en CFA que contiene 500 µg del *Mycobacterium tuberculosis* y recibieron dos dosis de 1 mg de los AcM depletantes inyectados por vía iv 24 h y 1 h antes de la segunda inmunización; sólo el grupo control recibió 200 ng de TP inmediatamente después de la primera inmunización y 72 h más tarde.

Se observó un aumento significativo de la respuesta de anticuerpos IgG anti-MOG en los animales depletados transitoriamente de células T CD25+ en comparación con los otros grupos

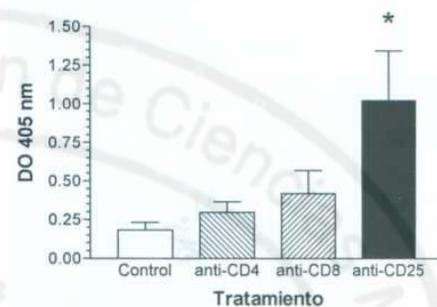


Figura 2-9. Respuesta de anticuerpos IgG contra el MOG (* significación estadística $p < 0.05$).

de tratamiento ($p < 0.05$), persistiendo por más de 8 semanas después de la primera inmunización (Figura 2-9).



2.3.3. Capítulo 3. Evaluación del efecto de tratamientos inductores de linfopenia transitoria sobre la evolución de tumores en ausencia de manipulación antigénica.

2.3.3.1 Actividad antitumoral contra el TAE tras la administración neonatal de Ciclosporina A.

El TAE es una línea celular altamente proliferativa, muy tumorigénica en receptores singénicos tras la inoculación se, incluso a dosis mínimas. El umbral del inoculum empleado en estos experimentos fue suficiente para inducir tumores en el 100% de los animales y provocar un crecimiento rápidamente progresivo del tumor, resultando letal en un tiempo corto.

Ratones BALB/c recién nacidos inoculados por vía se con 5×10^4 células del TAE desarrollaron tumores sólidos que no remiten espontáneamente, histológicamente caracterizados por una masa hipodérmica de células que crecen en el sitio de la inyección y no muestra infiltración de células mononucleares ni signos de necrosis.

Cuando se administró Ciclosporina A (CsA) diariamente a ratones antes de las 72 h de nacidos y trasplantados con las células del TAE, las biopsias tumorales mostraron una pérdida de la arquitectura característica, con una intensa infiltración de células mononucleares rodeadas por el tejido conjuntivo hipodérmico y áreas de necrosis con ocasionales células tumorales viables (Figura 2-10).

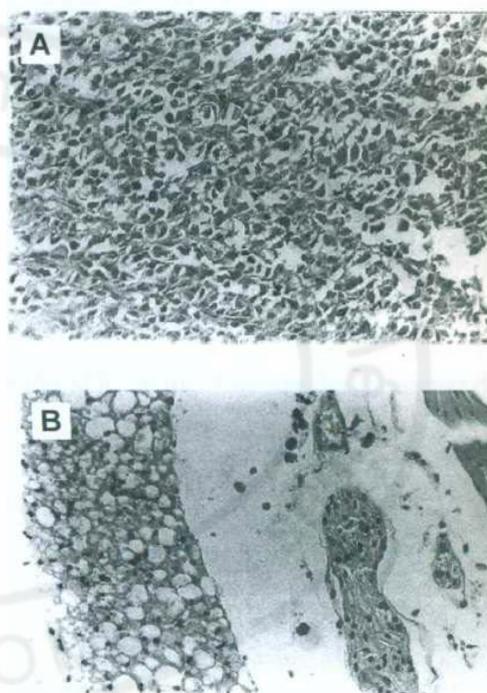
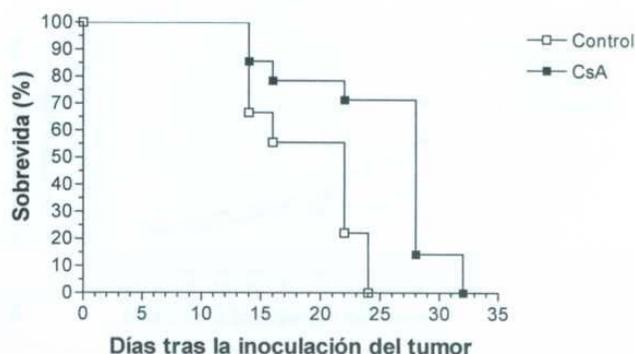


Figura 2-10. Respuesta histológica al TAE en ratones BALB/c neonatos. Estudio histológico con tinsión de hematoxilina y eosina (vista 100x). A) Control, B) CsA

El efecto de la CsA sobre la supervivencia también fue monitoreada y sorprendentemente, a pesar del número de células tumorales inoculadas, los animales que recibieron el tratamiento de CsA sobrevivieron aproximadamente 25 ± 1 día comparado con los



controles que murieron a los 19 ± 1 días

($p < 0.05$). Este efecto se asoció con el momento

del inicio del tratamiento con CsA ya que los efectos más significativos fueron obtenidos cuando la administración de la CsA empezó antes del día 4 de vida (Figura 2-11).

Figura 2-11. El tratamiento con CsA mejora la supervivencia de ratones BALB/c neonatos portadores del TAE. Existe diferencia significativa entre los grupos tratados según prueba de Log-rank ($p < 0.01$)

2.3.3.2 Efecto de inmunosupresión en la inmunidad antitumoral en la adultez.

Enfermedades autoinmunes inducidas por inmunosupresión sólo se han logrado desencadenar de forma muy particular en sujetos adultos con SI intacto utilizando protocolos intensivos con tratamientos combinados de Ciclofosfamida y timectomía, así como la irradiación con rayos X, o suero anti-células T previo a la administración de CsA [12,19]. Para evaluar el efecto de la inmunosupresión sobre el tumor trasplantado en la adultez, se inocularon por vía se con 2×10^5

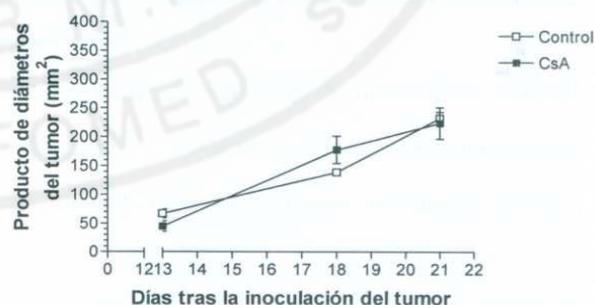


Figura 2-12. El tratamiento con CsA no modifica el crecimiento tumoral en ratones BALB/c adultos inoculados con el TAE.

células de TAE grupos de ratones BALB/c de 8 a 12 semanas de edad.

Los animales recibieron diferentes combinaciones de tratamiento con AcM anti-CD4, anti-CD8 y CsA. La eficacia de la depleción celular se confirmó por

citometría de flujo. El efecto de la CsA sobre el crecimiento tumoral y la supervivencia fue monitoreado. Se observó un 100% de prendimiento tumoral. El

tratamiento individual con CsA no modificó la tasa de crecimiento tumoral comparada con el grupo control (Figura 2-12). Sin embargo, el tratamiento combinado con el AcM anti-CD4 y la CsA

indujo la inhibición de crecimiento de tumor hasta el día 21 después de la inoculación del tumor. En este momento, los tumores de los animales tratados con el AcM anti-CD4 conjuntamente con la CsA crecieron aproximadamente 44% menos que en el grupo control (Figura 2-13).

En los animales que recibieron el AcM anti-CD8 en combinación con la CsA el período de latencia se prolongó discretamente. El crecimiento tumoral se inhibió hasta día 21 después de la inoculación del tumor en los grupos de animales tratados tanto con el AcM anti-CD8 solo o con

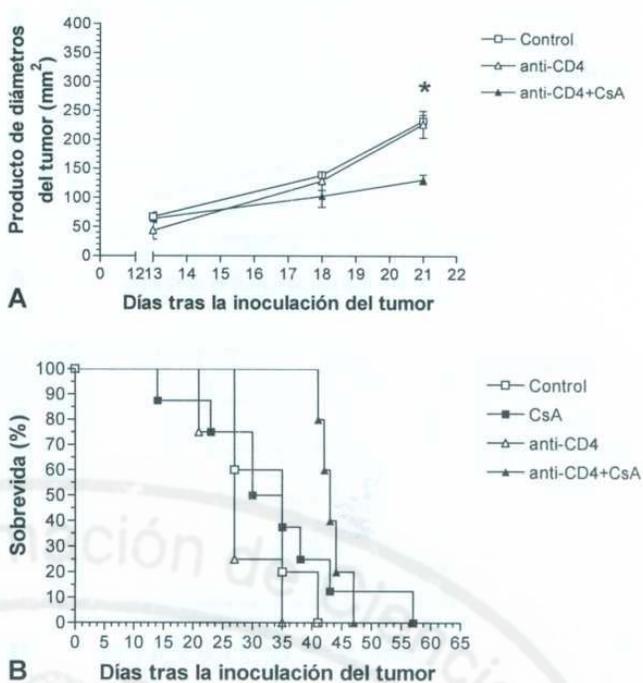


Figura 2-13. Respuesta antitumoral en ratones BALB/c adultos inoculados con el TAE y tratados con CsA y/o un AcM depletante anti-CD4. A) Crecimiento tumoral (* $p < 0.05$), B) No existe diferencia significativa entre la supervivencia de los grupos tratados según prueba de Log-rank ($p > 0.05$)

el AcM anti-CD8 en combinación con la CsA, obteniendo una inhibición de crecimiento de tumor de aproximadamente 50% respecto al grupo control (Figura 2-14).

2.3.3.3 Efecto de células B-1 sobre la inmunidad antitumoral inducida por inmunosupresión.

Para evaluar si el efecto antitumoral observado era el resultado no sólo del efecto de la CsA sobre las células T, sino también dependiente de células B-1, las cuales han sido asociadas con la producción de autoanticuerpos y el desarrollo de autoinmunidad, el mismo experimento se realizó en ratones singénicos

que expresan la mutación de la inmunodeficiencia ligada al cromosoma X (*xid*). Este animal carece de la enzima tirosina cinasa funcional de Bruton (Btk), un componente de la vía de transducción de señales del receptor de células B y son deficientes en el desarrollo de células B-1 [20]. Estos ratones deficientes de células B constituyen un modelo establecido para la evaluación del desarrollo tumoral temprano así como para el estudio de los mecanismos de actividad antitumoral de los anticuerpos naturales *in vivo*.

Ratones BALB *xid* recién nacidos fueron inoculados por vía se con el TAE (5×10^4 células). En

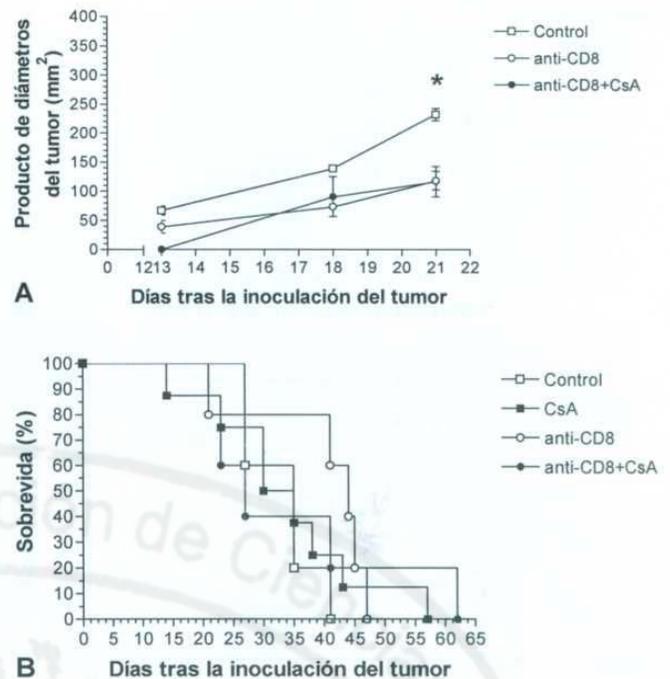


Figura 2-14. Respuesta antitumoral en ratones BALB/c adultos inoculados con el TAE y tratados con CsA y/o un AcM depletante anti-CD8. A) Crecimiento tumoral (* $p < 0.05$), B) No existe diferencia significativa entre la supervivencia de los grupos tratados según prueba de Log-rank ($p > 0.05$)

el 57.1% de estos animales los tumores progresaron y uniformemente formaron tumores sólidos palpables a los 5 días de la inoculación, a diferencia de los ratones BALB/c recién nacidos donde el tumor sólido es palpable entre los días 10 al 12. También es notable que el tiempo de supervivencia de los ratones BALB xid portadores de tumor se reduce a 15 ± 1 día.

Se observó que siguiendo el mismo protocolo de tratamiento con CsA el período de latencia tumoral en los animales de tratados con CsA fue de

8 días comparado con el grupo control tratado con el vehículo. El tratamiento con CsA en ratones BALB xid recién nacidos indujo la inhibición del

crecimiento tumoral desde el día 14 después de la inoculación del TAE y esto se asoció con un incremento del 37% de la supervivencia comparado con los controles (Figura 2-15).

El estudio histológico de los tumores dos semanas después de concluir el tratamiento con la CsA mostró áreas extensas de necrosis con áreas centrales que incluyen células tumorales viables y un infiltrado inflamatorio difuso a predominio de células polimorfonucleares con linfocitos y

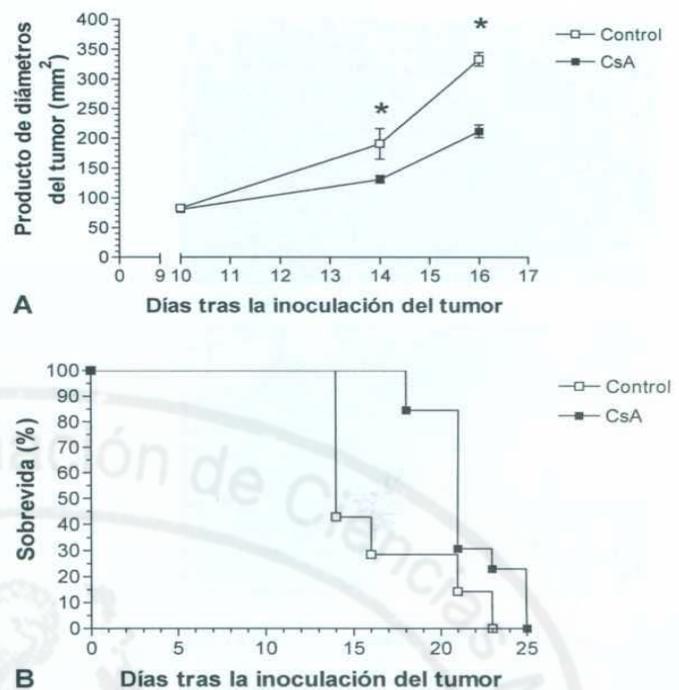


Figura 2-15. Respuesta antitumoral en ratones BALB xid neonatos inoculados con el TAE y tratados con CsA. A) Crecimiento tumoral (* $p < 0.05$), B) Existe diferencia significativa entre la supervivencia de los grupos tratados según prueba de Log-rank ($p < 0.01$)

macrófago dispersos (Figura 2-16).

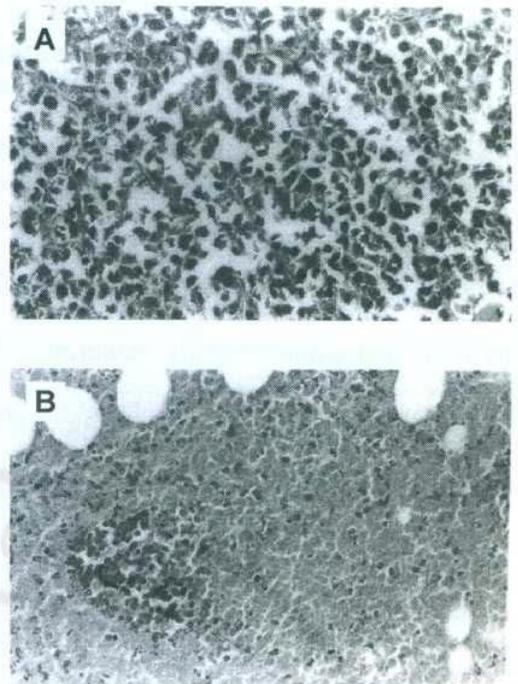
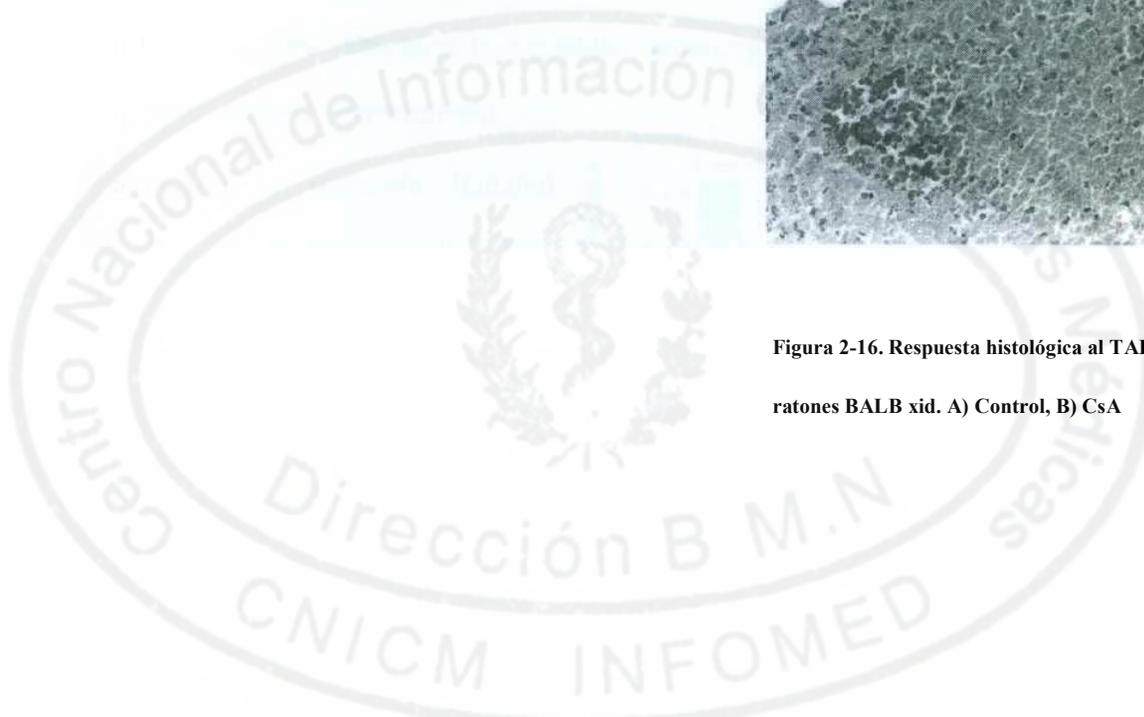


Figura 2-16. Respuesta histológica al TAE en ratones BALB xid. A) Control, B) CsA



2.3.4. Capítulo 4. Evaluación del efecto de tratamientos inmunosupresores sobre la respuesta a una vacuna de cáncer basada en el EGF

2.3.4.1 La inmunosupresión transitoria con Anticuerpos Monoclonales anti-CD4 y anti- CD8 incrementa la respuesta de anticuerpos contra el EGF y es un efecto dependiente del esquema de tratamiento.

La capacidad inmunosupresora de diferentes AcM dirigidas sobre moléculas expresadas en linfocitos T ha sido demostrada en diferentes modelos animales. El tratamiento con AcM anti- CD4 constituye un método eficaz para la inducción de tolerancia frente a antígenos autólogos y heterólogos. Para demostrar la capacidad inmunosupresora de AcM anti-CD4 y anti-CD8 en nuestro modelo experimental, se determinó la respuesta humoral

contra el antígeno proteico EGF hu/rec, en animales tratados simultáneamente con estos AcM depletantes. Se emplearon 15 ratones machos BALB/c adultos, los cuales se dividieron

en tres grupos de 5 animales cada uno. Dos grupos independientes recibieron tres dosis de 0.5 mg de los AcM anti-CD4 y anti-CD8 respectivamente por vía iv la primera e ip las

otras dos. El grupo control fue tratado de igual

forma, pero recibió Solución Salina al 0.9%. Dos días después de terminado este tratamiento, todos los animales recibieron 500pg de EGF hu/rec en dosis única, por vía ip. El día

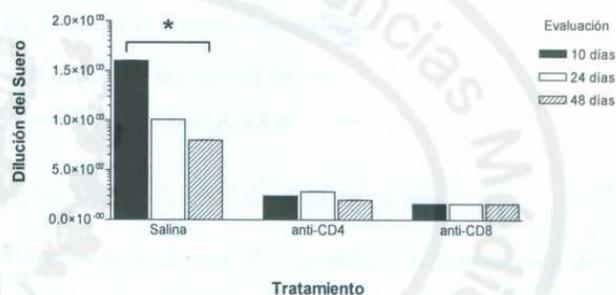


Figura 2-17. Reducción de la respuesta de anticuerpos específicos consecuente al tratamiento prolongado con AcM depletantes previo a la inmunización con el EGF hu/rec. La diferencia en la respuesta entre grupos se evaluó utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Existe diferencia significativa en todos los tiempos al comparar los grupos tratados con los AcM vs. la Salina ($p < 0.05$)

80 del experimento los animales recibieron un segundo reto con EGF hu/rec en similares condiciones.

Como era esperado, la respuesta contra el EGF hu/rec se abrogó en los grupos que fueron tratados previamente con los AcM anti-CD4 y anti-CD8 (Figura 2-17). Esta falta de respuesta

inmune fue persistente considerando que no se observó recuperación de los títulos de anticuerpos específicos tras un

segundo desafío con el mismo antígeno a los 80 días de iniciado el experimento.

Posteriormente, en otra serie de experimentos se evaluaron dos aspectos; la contribución de la forma de administración del antígeno, tanto la vía y la presencia o no de adyuvantes, así como la influencia sobre la respuesta inmune del momento de administración de la inmunosupresión. Con este interés se compararon diferentes protocolos combinados en ratones BALB/c.

El antígeno EGF hu/rec se utilizó como un preparado vacunal en Adyuvante Completo de Freund (ACF) por vía se en dos dosis y la inmunosupresión se administró como dosis única por vía iv antes del desafío antigénico (Figura 2-18, Esquema (1)), similar al experimento anterior, o previo a la segunda inmunización cuando ya la respuesta inmune se encontraba en curso (Figura 2-18, Esquema (2)). Se estudiaron muestras tomadas antes del tratamiento y en tres tiempos después de iniciado este.

Los resultados están dados por los títulos de las mayores diluciones en que se

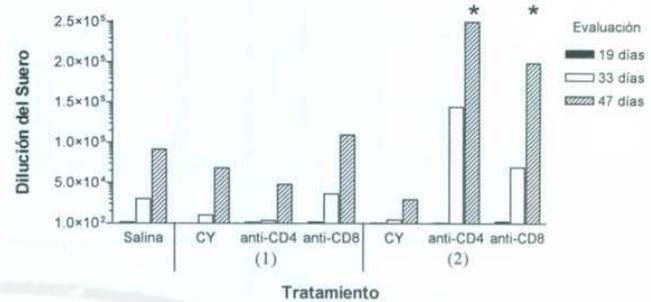


Figura 2-18. La inmunosupresión transitoria con AcM anti-CD4 y anti-CD8 incrementa la respuesta de anticuerpos anti-EGF hu/rec y es un efecto dependiente del esquema de tratamiento (* $p < 0.05$).

encontró respuesta positiva para todos los tiempos y todos los grupos de tratamiento en ambos esquemas.

Al analizar la existencia y evolución en el tiempo de los títulos de anticuerpos contra el EGF hu/rec, los sueros de los animales del grupo control, incluidos en el primer esquema, mostraron la presencia de anticuerpos contra el EGF hu/rec alcanzando títulos superiores a 1:20000 en el día 33 e incrementándose hasta niveles cercanos a 1:150000 en el día 47. En los grupos tratados con inmunosupresores, se observaron títulos bajos de respuesta, característica que se

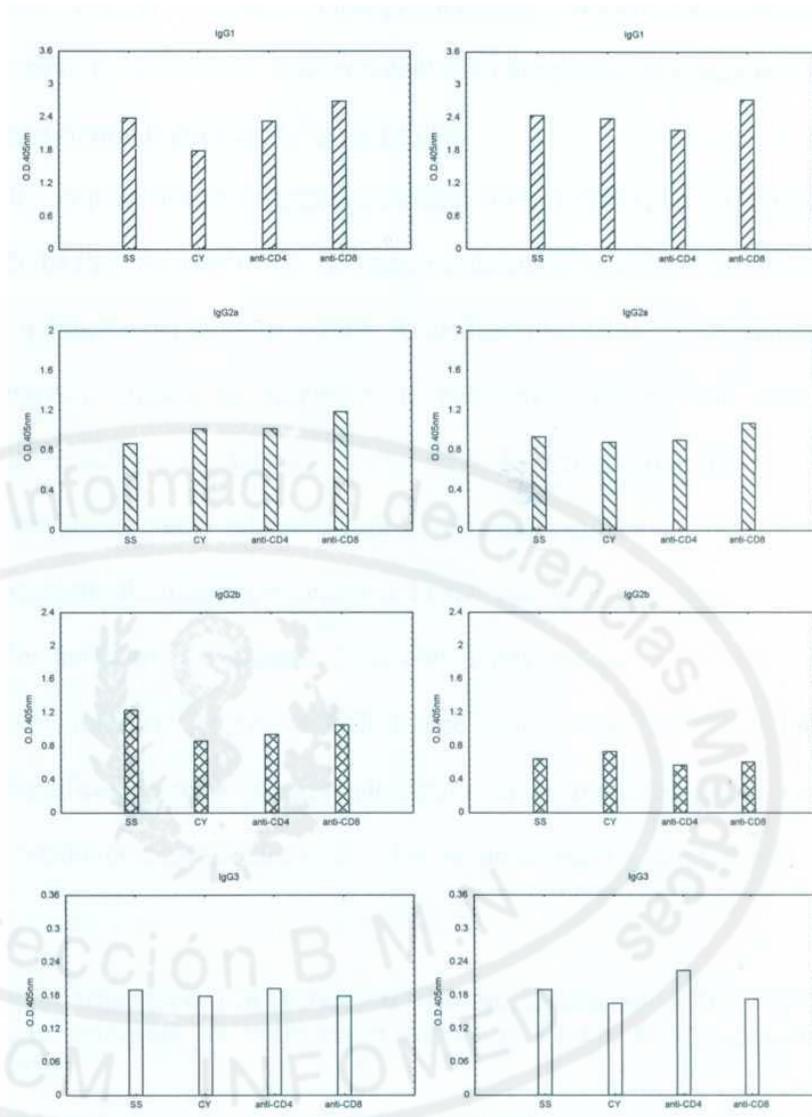


Figura 2-19. Caracterización de la respuesta de anticuerpos según las diferentes subclases de anticuerpos IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) mediante técnicas de ELISA. La columna de la izquierda corresponde al grupo de animales tratados según esquema (1) y la columna de la derecha con el esquema (2). Se muestra la media de 5 animales evaluados, la ds fue inferior al 10%.

mantuvo hasta el día 47, momento en que todos los títulos permanecieron por debajo de los obtenidos en el grupo control. Llama la atención que en el grupo tratado con anti-CD8 se alcanzó el mayor título (1:100000) entre los grupos que sufrieron depleción aunque la diferencia no fue significativa respecto al grupo control (Figura 2-18, Esquema (1)).

Adicionalmente se determinó la presencia de diferentes subclases de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) mediante técnicas de ELISA. Se usaron sólo las muestras de suero tomadas a los 47 días del inicio del experimento, a dilución del suero de 1:5000. Al analizar los sueros de los animales del esquema 1, se observaron títulos de respuesta de anticuerpos contra EGF hu/rec pertenecientes a todas las subclases de IgG estudiadas. No se encontraron diferencias significativas entre los valores de las cuatro subclases para los diferentes grupos de tratamiento. Los mayores títulos de anticuerpos alcanzados pertenecen a la subclase IgG1 y los menores a la IgG2b. En el estudio de los animales del esquema 2, se obtuvieron resultados similares que también demuestran la presencia de anticuerpos anti-EGF hu/rec de todas las subclases de IgG analizadas, sin diferencias significativas entre los títulos alcanzados en los diferentes grupos. Los títulos más elevados correspondieron a la subclase IgG1 y los de menor valor a la IgG3 (Figura 2-19).

2.3.4.2 La inmunosupresión transitoria con Anticuerpos Monoclonales anti-CD4 y anti- CD8 incrementa la respuesta de anticuerpos contra el Factor de Crecimiento Epidérmico autólogo.

Teniendo en cuenta la existencia de un 70 % de homología estructural entre el EGF hu/rec y el EGF murino, se decidió evaluar mediante técnicas de ELISA la respuesta contra el EGF murino obtenida como resultado de la inmunización con EGF hu/rec en forma vacunal y la influencia sobre ésta de los diferentes esquemas de inmunosupresión empleados. Se analizaron los sueros

obtenidos de las muestras tomadas a los 47 días de iniciado el experimento para cada uno de los grupos de tratamiento.

En los resultados del estudio de las muestras de los animales del esquema (1) se demostró la existencia de títulos de anticuerpos contra el EGF murino, en todos los grupos estudiados, pero sin diferencias significativas entre ellos. Los títulos no

sobrepasaron los valores de 1:5000

(Figura 2-20,

Esquema (1)).

En el estudio de los sueros del esquema

2 de tratamiento, se obtuvo evidente

respuesta de anticuerpos contra la

molécula de EGF murino en todos los

grupos. Los títulos de anticuerpos

alcanzaron valores

mayores de 1:8000. La mayor

respuesta fue obtenida en el grupo tratado con el anticuerpo monoclonal anti-CD4, aunque también

resultó significativa para el tratamiento con anti-CD8. Existen diferencias significativas entre los valores

de los títulos de respuesta obtenidos en estos grupos frente al grupo control (Figura 2-20, Esquema (2)).

2.3.4.3 El efecto de incremento de la respuesta de anticuerpos contra antígenos propios contenidos en vacunas de cáncer es dependiente de la dosis del tratamiento inmunosupresor.

La Ciclofosfamida (CY) es un agente quimioterapéutico que interfiere en el ciclo celular y en altas dosis eliminar células de diferentes orígenes y consecuentemente puede disminuir la

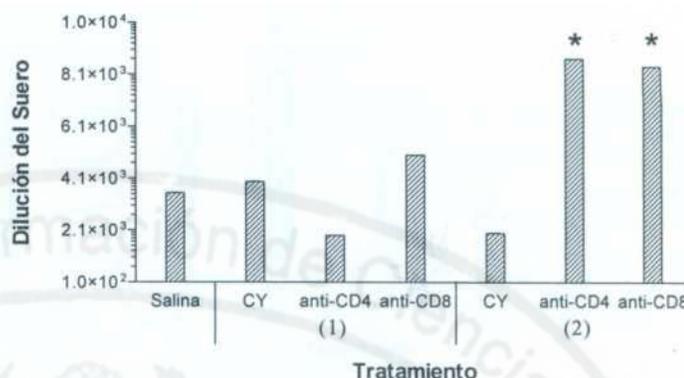


Figura 2-20. La inmunosupresión transitoria con AcM anti-CD4 y anti-CD8 según el esquema (2) incrementa la respuesta de anticuerpos contra el EGF autógeno (* significación estadística $p < 0.01$ para el AcM anti-CD4 y $p < 0.05$ para el AcM anti-CD8).

respuesta inmune e inducir diferentes niveles de inmunosupresión en los individuos tratados con este medicamento [173]. De igual forma, el pre-tratamiento con bajas dosis de CY se ha utilizado sistemáticamente con el interés de incrementar la respuesta inmune frente a diferentes tipos de vacunas [175]. Sin embargo, basado en el resultado precedente[^] se evaluó la influencia de la CY sobre la respuesta inmune frente a

un preparado vacunal pero administrada a diferentes dosis, posterior a la primera inmunización. Se inmunizaron ratones BALB/c

utilizando un protocolo combinado: se inyectaron los ratones por vía im con una vacuna que contiene 4 μ g de Factor de Crecimiento Epidérmico humano

conjugado a la proteína P64k (EGF-P64k) en Montanide ISA 51 y dos semanas después tratados por vía iv con diferentes dosis de CY a 50mg/kg, 100mg/kg, 200mg/kg y 300mg/kg. Tres días mas tarde, los ratones fueron re-inmunizados por vía im con una segunda dosis de dicha vacuna. En la Figura 2-21 se muestra que la inmunosupresión con CY incrementa la respuesta de anticuerpos IgG contra el antígeno vacunal dependiendo de la dosis del agente quimioterapéutico, esta respuesta fue significativamente mayor que la observada en los ratones tratados con la salina que se utilizó como control. Se muestra la media geométrica de los títulos de anticuerpos IgG por cada grupo pre-tratamiento y dos momentos posteriores a la primera inmunización.

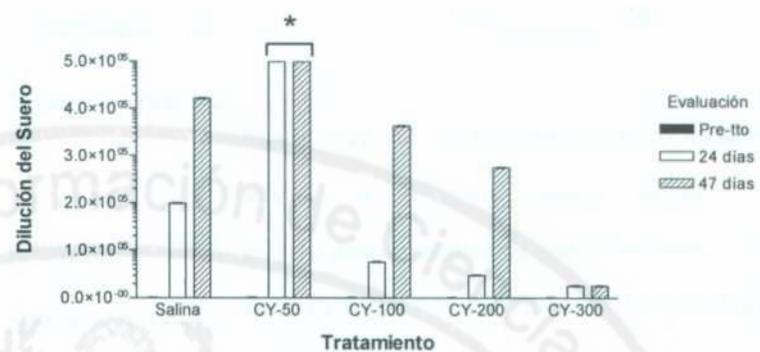


Figura 2-21. La inmunosupresión transitoria con Ciclofosfamida según esquema VIV aumenta de forma dosis dependiente la respuesta de anticuerpos contra la Vacuna de Cáncer EGF-P64k (* p<0.05).

2.3.4.4 El esquema VIV potencia la respuesta inmune anti-EGF y correlaciona inversamente con la respuesta anti-P64k en la Vacuna de Cáncer EGF-P64k.

Sorprendentemente se encontró que el efecto potenciador de la respuesta inmune del esquema terapéutico VIV contra la vacuna de cáncer compuesta por el EGF hu/rec conjugado químicamente a la proteína transportadora P64k, está dirigido específicamente hacia ese antígeno, no observándose potenciación de la respuesta contra la P64k.

Tras el curso de una inmunización con este conjugado, la respuesta contra la proteína P64k es mayor que la observada contra el EGF hu/rec (EGF vs. P64k, $p = 0.0159$). Sin embargo, bajo el esquema VIV utilizando 50mg/kg de CY por vía iv, ocurre una inversión en la

respuesta contra los componentes de la vacuna, predominando ahora contra el EGF hu/rec (EGF vs. P64k, $p = 0.0353$), evaluado en muestras de suero a las 7 semanas de inoculado el tumor.

El título de anticuerpos contra el EGF hu/rec contenido en la vacuna de cáncer EGF-P64k se incrementa significativamente con la aplicación del esquema VIV utilizando bajas dosis de Ciclofosfamida ($p = 0.0079$) e inversamente reduce la respuesta inmune contra el P64k ($p = 0.0363$) (Figura 2-22).

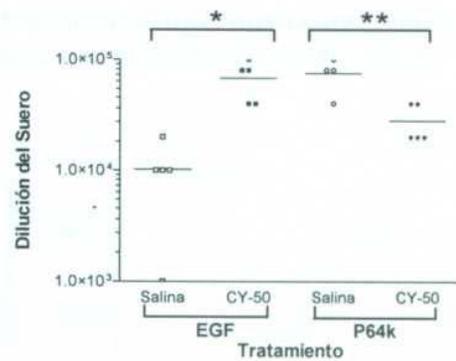


Figura 2-22. El efecto potenciador del esquema VIV a la respuesta inmune anti-EGF se correlaciona inversamente con la respuesta anti-P64k en la Vacuna de Cáncer EGF-P64k (* $p < 0.001$; ** $p < 0.05$)

2.3.5. Capítulo 5. Evaluación del efecto de tratamientos inmunosupresores combinados con vacunas de cáncer basadas en antígenos propios sobre la evolución de tumores.

Con el interés de evaluar la relevancia de mecanismos regulatorios periféricos limitando la respuesta contra el EGF y el bloqueo de los mismos como vía para incrementar la respuesta antitumoral tanto sobre primarios como sus metástasis se evaluaron diferentes esquemas combinados de inmunización con la vacuna de cáncer EGF-P64k con Inmunosupresores. Estos estudios se realizaron basados en los resultados previos donde se encontró que la combinación VIV resultaba efectiva en el incremento de la respuesta inmune.

Considerando que el modelo tumoral a utilizar es una línea singénica en ratones C57BL/6 y los estudios precedentes con la vacuna de cáncer EGF- P64k estaban fundamentalmente desarrollados en ratones BALB/c, se comparó la respuesta de anticuerpos contra esta vacuna en estas dos cepas animales.

Se observó que la respuesta de anticuerpos IgG + IgM en la cepa C57BL/6 resultó significativamente inferior a la observada en animales BALB/c ($p < 0.05$), mostrando la contribución del fondo genético del

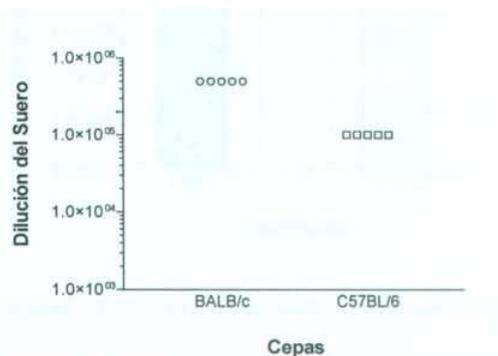


Figura 2-23. Influencia de la cepa animal en la respuesta inmune al EGF hu/rec. Existe diferencia significativa en el título de anticuerpos IgG + IgM ($p < 0.05$)

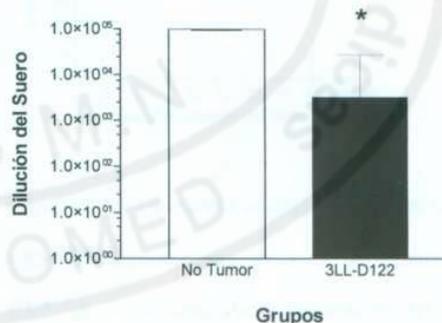


Figura 2-24. La respuesta inmune contra la vacuna de cáncer EGF-P64k disminuye por la presencia de tumor en los sujetos inmunizados (* $p < 0.05$).

animal en la calidad de la respuesta inmune contra este antígeno (Figura 2-23).

En diferentes modelos experimentales, así como en estudios clínicos ha sido revelada la contribución de la presencia tumoral como factor contribuyente desmovilizador de la respuesta inmune, ya sea por la liberación de sustancias solubles por el tumor o incluso la aparición de tumores ha sido vinculada a errores estructurales o fisiológicos de componentes solubles o celulares del SI [124],

Por tal motivo, se comparó la respuesta inmune contra la vacuna de EGF-P64k en ratones C57BL/6 portadores o no del Carcinoma Pulmonar de Lewis.

En estos experimentos se utilizó la variante altamente metastásica de dicho tumor (3LL-D122), que luego de implantarse en la almohadilla plantar, crece y fundamentalmente hace diseminación metastásica pulmonar en un lapso de aproximadamente 3 semanas, luego de otros 25 a 29 días que toma el tumor primario en alcanzar 8 a 9 mm de diámetro, momento en que se practica la cirugía radical de este último. Esto brinda la posibilidad de evaluar el curso de la respuesta contra la vacuna durante un lapso relativamente largo (aproximadamente 50 días) a

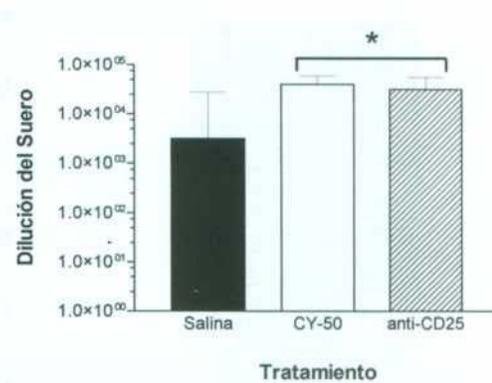


Figura 2-25. El tratamiento combinado con inmunosupresores en el curso de la inmunización con la vacuna de cáncer EGF-P64k recupera la respuesta de anticuerpos contra el EGF en los sujetos con tumores (* $p < 0.05$).



Figura 2-26. Respuesta antimetastásica en ratones C57BL/6 tratados con el AcM depletante anti-CD25 dos días antes de la inoculación del tumor primario 3LL-D122. Existe diferencia significativa entre la supervivencia de los grupos según prueba de Log-rank ($p < 0.05$).

diferencia de otros tumores primarios utilizados rutinariamente, condición que lo aproxima más al escenario clínico.

En sujetos portadores del tumor 3LL-D122 la respuesta de anticuerpos IgG + IgM anti-EGF fue significativamente inferior a la observada en animales sanos de igual cepa ($p < 0.05$), lo que evidencia la influencia de la presencia de un tumor y sus metástasis que expresan el receptor de EGF, en la respuesta inmune contra este antígeno (Figura 2-24). Resulta interesante que la respuesta inmune contra la vacuna transcurre solo inicialmente en presencia del tumor primario para luego continuar en presencia de las células metastásicas circulantes.

Basado en los resultados previos, se evaluó la potencialidad del esquema de inmunización VIV para modificar la respuesta inmune contra la vacuna de cáncer EGF-P64k. Notablemente, la aplicación de esta combinación terapéutica indujo la recuperación del título de anticuerpos contra este antígeno asociado a tumores. La inmunosupresión transitoria con bajas dosis de Ciclofosfamida (50 mg/kg de peso) condujo a la restauración de esta modalidad de respuesta inmune contra el EGF, retornando a niveles similares a los observados en los sujetos sanos (Figura 2-25). Significativamente, la depleción transitoria de células CD25 en los animales portadores del tumor 3LL-D122 llevó de igual manera a la restitución de los títulos de anticuerpos anti-EGF.

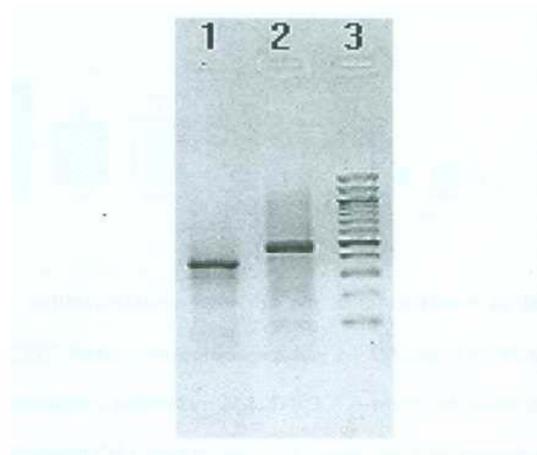


Figura 2-27. Expresión del receptor de EGF en la línea celular 3LL-D122 por método de RT-PCR. 1-Receptor de EGF, 2-G3PDH, 3-Patrón de peso molecular

Recientemente ha sido descrito el efecto antitumoral de la depleción de células CD25+. Este resultado se ha definido en modelos murinos de tumores primarios y se alcanza sólo cuando la administración del AcM anti-CD25 se realiza entre los dos días previos y hasta un día posterior a la inoculación del tumor.

Consecuentemente, se evaluó la capacidad antimetastásica de la depleción transitoria de las células CD25+ en el modelo 3LL-D122. Se observó que similar procedimiento con efecto antitumoral primario, también es capaz de

desencadenar una respuesta antimetastásica (Figura 2-26), lo que evidencia la contribución de los mecanismos de regulación periférica en el crecimiento y desarrollo tumoral en este modelo.

Sin embargo, similar a lo observado en modelos tumorales primarios la administración de AcM anti-CD25 posterior a las 24 h de la inoculación tumoral no modifica su progreso, lo que pudiera ser evidencia del reajuste de mecanismos de tolerancia periférica inducido por el tumor, que incrementan con su desarrollo y diseminación. De igual forma, ese hecho limita la potencial

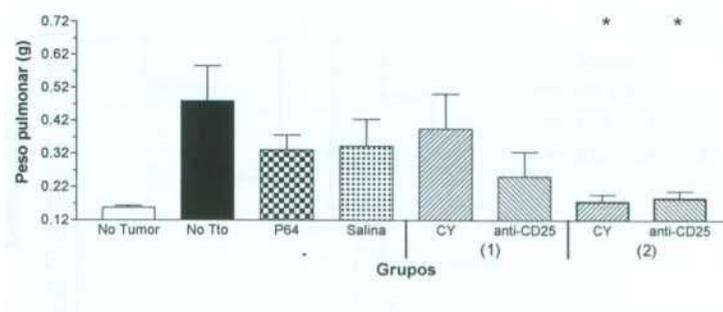


Figura 2-28. Efecto antimetastásico inducido con combinaciones de la vacuna de cáncer

EGF-P64k e inmunosupresión en ratones C57BL/6 inoculados con el carcinoma pulmonar

3LL-D122. A partir del segundo día posterior a la inoculación del tumor primario se

inmunizaron los animales dos veces con 4 μ g del preparado vacunal EGF-P64k en Alúmina por

vía intramuscular. Se administró por vía intravenosa una dosis de 50 mg/kg de CY o 1mg de

AcM depletante anti-CD25 basado en dos esquemas diferentes: 3 días antes de la primera

inmunización (Grupo 1) ó 3 días antes de la segunda inmunización (Grupo 2). La

inmunosupresión en el curso de la inmunización con la Vacuna de cáncer EGF-P64k (Grupo 2)

incrementa la respuesta de anticuerpos anti-EGF y reduce significativamente la aparición de

metástasis espontáneas evaluada por peso pulmonar según prueba de Kruskal-Wallis (Anova

No-paramétrica) ($p < 0.05$) y la prueba de Comparaciones Múltiples de Dunn ($p < 0.05$)

aplicación terapéutica del proceder individual si se considera que el diagnóstico clínico de esta enfermedad humana se realiza fundamentalmente en sus estadios avanzados.

Consecuentemente y teniendo en cuenta la acción potenciadora de la respuesta inmune contra el EGF producto a la combinación de la vacuna de cáncer EGF-P64k con diferentes esquemas de inmunosupresión transitoria, se evaluó el efecto antimetastásico en el modelo tumoral 3LL-D122, tumor que expresa el receptor de EGF (Figura 2-27).

Este procedimiento se evaluó bajo condiciones de terapia adyuvante por su proximidad a las condiciones de terapia humana, donde el interés fundamental radica en el efecto antimetastásico de las intervenciones terapéuticas. Así, el esquema de inmunización comenzó posteriormente a la inoculación del tumor y el proceder de inmunosupresión transcurrió pasadas las dos semanas, momento en que el tumor primario se encontraba en fase de crecimiento acelerado.

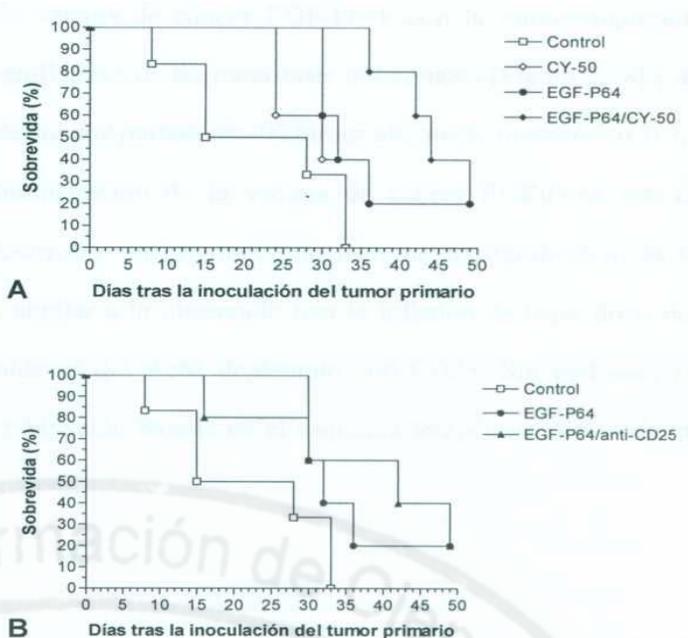
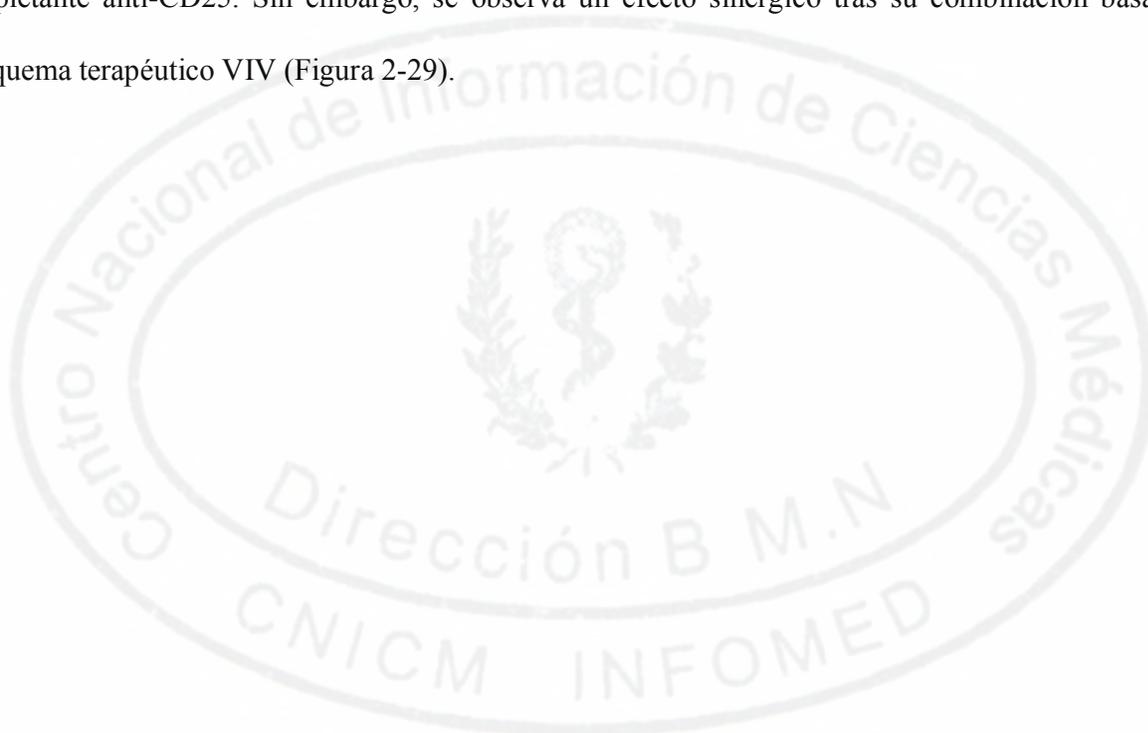


Figura 2-29. Respuesta antimetastásica en ratones C57BL/6 inoculados con el tumor 3LL-D122 y tratados con combinaciones de la vacuna de cáncer EGF-P64k e inmunosupresión. Existe diferencia significativa entre la supervivencia de los grupos que reciben la terapia combinada según prueba de Log-rank ($p < 0.05$). A) Ciclofosfamida, B) AcM depletante anti-CD25

Relevantemente, la combinación de la vacuna de cáncer EGF-P64k con la inmunosupresión transitoria, condujo a una reducción significativa de las metástasis pulmonares (Figura 2-28) y al aumento significativo de la sobrevida de sujetos portadores del tumor altamente metastásico 3LL- D122 ($p < 0.05$). Nótese que la administración de la vacuna de cáncer EGF-P64k tras el prendimiento tumoral y durante su desarrollo, no promueve un incremento significativo de la sobrevida en los sujetos inmunizados, similar a lo observado tras la infusión de bajas dosis del agente quimioterapéutico Ciclofosfamida ni del AcM depletante anti-CD25. Sin embargo, se observa un efecto sinérgico tras su combinación basada en el esquema terapéutico VIV (Figura 2-29).



3.DISCUSION



En el presente trabajo se examinaron cuatro situaciones biológicas; la inducción de una enfermedad autoinmune, la inducción de actividad antitumoral sin manipulación antigénica, la inducción de respuesta inmune contra vacunas de cáncer basadas en antígenos propios y la inducción de actividad antitumoral con vacunas de cáncer, todas con unidad experimental común dada por la evaluación de la respuesta inmune frente a antígenos propios en el curso de procedimientos generadores de linfopenia transitoria.

La capacidad del SI para discriminar entre antígenos propios y no-propios es un tema central en la Inmunología tanto por sus implicaciones teóricas como por su alcance clínico [6]. La clásica asunción de la no existencia de linfocitos autorreactivos en órganos linfoides periféricos producto a los mecanismos de Tolerancia Central encargados de garantizar la eliminación de las células autorreactivas en los órganos linfoides centrales [1, 2, 4], ha demostrado ser incompleta [92]. Recientes evidencias experimentales sustentan la existencia de clones autorreactivos en sangre periférica y órganos linfoides de individuos sanos lo que permite propugnar la contribución adicional de mecanismos de Tolerancia Periférica en el control de éstas células autorreactivas que escapan de los mecanismos de delección central [186]. Este grupo de mecanismos denominados “activos o dominantes”, debido a que previenen la activación de células inmunes con potencialidad de desencadenar autoinmunidad patológica, se encuentran en intenso escrutinio, aunque el conocimiento de la potencial aplicación de su manipulación terapéutica aun es muy limitado [37],

La existencia de células T con capacidad reguladora de la magnitud de la respuesta inmune es uno de los sustentos teóricos que justifican la existencia de mecanismos dominantes de tolerancia inmune, aunque desde el punto de vista experimental, estas células T reguladoras se encuentran pobremente caracterizadas tanto fenotípica como fisiológicamente [187]. No obstante, la

expresión de los marcadores de diferenciación linfocitario CD4+CD25+ [31] y CD8+ [188, 189] han sido documentados como marcadores fenotípicos asociados a células T con capacidad reguladora *in vivo*.

Tres principales limitantes para la comprensión y posterior aplicación terapéutica de la manipulación de las Treg están en que la información disponible de su existencia se basa en experimentos de inducción de autoinmunidad patológica producto de la transferencia adoptiva de células T carentes de las que portan el marcador fenotípico de Treg en hospederos inmunocomprometidos [39]. Interesantemente, igual proceder en individuos con SI intacto requiere varios ordenes de magnitud superior de células o no es capaz de desencadenar tal enfermedad [190], lo que distancia cualquier interpretación de la relevancia de este mecanismo. En segundo lugar, los mecanismos de regulación periférica de la respuesta inmune pueden actuar a diferentes niveles de la respuesta inmune y están caracterizados principalmente en la fase efectora de la respuesta inmune [44, 46]. Los modelos animales de enfermedades autoinmunes regularmente requieren inmunizaciones repetidas con el antígeno propio para recapitular el desarrollo de la enfermedad, frecuentemente sin una completa penetrancia, sin embargo la relevancia de las Treg en la fase de inducción se encuentra muy poco caracterizada en estos modelos. En tercer lugar, una característica común de muchos de los estudios sobre Treg es la falta de evaluación simultánea de varios de los marcadores fenotípicos, *per se* no excluyentes su contribución a los mecanismos de Tolerancia Periférica [191, 192],

La evaluación de estos temas constituyó la base analítica del primer bloque experimental del presente trabajo. Se examinó el efecto de la inducción de linfopenia transitoria en la fase inductora de la autoinmunidad contra el MOG, antígeno relevante en el modelo animal de la Encefalitis Autoinmune Experimental y la Esclerosis Múltiple en humanos [193, 194], Se

encontró que la depleción transitoria de células T incrementa la EAE inducida por MOG. Este es un efecto relacionado con la eliminación de las subpoblaciones de células T CD4+CD25+ y CD8+ y es dependiente del número de dosis y el esquema de tratamiento. Resultó de interés encontrar que la intensificación de la enfermedad se acompaña del incremento de la respuesta proliferativa y la producción de IFN- γ por las células T, así como de la respuesta de anticuerpos específicos contra el MOG.

El hallazgo de la contribución reguladora tanto de las células CD4+CD25+ y CD8+ revela una compleja y dinámica interacción de estas subpoblaciones celulares T durante la fase inductora de la respuesta autoinmune. De manera independiente, evidencias anteriores sustentaban la contribución de las células T CD4+ y CD8+ en la inmunopatología de la EAE, aunque por separado en otros dos modelos antigénicos de esta enfermedad y esencialmente su contribución en el control de la reinducción de la EAE [44, 195]. Resulta de interés en el modelo antigénico evaluado que la depleción transitoria de células CD8+ agrava el curso clínico de la enfermedad independientemente del momento en que se administre respecto a la inmunización, agregando evidencias sobre hallazgos precedentes sobre el papel regulador de la respuesta autoinmune de estas células en la EAE inducida por MOG [44, 46].

En el presente estudio, la depleción de células T CD4+ previo a la inmunización con el autoantígeno MOG abroga completamente el desarrollo del ataque autoinmune, resultado esperado considerando que estas células se requieren tanto en la iniciación, como en el desarrollo de la respuesta anti-MOG. Además, esto pudiera estar con correspondencia con resultados anteriores, donde el uso de AcM anti-CD4 antes del desafío antigénico induce la falta de respuesta inmune específica [11], No obstante, debe notarse que similar tratamiento durante la

respuesta en curso, no afecta la evolución clínica de la enfermedad, evidenciando diferentes niveles de contribución de estas células dependiendo del estado alcanzado de respuesta.

Sin embargo, el efecto de la depleción transitoria con AcM anti-CD25 es substancialmente diferente. La subpoblación CD25+ constituye apenas entre el 5 al 10 % de las células CD4+ en los individuos sanos y evidencias experimentales recientes sustentan su contribución como células T reguladoras profesionales de la respuesta autoinmune en ratones [31, 196], en ratas [41] y en humanos [40, 197-199]. Bajo nuestras condiciones experimentales, encontramos que estas células pueden intervenir en el control de la iniciación de la enfermedad autoinmune inducida por inmunización. Sorprendentemente, se encontró que su contribución está en correspondencia con la evolución de la respuesta inmune ya que en dependencia con el momento de su eliminación es su repercusión en el incremento de la patología clínica. Esto puede estar en correlación con criterios precedentes que condicionan la activación de las células T reguladoras a la de las células efectoras [200]. Interesantemente, la depleción de células T CD4+CD25+ durante la respuesta inmune en curso tuvo el mayor impacto sobre el aumento de la autoinmunidad de todas las condiciones evaluadas. Además, su efecto clínico se asoció con el aumento de la respuesta inmune anti-MOG a niveles de células T y de anticuerpos específicos de larga duración. Adicionalmente, en el bazo de los animales tratados con AcM anti-CD25 permanecen niveles elevados de células T productoras de IFN- γ y posteriormente al pico clínico de la enfermedad, lo que refleja un profundo efecto inmunomodulador como consecuencia de la intervención en el estadio temprano de la fase inductora de la respuesta específica. Estos resultados pueden documentar el papel de las células T CD4+CD25+ en el control fino de diversos pasos del proceso autoinmune. Este resultado puede estar en correspondencia con recientes evidencias experimentales que documentan la contribución de linfocitos que expresan el marcador CTLA-4,

molécula también co-asociada a la expresión del CD25, limitando la expansión de células T encefalitogénicas en ratones BALB/c naturalmente resistentes al desarrollo de EAE [201]. Similar a nuestros resultados, el bloqueo de la molécula CTLA-4 durante la inducción de esta enfermedad resulta en el incremento preferencial en la frecuencia de células T antígeno específicas secretoras de IFN- γ .

La contribución de los adyuvantes como señales co-estimuladoras de la respuesta inmune se encuentra bien documentada. La TP es un adyuvante promotor de la respuesta Th1 y favorece el desarrollo de la enfermedad autoinmune [184, 202], Comparativamente encontramos una mayor contribución de los mecanismos reguladores en estas condiciones ya que la eliminación de células CD8 $^{+}$ y CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ incrementó en mayor medida la enfermedad autoinmune resultante de la inmunización con MOG con relación al efecto de la TP. Sin embargo, ambas aproximaciones presentaron un efecto sinérgico en la promoción de la autoinmunidad.

Debe destacarse que la respuesta inmune contra el Derivado Proteico Purificado del *Mycobacterium tuberculosis* contenido en el adyuvante utilizado en la inmunización no se incrementó, lo que permite sugerir que la respuesta inmune a los antígenos propios y foráneos se regulan diferentemente [47]. Este resultado ha sido confirmado recientemente por otros investigadores [203].

Finalmente, el análisis de estos resultados desde el punto de vista del manejo de las enfermedades autoinmunes, donde la base fundamental de su terapéutica radica en el uso de medicamentos inmunosupresores, ofrece una explicación al efecto rebote de las manifestaciones clínicas de estas enfermedades frecuentemente observado tras la interrupción del tratamiento, lo que sugiere la re-evaluación conceptual de tal intervención médica [204-206].

La respuesta antitumoral puede ser un caso particular de respuesta autoinmune [25]. Múltiples evidencias sustentan la relevancia de los antígenos propios como blancos principales de la respuesta inmune contra las células tumorales [59]. De ser esta afirmación correcta, ambos tipos de respuestas deben estar sujetos a similares procesos de regulación inmune y manipulaciones que desencadenan enfermedades autoinmunes, deben desencadenar a su vez respuesta antitumoral.

En el segundo bloque de este trabajo se evalúa esa noción. Se examinó en un modelo animal con un tumor singénico el efecto de manipulaciones del SI que inducen linfopenia funcional de células T por déficit o por reducción del repertorio de células T y simultáneamente son capaces de inducir enfermedades autoinmunes [28].

La cepa de ratones BALB/c es ordinariamente resistente al desarrollo de enfermedades autoinmunes espontáneas [53]. Sin embargo, la administración neonatal de la Ciclosporina A, medicamento con reconocido efecto inmunosupresor, sin otro tipo de manipulación antigénica induce el desarrollo de autoinmunidad patológica. Por homología se evaluó similar intervención en ratones BALB/c neonatos portadores de un tumor singénico inerte a algún efecto directo potencial de la CsA [180].

Sorprendentemente, se observó que la administración neonatal de la CsA en ratones BALB/c impactó favorablemente en la supervivencia de los animales a pesar del tamaño del inoculo celular. Este efecto se encontró asociado a la inducción de lesiones histopatológicas en los tumores singénicos que comparte rasgos comunes con la inmunidad antitumoral inducida tras la inmunización con antígenos propios modificados o tras la inoculación de líneas tumorales modificadas [60, 207], tales como un intenso infiltrado de células mononucleares y pérdida de la

arquitectura tumoral característica. Significativamente, hallazgo histológico similar se reporta en las enfermedades autoinmunes inducidas por CsA [28].

El efecto antitumoral observado está en concordancia con hallazgos tempranos sobre la evaluación del impacto del SI sobre el desarrollo de tumores, relacionados directamente con el efecto sobre tumores metastásicos de la inmunosupresión neonatal inducida, donde la timectomía se asoció al desarrollo de menor número de metástasis [208], así como tumores metastásicos poco inmunogénicos no metastizaron espontáneamente luego de protocolos de inmunosupresión profunda tanto en neonatos y en animales adultos [209, 210].

Es de notar que la administración de CsA tiene sólo un discreto impacto bajo condiciones de inmunosupresión más estrictas en la evolución tumoral en individuos adultos, lo que evidencia el reforzamiento ontogénico de los mecanismos de regulación inmune periférica [172], Tanto la co-administración de AcM anti-CD4 como anti-CD8 con la CsA presentan impacto sobre la evolución tumoral en sujetos adultos aunque no llegan a modificar la supervivencia de los mismos. Esto resulta de gran interés al intentar asociar fenotipos celulares con mecanismos de regulación inmune periférica ya que el tratamiento con CsA reduce inespecíficamente subpoblaciones celulares T, tanto células de linaje CD4+ o CD8+ resistentes al tratamiento con CsA desarrollan funciones reguladoras, impidiendo que otros linfocitos reconozcan y desencadenen sus mecanismos efectoras sobre las células tumorales.

Las manifestaciones de autoinmunidad inducida post-linfopenia transitoria están relacionadas con la presencia de células T y anticuerpos autorreactivos tanto en circulación periférica como en los órganos diana [28]. A pesar del soporte experimental relacionado con el papel de los autoanticuerpos naturales en la defensa contra el desarrollo de tumores [211-213] y la implicación de las células B CD5+ en el origen y desarrollo de las enfermedades autoinmunes

[214, 215], nuestros datos experimentales en ratones BALB xid no permiten asociar éstas células con la respuesta antitumoral observada.

Estos experimentos se realizaron en ausencia de manipulaciones antigénicas de tal manera que la movilización de los mecanismos efectores inmunes estuvo mediada por antígenos propios expresados de forma natural. Un aspecto de limitado discernimiento actual lo constituye las causas que definen el tropismo de la respuesta autoinmune, las enfermedades autoinmunes no son aleatorias sino que algunos órganos, células y antígenos son más propensos que otros para recibir el ataque del SI [17]. En las enfermedades autoinmunes inducidas por linfopenia transitoria, el rápido recambio celular en el órgano diana ha sido asociado con tropismo de la respuesta autoinmune [29]. De tal forma, sería posible asumir que la velocidad de replicación del tumor de Ehrlich (vida media inferior a 24 h) y consecuentemente el elevado número de antígenos tumorales expuestos al SI favoreció la direccionalización de la respuesta inmune contra este tejido en detrimento de otros tradicionalmente blanco de esta respuesta. Por ejemplo, en la gastritis autoinmune la velocidad de replicación de las células parietales gástricas es superior a la de las células [3 pancreáticas, resultando el primero el principal órgano blanco de la respuesta autoinmune [29], Esta explicación también pudiera resultar coherente con datos experimentales que sustentan una correlación inversa entre la duración del período de latencia y la inmunogenicidad del tumor [21, 216], Así mismo, el favorecer la inducción de respuesta contra un antígeno vacunal en un ambiente linfopénico transitorio, resulta una manera indirecta pero simple de evaluar esta hipótesis.

En general estos resultados permiten asumir que la inducción de respuesta antitumoral por inmunosupresión transitoria documenta la existencia de linfocitos autorreactivos capaces de reconocer y destruir células tumorales pero sólo cuando se elude el efecto de los mecanismos de

regulación periférica. Adicionalmente, esto puede explicar la aparente falta de antigenicidad o insuficiente inmunogenicidad de los antígenos tumorales [22, 217], Pudiese asumirse que los tumores con baja tasa de crecimiento serían menos sensibles a la inducción de respuesta inmune post-tratamientos inductores de linfopenias, lo que indirectamente ha quedado evidenciado por el hallazgo en pacientes donde los tumores con mayores tasa de crecimiento presentan mayor respuesta a la terapia con medicamentos citotóxicos y radiación [218], procedimientos que como efecto secundario inducen linfopenias transitorias.

Desde el punto de vista terapéutico antitumoral, de los anteriores resultados emerge la necesidad de la combinación de procedimientos o drogas capaces de eliminar o “relajar” los mecanismos de regulación periférica de la respuesta inmune con vacunas de cáncer, que favorezcan la presentación antigénica de los antígenos tumorales.

Consecuentemente, en el tercer bloque experimental del presente trabajo se evaluó la influencia de la modulación transitoria de células linfoides periféricas en la fase inductora de la respuesta inmune frente al Factor de Crecimiento Epidérmico, molécula soluble diana de una vacuna de cáncer[62-64],

La inmunoterapia pasiva con AcM dirigidos contra antígenos propios asociados a la evolución tumoral ha sido evaluada extensamente. Una vida media y disponibilidad farmacológica limitada con la consiguiente necesidad de re-infusión de estos efectores, matizada por un reducido efecto terapéutico han conducido a la evaluación de la inmunoterapia activa específica como modalidad terapéutica alternativa [219, 220],

El EGF se evalúa como vacuna en la inmunoterapia del cáncer de origen epitelial, con la finalidad de aprovechar los autoanticuerpos producidos como vía para inactivar el EGF circulante, castrándolo de la circulación periférica con la finalidad de reducir la tasa de

crecimiento de los tumores dependientes de este factor de crecimiento [62], Desde el punto de vista práctico, una mayor eficacia de este enfoque terapéutico estaría directamente ligada a la inducción y mantenimiento de mayores títulos de anticuerpos circulantes en los sujetos portadores de tumores.

Tomando en consideración el carácter propio de este antígeno, pudiera asumirse *a priori* que la respuesta inmune contra este antígeno pudiera estar bajo el control de los mecanismos de Tolerancia Periférica, limitándola. Adicionalmente, el estudio de los mecanismos de regulación de la respuesta inmune contra el EGF resulta de interés ya que esta es una molécula pequeña de sólo 53 aminoácidos [56] y a diferencia del antígeno MOG, evaluado anteriormente, el EGF se encuentra circulante en bajas concentraciones en periferia, similar a hormonas que resultan blanco de ataques autoinmunes [58].

La dependencia de la dosis para el efecto de la falta de respuesta frente a antígenos vacunales inducido tras un impacto profundo sobre las subpoblaciones CD4+ y CD8+ se confirmó bajo nuestras condiciones experimentales. La inducción de una depleción linfoide profunda mediante la administración consecutiva de 3 dosis depletantes de AcMs anti-CD4 y anti-CD8 previo a la administración intravenosa del EGF indujo un estado de falta de respuesta de larga duración contra el EGF. Esta aproximación experimental constituye la base racional para el uso de AcM de estas especificidades como inmunosupresores en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes humanas [11], Sin embargo, debe notarse que varios factores influyen sustancialmente en el efecto observado, la dependencia de la dosis inductora de depleción celular T, la vía de administración y la dosis del antígeno. La administración de una dosis única de AcM anti-CD4 o anti-CD8 previo a la inmunización con el EGF hu/rec en ACF no reduce significativamente la respuesta contra este antígeno. Por el contrario, similar depleción linfoide

transitoria inducida en el curso del desarrollo de la respuesta inmune incrementa la pendiente de incremento de la respuesta inmune así como los títulos de anticuerpos contra el EGF, fundamentalmente con el uso de AcM anti-CD4, aunque sin existir una modificación del patrón de subclases de inmunoglobulinas desarrolladas contra ese antígeno.

Resulta de particular interés que la combinación donde se observó un incremento significativo de la respuesta inmune contra el EGF heterólogo, utilizado como antígeno vacunal, también induce un incremento significativo de la respuesta contra el EGF murino. Estas moléculas portan un 70 % de homología lo que permitiría la asunción que la especificidad de la regulación de la repuesta contra el EGF es compartida entre ambos antígenos y pudiera ser una evidencia de la conservación evolutiva de este proceso.

El hallazgo del incremento de la respuesta inmune al EGF como resultado de un protocolo combinado de inmunización e inducción de linfopenia transitoria constituye una evidencia a favor de la intervención de los mecanismos de regulación periférica en la respuesta contra Ag solubles. Considerando la potencial aplicación clínica inmediata de este hecho y teniendo en consideración precedentes tanto en modelos experimentales de enfermedades autoinmunes, así como en protocolos de inmunoterapia activa específica en cáncer sustentan el efecto potenciador de la respuesta inmune específica del pre-tratamiento con drogas quimioterapéuticas como la Ciclofosfamida como potencial sustituto en la aplicación de este concepto en la clínica.

La Ciclofosfamida es un medicamento citotóxico con capacidad de inducir depleción transitoria de células linfoides. Igualmente, empíricamente ha sido evaluado este medicamento con el interés de incrementar la respuesta a antígenos vacunales, administrado previo al esquema de inmunización, asumiéndose su capacidad de eliminación de células supresoras [174, 175], Alternativamente, en nuestras condiciones experimentales se demostró que la administración de

CY en el curso de la inmunización modula la respuesta inmune contra el EGF, con dependencia de la dosis. El uso de la Ciclofosfamida a 300 mg/kg de peso, dosis a la cual induce un nivel de depleción de linfocitos CD4+ y CD8+ similar la de los respectivos AcM, lejos de potenciar la respuesta inmune la reduce, lo que puede ser consecuencia de su efecto citotóxico inespecífico. Sorprendentemente, al evaluar el protocolo combinado con una formulación vacunal actualmente en evaluación clínica, la cual toma ventaja de la conjugación química de este antígeno a una molécula xenógena (P64k) que aporta señales co-estimuladoras en el proceso de respuesta inmune contra el EGF [64], se observó que el tratamiento con CY incrementa la respuesta contra el antígeno propio, pero no contra la molécula xenógena. Este hallazgo pudiera tener dos interpretaciones, por un lado que el proceso de regulación inmune es predominantemente contra los antígenos propios, explicación poco plausible si se considera reportes previos que documentan la existencia de Treg en la respuesta contra patógenos [221]. Alternativamente, se pudiera considerar que la cinética del desarrollo de los mecanismos de control de inmunidad y la expansión de células Treg es dependiente de la interacción previa del antígeno con el sistema inmune, independientemente de su naturaleza. Esta última explicación pudiera sustentarse en hecho de que en individuos sanos existe autorreactividad natural contra el EGF [52], lo que pudiera involucrar la activación natural de Treg específicas.

Los estudios sobre autoinmunidad al MOG y al EGF descritos nos permiten proponer una definición operacional de un Ag del HI. Así, un antígeno propio homuncular es aquel que: es reconocido por autoanticuerpos naturales y células T en individuos sanos, se expresa en el timo, activa una respuesta inmune más efectiva cuando está acompañado por señales accesorias tales como adyuvantes y epítopes o moléculas transportadoras, la respuesta inmune al Ag puede incrementarse mediante supresión de la regulación inmune y el Ag puede ser molécula blanco en

una enfermedad autoinmune. Tales criterios se cumplen para estos dos antígenos y aunque no se

	Criterio	MOG	EGF
han descrito	Existencia de repertorio natural inmune en individuos sanos	+ [52]	+ [223]*
enfermedades	Expresión en células epiteliales tímicas medulares	+ [224]	? [225]
autoinmunes contra el	Necesidad de señales accesorias para respuesta inmune más efectiva	+ [49]*	+ [63]*
EGF, se ha reportado	Incremento de la respuesta inmune por supresión de la regulación inmune	+ [226]*	+ [223]*
que en pacientes con	Antígeno blanco de Enfermedad Autoinmune	+ [49]	? [222]
Lupus Eritematoso			
Sistémico la presencia			
de autoanticuerpos			
circulantes contra una			
región de la			

Figura 30. Definición operacional del “homúnculo inmunológico.” Se resumen los criterios propuestos para la estratificación de los autoantígenos según su relevancia en la autoinmunidad tumoral. (+) Existencia de datos que sustentan el criterio correspondiente, (?) Dato incompleto o no concluyente, (*) Dato obtenido o confirmado durante el desarrollo del presente trabajo. Se incluyen entre corchetes las referencias correspondientes.

trombomodulina que contiene dominios de EGF constituye un factor de riesgo para la ocurrencia de trombosis [222],

De los resultados anteriores se pueden extraer importantes nociones para la inmunología tumoral tales como: vacunas de cáncer inmunogénicas pueden estar basadas en el uso de antígenos homunculares y no sólo en neo-antígenos tumor específicos, conclusión razonable ya que esta autoinmunidad natural está garantizada en una relativa alta frecuencia de células T y B específicas. Para sobrepasar los mecanismos de regulación que controlan la autoinmunidad natural se requieren altas dosis de antígeno, frecuentes y repetidas inmunizaciones que incluyan adyuvantes contentivos de potentes señales co-estimuladoras. Pero fundamentalmente, los protocolos de vacunación terapéutica del cáncer deben incluir el uso de tratamientos inmunosupresivos o mejor, capaces de eliminar o “relajar” la regulación inmune, entre los que

pueden considerarse, los medicamentos citotóxicos y radiación, procedimientos que inducen linfopenias transitorias como efecto secundario.

Finalmente, en el cuarto capítulo experimental de este trabajo se realizó la demostración formal de estos postulados evaluando el impacto antitumoral de las combinaciones terapéuticas de la vacuna EGF con procedimiento inductores de linfopenia transitoria.

Un hallazgo experimental de gran interés derivado de este bloque experimental resultó la disminución de la respuesta inmune contra el antígeno vacunal EGF en animales portadores del Carcinoma Pulmonar de Lewis en su variante pobremente inmunogénica y altamente metastásica en ratones singénicos C57BL/6 [181] y que expresa el receptor de EGF. Este efecto constituye un ejemplo del efecto de la presencia tumoral en la disminución de la capacidad del SI en la respuesta contra antígenos relevantes al mismo. Significativamente, la administración de anticuerpos anti-CD25 tiene un impacto significativo en la sobrevida de los ratones portadores de este tumor, aunque sólo previo a la inoculación del tumor primario. Estos resultados de conjunto pueden ser indicativos de la capacidad moduladora de la respuesta inmune, potencialmente vinculada a la capacidad de los tumores de reforzar los mecanismos de tolerancia periférica a sus antígenos asociados y está en correspondencia con resultados recientes demostrativos del incremento de la población celular CD4+CD25+ en individuos con cáncer [227-230]. El efecto antitumoral inducido por el pre-tratamiento con AcM confirma la similitud de los mecanismos de regulación periférica impidiendo la respuesta inmune efectiva contra antígenos propios en las enfermedades autoinmunes y los tumores [231]. No obstante, coarta la potencial aplicación clínica de este enfoque terapéutico ya que generalmente el diagnóstico de la existencia de tumores en los pacientes se realiza en fases avanzadas de la enfermedad, donde al menos

experimentalmente, la depleción de células CD25 no repercute sustancialmente en la evolución tumoral.

Así mismo, este resultado brinda una oportunidad a la aplicación combinada de las vacunas de cáncer en conjunción con manipulaciones que actúan sobre los mecanismos de regulación inmune periférica. Significativamente, la aplicación del esquema terapéutico VIV con el AcM anti-CD25 facilitó el incremento de la respuesta de anticuerpos anti-EGF en sujetos portadores del tumor 3LL-D122, asociado a un impacto en el efecto antimetastásico y en la supervivencia de los animales. De igual forma, la aplicación de Ciclofosfamida como inductor de linfopenia funcional transitoria permite el acercamiento de estos resultados experimentales a la práctica médica.

En general, estos resultados experimentales permiten desde el punto de vista teórico documentar la relevancia de los mecanismos de regulación inmune periférica durante la fase de inducción de la respuesta inmune contra los antígenos propios. Este trabajo tributa al sustento del modelo emergente de "tolerancia dominante" y provee evidencias para la efectiva manipulación de la autorreactividad natural, ya sea hacia el incremento o disminución de la respuesta inmune específica contra antígenos propios. Fundamentalmente, sugieren que una descripción precisa de la función reguladora de las células T en pacientes con cáncer, pudiera conducir a la combinación racional de vacunas terapéuticas antitumorales basadas en antígenos propios, aplicadas en circunstancias donde los mecanismos de inmunorregulación puedan suprimirse temporalmente bajo esquemas de linfopenia funcional transitoria, procedimiento que puede contribuir a incrementar la respuesta anti-vacunal y consecuentemente antitumoral.

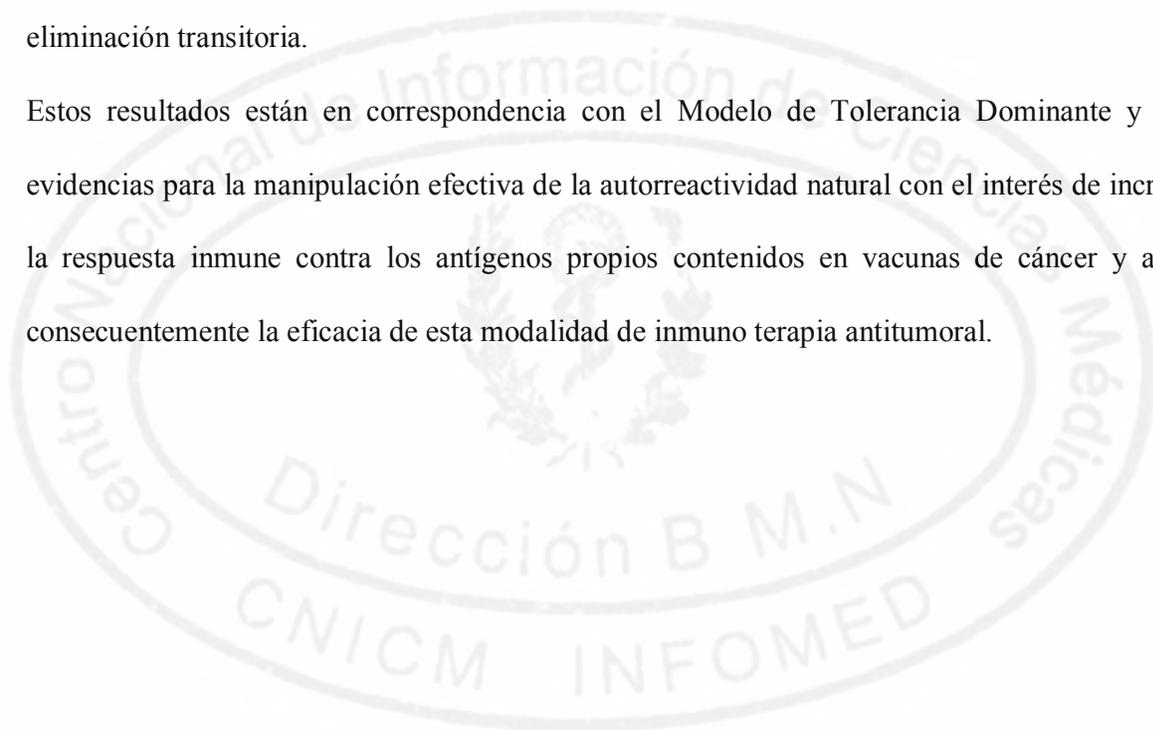


4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

- La depleción transitoria de las subpoblaciones linfoides T CD4+CD25+ y CD8+ acelera el curso de la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental inducida por la inmunización con el péptido 35-55 del MOG. El tratamiento con AcM anti-CD25 induce un incremento sostenido de la repuesta inmune celular específica, de la respuesta de anticuerpos y de la producción de IFN- γ .
- El esquema de inmunosupresión con Ciclosporina A capaz de inducir enfermedades autoinmunes por linfopenia también induce inmunidad antitumoral en animales neonatos pero no en animales adultos, donde se logran mínimos resultados antitumorales combinando su administración con los AcM anti-CD4 y anti-CD8.
- La inmunosupresión transitoria con Ciclofosfamida y Anticuerpos Monoclonales anti-CD4 y anti-CD25 incrementa la respuesta de anticuerpos contra el Factor de Crecimiento Epidérmico heterólogo y autólogo. Este efecto es dependiente del esquema y de la dosis del tratamiento inmunosupresor.
- La respuesta inmune contra la vacuna de cáncer basada en el antígeno propio EGF disminuye por la presencia de tumor en los sujetos inmunizados, lo que puede significar que el tumor refuerza los mecanismos de tolerancia a los antígenos propios que expresa.
- El tratamiento de sujetos con tumores en condiciones adyuvantes combinando la inmunosupresión con Ciclofosfamida o con el AcM anti-CD25 en el curso de la inmunización con la vacuna de cáncer que contiene el Factor de Crecimiento Epidérmico incrementa la respuesta inmune contra la vacuna y tiene impacto favorable en la sobrevida.
- Es posible direccionar la respuesta contra antígenos propios inducida por linfopenia transitoria.

- La potenciación de la respuesta contra antígenos propios inducida por linfopenia transitoria es dependiente del esquema de tratamiento, lográndose mayor efecto cuando se aplica posterior a la primera inmunización y cuando el pool linfocitario periférico se comienza a recuperar.
- Las células T reguladoras CD4+CD25+ pueden contribuir a limitar la respuesta frente a las vacunas de cáncer basada en antígenos propios en los sujetos con tumores, efecto que se revierte con su eliminación transitoria.
- Estos resultados están en correspondencia con el Modelo de Tolerancia Dominante y proveen evidencias para la manipulación efectiva de la autorreactividad natural con el interés de incrementar la respuesta inmune contra los antígenos propios contenidos en vacunas de cáncer y aumentar consecuentemente la eficacia de esta modalidad de inmuno terapia antitumoral.



4.2. RECOMENDACIONES

- Ampliar la caracterización cinética de la dependencia de esquemas de combinación de inmunosupresores con vacunas de cáncer con efecto potenciador de la respuesta inmune.
- Explorar el requerimiento de mayor número de dosis de esquemas de combinación de inmunosupresores con vacunas de cáncer con el interés de mantener la actividad antitumoral inducida ya sea por incremento mantenido de la potenciación de la respuesta inmune o al contrarrestar el posible reforzamiento de la tolerancia originado por el tumor.
- Extender la evaluación del efecto potenciador de la combinación de inmunosupresores a otras modalidades de vacunas de cáncer.
- Evaluar la influencia de la edad en el efecto potenciador de la respuesta inmune a vacunas de cáncer por combinación a inmunosupresores.
- Comparar el efecto potenciador de la combinación de inmunosupresores con otras vacunas basadas en antígenos propios y no-propios.
- Ampliar la caracterización de la dicotomía existente entre la existencia de un fenotipo linfoide T regulador y el carácter homeostático de la regeneración del repertorio inmune en la explicación del fenómeno de la potenciación de la respuesta inmune por inmunosupresión.
- Evaluar la potencial asociación entre el fenotipo linfoide T regulador y el tipo de antígeno de acuerdo a su origen.
- Evaluar la memoria a la respuesta inmune generada por la combinación de inmunosupresores con vacunas.
- Caracterizar los mecanismos moleculares de regulación de la respuesta inmune en sujetos con tumores y sometidos a inmunoterapia con vacunas de cáncer.

- Evaluar el efecto potenciador de la combinación de inmunosupresores con vacunas de cáncer en pacientes portadores de tumores.





5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Bumet FM, Fenner F, *The Production of Antibodies*. 1949, Melbourne/London: Macmillan.
2. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. (1953) Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 4379(172):603-606.
3. Bumet FM. (1957) A modification of Jeme's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *The Australian J Sci* 20:67-69.
4. Bumet FM, *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*. 1959, Nashville (TN): Vanderbilt Univ. Press.
5. Lederberg J. (1959) Genes and antibodies - Do antigens bear instruction for antibody specificity or do they select cell lines that arise by mutation? *Science* 129:1649-1653.
6. Langman RE, Cohn M. (2000) Self-nonsel self discrimination revisited. Introduction. *Semin Immunol* 12(3): 159-62.
7. Ramsdell F, Lantz T, Fowlkes BJ. (1989) A nondeletional mechanism of thymic self tolerance. *Science* 246(4933):1038-41.
8. Roberts JL, Sharrow SO, Singer A. (1990) Clonal deletion and clonal anergy in the thymus induced by cellular elements with different radiation sensitivities. *J Exp Med* 171(3):935-40.
9. Goldrath AW, Bevan MJ. (1999) Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402(6759):255-62.
10. Kamradt T, Mitchison NA. (2001) Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 344(9):655-64.
11. Benjamín RJ, Waldmann H. (1986) Induction of tolerance by monoclonal antibody therapy. *Nature* 320(6061):449-51.
12. Cobbold SP, Jayasuriya A, Nash A, Prospero TD, Waldmann H. (1984) Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets in vivo. *Nature* 312(5994):548-51.
13. Chatenoud L. (2003) CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. *Nat Rev Immunol* 3(2): 123-32.
14. Jameson SC, Bevan MJ. (1998) T-cell selection. *Curr Opin Immunol* 10(2):214-9.
15. Pereira P, Fomi L, Larsson EL, Cooper M, Heusser C, Coutinho A. (1986) Autonomous activation of B and T cells in antigen-free mice. *Eur J Immunol* 16(6):685-8.
16. Avrameas S, Guilbert B, Dighiero G. (1981) Natural antibodies against tubulin, actin myoglobin, thyroglobulin, fetuin, albumin and transferrin are present in normal human sera, and monoclonal immunoglobulins from multiple myeloma and Waldenstrom's macroglobulinemia may express similar antibody specificities. *Ann Immunol (Paris)* 132C(2):231-6.
17. Cohén IR. (1986) Regulation of autoimmune disease physiological and therapeutic. *Immunol Rev* 94:5-21.
18. Freitas AA, Rocha B. (2000) Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu Rev Immunol* 18:83-111.
19. Freitas AA. (1995) Lymphocytes in a model ecosystem. *Res Immunol* 146(4-5):225-33.
20. Bumet FM. (1970) The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13:1-27.
21. Oíd LJ, Boyse EA, Clarke DA, Carswell EA. (1962) Antigenic properties of chemically-induced tumors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 101:80-106.
22. Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Peí A. (1994) Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 12:337-65.

23. Herberman RB. (1992) Tumor immunology. *Jama* 268(20):2935-9.
24. Gilboa E. (1996) Immunotherapy of cancer with genetically modified tumor vaccines. *Semin Oncol* 23(1): 101-7.
25. Houghton AN. (1994) Cancer antigens: immune recognition of self and altered self *J Exp Med* 180(1): 1 -4.
26. Lafaille JJ, Nagashima K, Katsuki M, Tonegawa S. (1994) High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell* 78(3):399-408.
27. Fowell D, Masón D. (1993) Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4⁺ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. *J Exp Med* 177(3):627-36.
28. Sakaguchi S, Sakaguchi N. (1989) Organ-specific autoimmune disease induced in mice by elimination of T cell subsets. V. Neonatal administration of cyclosporin A causes autoimmune disease. *J Immunol* 142(2):471-80.
29. Gleeson PA, Toh BH, van Driel IR. (1996) Organ-specific autoimmunity induced by lymphopenia *Immunol Rev* 149:97-125.
30. Sakaguchi S, Toda M, Asano M, Itoh M, Morse SS, Sakaguchi N. (1996) T cell-mediated maintenance of natural self-tolerance: its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases. *J Autoimmun* 9(2):211-20.
31. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155(3): 1151-64.
32. Cohén IR. (1992) The cognitive principle challenges clonal selection. *Immunol Today* 13(11):441 -4.
33. Cohén IR. (1992) The cognitive paradigm and the immunological homunculus. *Immunol Today* 13(12):490-4.
34. Nobrega A, Haury M, Grandien A, Malanchere E, Sundblad A, Coutinho A. (1993) Global analysis of antibody repertoires. II. Evidence for specificity, self-selection and the immunological "homunculus" of antibodies in normal serum. *Eur J Immunol* 23(11):2851-9.
35. Coutinho A. (1989) Beyond clonal selection and network. *Immunol Rev* 110:63-87.
36. Cohén IR, *Tending Adam's Garden: Evolving the Cognitive Immune Self*. 2000, London: Academic Press.
37. Coutinho A, Hori S, Carvalho T, Caramalho I, Demengeot J. (2001) Regulatory T cells: the physiology of autoreactivity in dominant tolerance and "quality control" of immune responses. *Immunol Rev* 182:89-98.
38. Francois Bach J. (2003) Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol* 3(3): 189- 98.
39. Shevach EM. (2002) CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2(6):389-400.
40. Stephens LA, Mottet C, Masón D, Powrie F. (2001) Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol* 31(4): 1247-54.

41. Stephens LA, Masón D. (2000) CD25 is a marker for CD4⁺ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25⁺ and CD25⁻ subpopulations. *J Immunol* 165(6):3105-10.
42. Gershon RK, Kondo K. (1970) Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18(5):723-37.
43. Gershon RK, Kondo K. (1971) Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21(6):903-14.
44. Jiang H, Zhang SI, Pems B. (1992) Role of CD8⁺ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 256(5060): 1213-5.
45. Jiang H, Chess L. (2000) The specific regulation of immune responses by CD8⁺ T cells restricted by the MHC class Ib molecule, Qa-1. *Annu Rev Immunol* 18:185-216.
46. Koh DR, Fung-Leung WP, Ho A, Gray D, Acha-Orbea H, Mak TW. (1992) Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8^{-/-} mice. *Science* 256(5060):1210-3.
47. Bluestone JA, Abbas AK. (2003) Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 3(3):253-7.
48. Yura M, Takahashi I, Serada M, Koshio T, Nakagami K, Yuki Y, Kiyono H. (2001) Role of MOG-stimulated Th1 type "light up" (GFP⁺) CD4⁺ T cells for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Autoimmun* 17(1): 17-25.
49. Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A. (1995) A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* 25(7): 1951-9.
50. Bernard CC, Johns TG, Slavin A, Ichikawa M, Ewing C, Liu J, Bettadapura J. (1997) Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med* 75(2):77-88.
51. Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, Dilitz E, Deisenhammer F, Reindl M. (2003) Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med* 349(2): 139-45.
52. Quintana FJ, Cohén IR. (2001) Autoantibody patterns in diabetes-prone NOD mice and in standard C57BL/6 mice. *J Autoimmun* 17(3): 191-7.
53. Sakaguchi S. (2000) Animal models of autoimmunity and their relevance to human diseases. *Curr Opin Immunol* 12(6):684-90.
54. Carpenter G, Cohén S. (1979) Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem* 48:193-216.
55. Cohén S, Carpenter G. (1975) Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(4): 1317-21.
56. Gregory H. (1975) Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature* 257(5524):325-7.
57. Starkey RH, Cohén S, Orth DN. (1975) Epidermal growth factor: identification of a new hormone in human urine. *Science* 189(4205):800-2.
58. Shoenfeld Y, *The Decade of Autoimmunity*. 1999, Amsterdam, Netherland: Elsevier Health Sciences. 1-452.
59. Hara I, Takechi Y, Houghton AN. (1995) Implicating a role for immune recognition of self in tumor rejection: passive immunization against the brown locus protein. *J Exp Med* 182(5):1609-14.

60. Naftzger C, Takechi Y, Kohda H, Hara I, Vijayasaradhi S, Houghton AN. (1996) Immune response to a differentiation antigen induced by altered antigen: a study of tumor rejection and autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25): 14809-14.
61. Weber LW, Bowne WB, Wolchok JD, Srinivasan R, Qin J, Moroi Y, Clynes R, Song P, Lewis JJ, Houghton AN. (1998) Tumor immunity and autoimmunity induced by immunization with homologous DNA. *J Clin Invest* 102(6): 1258-64.
62. González G, Sánchez B, Suarez E, Beausoleil I, Perez O, Lastre M, Lage A. (1996) Induction of Immune Recognition of Self Epidermal Growth Factor (EGF): Effect on EGF biodistribution and Tumor Growth. *Vaccine Research* 5(4):233-244.
63. González G, Pardo OL, Sánchez B, Garcia JL, Beausoleil I, Marinello P, González Y, Domarco A, Guillen G, Perez R, Lage A. (1997) Induction of Immune Recognition of Self Epidermal Growth Factor II: Characterization of the Antibody Immune Response and the Use of a Fusión Protein. *Vaccine Research* 6(2):91 -100.
64. González G, Crombet T, Catala M, Mirabal V, Hernández JC, González Y, Marinello P, Guillen G, Lage A. (1998) A novel cáncer vaccine composed of human-recombinant epidermal growth factor linked to a carrier protein: report of a pilot clinical trial. *Ann Oncol* 9(4):431-5.
65. González G, Crombet T, Torres F, Catala M, Alfonso L, Osorio M, Neningen E, Garcia B, Mulet A, Perez R, Lage R. (2003) Epidermal growth factor-based cáncer vaccine for non-small-cell lung cáncer therapy. *Ann Oncol* 14(3):461-6.
66. Perez R, Pascual M, Macias A, Lage A. (1984) Epidermal growth factor receptors in human breast cáncer. *Breast Cáncer Res Treat* 4(3): 189-93.
67. Mendelsohn J. (2001) The epidermal growth factor receptor as a target for cáncer therapy. *Endocr Relat Cáncer* 8(1):3-9.
68. Huston DP. (1997) The biology of the immune system. *Jama* 278(22):1804-14.
69. Silverstein AM. (2002) The Clonal Selection Theory: what it really is and why modern challenges are misplaced. *Nat Immunol* 3(9):793-6.
70. Silverstein AM. (2003) Darwinism and immunology: from Metchnikoff to Burnet. *Nat Immunol* 4(1):3-6.
71. Burnet FM, *Self and Not-Self*. 1969, Cambridge: Cambridge Univ. Press.
72. Wilson D, *The science of self: a report of the new immunology*. 1971, Essex: Longman.
73. Klein J, *Immunology: the science of self-nonsel self discrimination*. 1982, New York: Wiley.
74. Schorle H, Holtschke T, Hunig T, Schimpl A, Horak I. (1991) Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* 352(6336):621-4.
75. Nelson BH. (2004) IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J Immunol* 172(7):3983-8.
76. Bretscher P. (2000) Contemporary models for peripheral tolerance and the classical 'historical postúlate'. *Semin Immunol* 12(3):221-9; discussion 257-344.
77. Langman RE, Cohn M. (2000) A minimal model for the self-nonsel self discrimination: a return to the basics. *Semin Immunol* 12(3): 189-95; discussion 257-344.
78. Mitchison NA, Katz DR, Chain B. (2000) Self/nonsel self discrimination among immunoregulatory (CD4) T cells. *Semin Immunol* 12(3): 179-83; discussion 257-344.
79. Zinkernagel RM. (2000) Localization dose and time of antigens determine immune reactivity. *Semin Immunol* 12(3): 163-71; discussion 257-344.
80. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. (2000) How does the immune system distinguish self from nonself? *Semin Immunol* 12(3): 185-8; discussion 257-344.

81. Anderson CC, Matzinger P. (2000) Danger: the view from the bottom of the cliff. *Semin Immunol* 12(3):231-8; discussion 257-344.
82. Cohén IR, *Tending Adam's Garden: Evolving the Cognitive Immune Self*. 1999, San Diego, California: Academic Press.
83. Bach JF. (2002) The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 347(12):911-20.
84. Egan AF, Chappel JA, Burghaus PA, Morris JS, McBride JS, Holder AA, Kaslow DC, Riley EM. (1995) Serum antibodies from malaria-exposed people recognize conserved epitopes formed by the two epidermal growth factor motifs of MSP 1(19), the carboxy-terminal fragment of the major merozoite surface protein of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 63(2):456-66.
85. Morgan WD, Birdsall B, Frenkiel TA, Gradwell MG, Burghaus PA, Syed SE, Uthaipibull C, Holder AA, Feeney J. (1999) Solution structure of an EGF module pair from the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *J Mol Biol* 289(1): 113-22.
86. Sakaguchi S. (2004) Naturally Arising CD4+ Regulatory T Cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Responses. *Annu Rev Immunol* 22:531-562.
87. Coutinho A, Fomi L, Holmberg D, Ivars F, Vaz N. (1984) From an antigen-centered, clonal perspective of immune responses to an organism-centered, network perspective of autonomous activity in a self-referential immune system. *Immunol Rev* 79:151-68.
88. Cohén IR. (2000) Discrimination and dialogue in the immune system. *Semin Immunol* 12(3):215-9; discussion 257-344.
89. Coutinho A. (2000) Germ-line selection ensures embryonic autoreactivity and a positive discrimination of self mediated by supraclonal mechanisms. *Semin Immunol* 12(3):205-13; discussion 257-344.
90. Grossman Z, Paul WE. (2000) Self-tolerance: context dependent tuning of T cell antigen recognition. *Semin Immunol* 12(3): 197-203; discussion 257-344.
91. Silverstein AM, Rose NR. (2000) There is only one immune system! The view from immunopathology. *Semin Immunol* 12(3): 173-8; discussion 257-344.
92. Venanzi ES, Benoist C, Mathis D. (2004) Good riddance: Thymocyte clonal deletion prevents autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 16(2): 197-202.
93. Saoudi A, Seddon B, Heath V, Fowell D, Masón D. (1996) The physiological role of regulatory T cells in the prevention of autoimmunity: the function of the thymus in the generation of the regulatory T cell subset. *Immunol Rev* 149:195-216.
94. Nishizuka Y, Sakakura T. (1969) Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166(906):753-5.
95. Sakaguchi S, Takahashi T, Nishizuka Y. (1982) Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J Exp Med* 156(6): 1577-86.
96. Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. (1985) Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 161(1):72-87.
97. Maloy KJ, Powrie F. (2001) Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2(9):816-22.
98. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. (2004) Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Semin Immunol* 16(2):89-98.

99. Powrie F, Masón D. (1989) The MRC OX-22- CD4+ T cells that help B cells in secondary immune responses derive from naive precursors with the MRC OX-22+ CD4+ phenotype. *J Exp Med* 169(3):653-62.
100. McKeever U, Mordes JP, Greiner DL, Appel MC, Rozing J, Handler ES, Rossini AA. (1990) Adoptive transfer of autoimmune diabetes and thyroiditis to athymic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(19):7618-22.
101. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL. (1993) Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol* 5(11): 1461-71.
102. Piccirillo CA, Shevach EM. (2004) Naturally-occurring CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Semin Immunol* 16(2):81-8.
103. Shih FF, Mandik-Nayak L, Wipke BT, Alien PM. (2004) Massive Thymic Deletion Results in Systemic Autoimmunity through Elimination of CD4+ CD25+ T Regulatory Cells. *J Exp Med* 199(3):323-35.
104. Jordán MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, Najj A, Catón AJ. (2001) Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2(4):301-6.
105. Groux H. (2003) Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses. *Transplantation* 75(9 Suppl):8S-12S.
106. Fehervari Z, Sakaguchi S. (2004) A paragon of self-tolerance: CD25+CD4+ regulatory T cells and the control of immune responses. *Arthritis Res Ther* 6(1): 19-25.
107. Nakamura K, Kitani A, Strober W. (2001) Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta *J Exp Med* 194(5):629-44.
108. Tung KS, Agersborg SS, Alard P, Garza KM, Lou YH. (2001) Regulatory T-cell, endogenous antigen and neonatal environment in the prevention and induction of autoimmune disease. *Immunol Rev* 182:135-48.
109. Dunn GP, Oid LJ, Schreiber RD. (2004) The Three Es of Cáncer Immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22:329-360.
110. Prehn RT, Main JM. (1957) Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Natl Cáncer Inst* 18(6):769-78.
111. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Oid LJ, Schreiber RD. (2002) Cáncer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3(11):991-8.
112. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Oid LJ, Schreiber RD. (2001) IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410(6832): 1107-11.
113. Stanta G, Campagner L, Cavallieri F, Giarelli L. (1997) Cáncer of the oldest oíd. What we have learned from autopsy studies. *Clin Geriatr Med* 13(1):55-68.
114. Penn I. (1996) Malignant melanoma in organ allograft recipients. *Transplantation* 61(2):274-8.
115. Otley CC, Pittelkow MR. (2000) Skin cáncer in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 6(3):253-62.
116. Penn I. (1995) Sarcomas in organ allograft recipients. *Transplantation* 60(12): 1485-91.

117. Pham SM, Kormos RL, Landreneau RJ, Kawai A, Gonzalez-Cancel I, Hardesty RL, Hattler BG, Griffith BP. (1995) Solid tumors after heart transplantation: lethality of lung cancer. *Ann Thorac Surg* 60(6): 1623-6.
118. Hakim FT, Flomerfelt FA, Boyiadzis M, Gress RE. (2004) Aging, immunity and cancer. *Curr Opin Immunol* 16(2): 151-6.
119. Wang RF, Rosenberg SA. (1999) Human tumor antigens for cancer vaccine development. *Immunol Rev* 170:85-100.
120. Nagorsen D, Scheibenbogen C, Marineóla FM, Letsch A, Keilholz U. (2003) Natural T cell immunity against cancer. *Clin Cancer Res* 9(12):4296-303.
121. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G. (2003) Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348(3):203-13.
122. Zom E, Hercend T. (1999) A MAGE-6-encoded peptide is recognized by expanded lymphocytes infiltrating a spontaneously regressing human primary melanoma lesion. *Eur J Immunol* 29(2):602-7.
123. Pardoll D. (2003) Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol* 21:807-39.
124. Mapara MY, Sykes M. (2004) Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J Clin Oncol* 22(6): 1136-51.
125. Degiovanni G, Lahaye T, Herin M, Hainaut P, Boon T. (1988) Antigenic heterogeneity of a human melanoma tumor detected by autologous CTL clones. *Eur J Immunol* 18(5):671-6.
126. Porgador A, Feldman M, Eisenbach L. (1989) H-2Kb transfection of B16 melanoma cells results in reduced tumourigenicity and metastatic competence. *J Immunogenet* 16(4-5):291-303.
127. Ferrone S, Marineóla FM. (1995) Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today* 16(10):487-94.
128. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M, Stem PL. (1997) Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 18(2):89-95.
129. Gilboa E, Nair SK, Lysterly HK. (1998) Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 46(2):82-7.
130. Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. (1997) TAP off—tumors on. *Immunol Today* 18(6):292-9.
131. Bodmer S, Strommer K, Frei K, Siepl C, de Tribolet N, Heid I, Fontana A. (1989) Immunosuppression and transforming growth factor-beta in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor-beta 2. *J Immunol* 143(10):3222-9.
132. Maeurer MJ, Gollin SM, Martin D, Swaney W, Bryant J, Castelli C, Robbins P, Parmiani G, Storkus WJ, Lotze MT. (1996) Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *J Clin Invest* 98(7): 1633-41.

133. Lee KH, Panelli MC, Kim CJ, Riker AI, Bettinotti MP, Roden MM, Fetsch P, Abatí A, Rosenberg SA,Marineóla FM. (1998) Functional dissociation between local and systemic immune response during anti-melanoma peptide vaccination. *J Immunol* 161 (8):4183-94.
134. Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S, Pardoll D,Levitsky H. (1998) Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Nati Acad Sci U S A* 95(3): 1178-83.
135. Peles E, Yarden Y. (1993) Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors. *Bioessays* 15(12):815-24.
136. Riese DJ, 2nd, Stem DF. (1998) Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 20(1):41-8.
137. Harris RC, Chung E,Coffey RJ. (2003) EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 284(1):2-13.
138. Massague J, Pandiella A. (1993) Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* 62:515-41.
139. Carpenter G. (1987) Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu Rev Biochem* 56:881-914.
140. Carpenter G, King L, Jr.,Cohén S. (1978) Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature* 276(5686):409-10.
141. Ushiro H, Cohén S. (1980) Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J Biol Chem* 255(18):8363-5.
142. de Larco JE, Todaro GJ. (1978) Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation. *J Cell Physiol* 94(3):335-42.
143. Hunter T. (2000) Signaling—2000 and beyond. *Cell* 100(1): 113-27.
144. Pawson T, Gish GD,Nash P. (2001) SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol* 11(12):504-11.
145. Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Zalutsky MR, Fuller GN, Archer GE, Friedman HS, Kwatra MM, Bigner SH,Bigner DD. (1990) Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusión junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma *Proc Nati Acad Sci U S A* 87(11):4207-11.
146. Jungbluth AA, Stockert E, Huang HJ, Collins VP, Copian K, Iversen K, Kolb D, Johns TJ, Scott AM, Gullick WJ, Ritter G, Cohén L, Scanlan MJ, Cavenee WK,Old LJ. (2003) A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the human epidermal growth factor receptor. *Proc Nati Acad Sci U S A* 100(2):639-44.
147. Arteaga CL. (2002) Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. *Semin Oncol* 29(5 Suppl 14):3-9.
148. Sizeland AM, Burgess AW. (1992) Anti-sense transforming growth factor alpha oligonucleotides inhibit autocrine stimulated proliferation of a colon carcinoma cell line. *Mol Biol Cell* 3(11): 1235-43.
149. Brandt R, Eisenbrandt R, Leenders F, Zschiesche W, Binas B, Juergensen C,Theuring F. (2000) Mammary gland specific hEGF receptor transgene expression induces neoplasia and inhibits differentiation. *Oncogene* 19(17):2129-37.
150. Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, LaMantia C, Mourton T, Herrup K, Harris RC,et al. (1995) Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269(5221):230-4.

151. Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Wetb Z, **Derynck R. (1995)** Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 376(6538):337-41.
152. Sibilina M, Steinbach JP, Stingl L, Aguzzi A, Wagner EF. (1998) A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *Embo J* 17(3):719-31.
153. Dancy JE, Freidlin B. (2003) Targeting epidermal growth factor receptor—are we missing the mark? *Lancet* 362(9377):62-4.
154. Arteaga CL. (2003) ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Exp Cell Res* 284(1): 122-30.
155. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S. (2003) An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 12(3):541 -52.
156. Cohén S. (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 237:1555-62.
157. Tsutsumi O, Oka T. (1987) Epidermal growth factor deficiency during pregnancy causes abortion in mice. *Am J Obstet Gynecol* 156(1):241-4.
158. Greene HL, Moore MC, Said HM, Ghishan FK, Orth DN. (1987) Intestinal glucose transport in suckling rats fed artificial milk with and without added epidermal growth factor. *Pediatr Res* 21(4):404-8.
159. Berseth CL. (1987) Enhancement of intestinal growth in neonatal rats by epidermal growth factor in milk. *Am J Physiol* 253(5 Pt 1):G662-5.
160. Raaberg L, Nexø E, Jørgensen PE, Poulsen SS, Jakab M. (1995) Fetal effects of epidermal growth factor deficiency induced in rats by autoantibodies against epidermal growth factor. *Pediatr Res* 37(2): 175-81.
161. Raaberg L, Nexø E, Poulsen SS, Jørgensen PE. (1995) An immunologic approach to induction of epidermal growth factor deficiency: induction and characterization of autoantibodies to epidermal growth factor in rats. *Pediatr Res* 37(2): 169-74.
162. Sigal NH, Dumont FJ. (1992) Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction. *Annu Rev Immunol* 10:519-60.
163. Baumann G, Zenke G, Wenger R, Hiestand P, Quesniaux V, Andersen E, Schreier MH. (1992) Molecular mechanisms of immunosuppression. *J Autoimmun* 5 Suppl A:67-72.
164. Kahan BD. (1989) Cyclosporine. *N Engl J Med* 321 (25): 1725-38.
165. Damoiseaux JG. (2002) Cyclosporin A-induced autoimmunity in the rat: central versus peripheral tolerance. *Int J Immunopathol Pharmacol* 15(2):81 -87.
166. Wu DY, Goldschneider I. (1999) Cyclosporin A-induced autologous graft-versus-host disease: a prototypical model of autoimmunity and active (dominant) tolerance coordinately induced by recent thymic emigrants. *J Immunol* 162(11):6926-33.
167. Anderson G, Anderson KL, Conroy LA, Hallam TJ, Moore NC, Owen JJ, Jenkinson EJ. (1995) Intracellular signaling events during positive and negative selection of CD4+CD8+ thymocytes in vitro. *J Immunol* 154(8):3636-43.
168. Hess AD, Thoburn CJ. (1997) Immunobiology and immunotherapeutic implications of syngeneic/autologous graft-versus-host disease. *Immunol Rev* 157:111-23.
169. Gao EK, Lo D, Cheney R, Kanagawa O, Sprent J. (1988) Abnormal differentiation of thymocytes in mice treated with cyclosporin A. *Nature* 336(6195): 176-9.
170. Jenkins MK, Schwartz RH, Pardoll DM. (1988) Effects of cyclosporine A on T cell development and clonal deletion. *Science* 241 (4873): 1655-8.

171. Urdahl KB, Pardoll DM, Jenkins MK. (1994) Cyclosporin A inhibits positive selection and delays negative selection in alpha beta TCR transgenic mice. *J Immunol* 152(6):2853-9.
172. Barrett SP, Toh BH, Alderuccio F, van Driel IR, Gleeson PA. (1995) Organ-specific autoimmunity induced by adult thymectomy and cyclophosphamide-induced lymphopenia *Eur J Immunol* 25(1):238-44.
173. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Magrath IT, Shad AT, Horowitz ME, Wexler LH, Adde MA, McClure LL, Gress RE. (1994) Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer. *Blood* 84(7):2221-8.
174. Turk JL, Parker D. (1982) Effect of cyclophosphamide on immunological control mechanisms. *Immunol Rev* 65:99-113.
175. Bass KK, Mastrangelo MJ. (1998) Immunopotential with low-dose cyclophosphamide in the active specific immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 47(1): 1-12.
176. Mitchell MS, Kan-Mitchell J, Kempf RA, Harel W, Shau HY, Lind S. (1988) Active specific immunotherapy for melanoma: phase I trial of allogeneic lysates and a novel adjuvant. *Cancer Res* 48(20):5883-93.
177. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. (1999) Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 59(13):3128-33.
178. Kerlero de Rosbo N, Mendel I, Ben-Nun A. (1995) Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with a delayed onset and an atypical clinical course, induced in PL/J mice by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-derived peptide: preliminary analysis of MOG T cell epitopes. *Eur J Immunol* 25(4):985-93.
179. Kerlero de Rosbo N, Milo R, Lees MB, Burger D, Bernard CC, Ben-Nun A. (1993) Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis. Peripheral blood lymphocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Clin Invest* 92(6):2602-8.
180. Yamamoto N, Naraparaju VR. (1997) Immunotherapy of BALB/c mice bearing Ehrlich ascites tumor with vitamin D-binding protein-derived macrophage activating factor. *Cancer Res* 57(11):2187-92.
181. Eisenbach L, Hollander N, Greenfeld L, Yakor H, Segal S, Feldman M. (1984) The differential expression of H-2K versus H-2D antigens, distinguishing high-metastatic from low-metastatic clones, is correlated with the immunogenic properties of the tumor cells. *Int J Cancer* 34(4):567-73.
182. Begolka WS, Vanderlugt CL, Rahbe SM, Miller SD. (1998) Differential expression of inflammatory cytokines parallels progression of central nervous system pathology in two clinically distinct models of multiple sclerosis. *J Immunol* 161 (8):4437-46.
183. Ben-Nun A, Mendel I, Kerlero de Rosbo N. (1997) Immunomodulation of murine experimental autoimmune encephalomyelitis by pertussis toxin: the protective activity, but not the disease-enhancing activity, can be attributed to the nontoxic B-oligomer. *Proc Assoc Am Physicians* 109(2): 120-5.
184. Kamradt T, Soloway PD, Perkins DL, Geftner ML. (1991) Pertussis toxin prevents the induction of peripheral T cell anergy and enhances the T cell response to an encephalitogenic peptide of myelin basic protein. *J Immunol* 147(10):3296-302.
185. Blankenhorn EP, Butterfield RJ, Rigby R, Cort L, Giambrone D, McDermott P, McEntee K, Solowski N, Meeker ND, Zachary JF, Doerge RW, Teuscher C. (2000) Genetic analysis of the influence of pertussis toxin on experimental allergic encephalomyelitis

- susceptibility: an environmental agent can override genetic checkpoints. *J Immunol* 164(6):3420-5.
186. Walker LS, Abbas AK. (2002) The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2(1): 11-9.
187. Stockinger B, Barthlott T, Kassiotis G. (2001) T cell regulation: a special job or everyone's responsibility? *Nat Immunol* 2(9):757-8.
188. Gurusathan S, Stobie L, Prussin C, Sacks DL, Gleichenhau N, Iwasaki A, Fowell DJ, Locksley RM, Chang JT, Wu CY, Seder RA. (2000) Requirements for the maintenance of Th1 immunity in vivo following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells. *J Immunol* 165(2):915-24.
189. Hill JO, Awwad M, North RJ. (1989) Elimination of CD4+ suppressor T cells from susceptible BALB/c mice releases CD8+ T lymphocytes to mediate protective immunity against *Leishmania*. *J Exp Med* 169(5): 1819-27.
190. McHugh RS, Shevach EM, Margulies DH, Natarajan K. (2001) A T cell receptor transgenic model of severe, spontaneous organ-specific autoimmunity. *Eur J Immunol* 31(7):2094-103.
191. Bach JF. (2001) Non-Th2 regulatory T-cell control of Th1 autoimmunity. *Scand J Immunol* 54(1-2):21-9.
192. Battaglia M, Blazar BR, Roncarolo MG. (2002) The puzzling world of murine T regulatory cells. *Microbes Infect* 4(5):559-66.
193. von Budingen HC, Tanuma N, Villoslada P, Ouallet JC, Hauser SL, Genain CP. (2001) Immune responses against the myelin/oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune demyelination. *J Clin Immunol* 21 (3): 155-70.
194. Bernard CC, Johns TG, Slavin A, Ichikawa M, Ewing C, Liu J, Bettadapura J. (1997) Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med* 75(2):77-88.
195. Kumar V, Sercarz EE. (1993) The involvement of T cell receptor peptide-specific regulatory CD4+ T cells in recovery from antigen-induced autoimmune disease. *J Exp Med* 178(3):909-16.
196. Thomson AM, Shevach EM. (1998) CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188(2):287-96.
197. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. (2001) Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 193(11): 1295-302.
198. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. (2001) Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 193(11): 1285-94.
199. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. (2001) Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 193(11):1303-10.
200. Furtado GC, Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. (2002) Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med* 196(6):851 -7.
201. Hurwitz AA, Sullivan TJ, Sobel RA, Allison JP. (2002) Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) limits the expansion of encephalitogenic T cells in experimental autoimmune

- encephalomyelitis (EAE)-resistant BALB/c mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5):3013-7.
202. Hofstetter HH, Sewell DL, Liu F, Sandor M, Forsthuber T, Lehmann PV, Fabry Z. (2003) Autoreactive T cells promote post-traumatic healing in the central nervous system. *J Neuroimmunol* 134(1-2):25-34.
203. Wing K, Lindgren S, Kollberg G, Lundgren A, Harris RA, Rudin A, Lundin S, Suri-Payer E. (2003) CD4 T cell activation by myelin oligodendrocyte glycoprotein is suppressed by adult but not cord blood CD25+ T cells. *Eur J Immunol* 33(3):579-87.
204. Valbonesi M, Montani F, Florio G, Zerbi D, Beltramelli A. (1984) Plasmapheresis combined with lymphocytapheresis and cytotoxic drugs as a therapeutic modality in neuroimmunological diseases. *Ital J Neurol Sci* 5(1):35-40.
205. Tanaka A, Ikegami H, Shima K. (1988) Rebound of antibody titer to insulin following rechallenge with thiamazole in a patient with insulin autoimmune syndrome. *Tokushima J Exp Med* 35(1-2):37-41.
206. Silva VA, Seder RH, Weintraub LR. (1994) Synchronization of plasma exchange and cyclophosphamide in severe and refractory autoimmune hemolytic anemia. *J Clin Apheresis* 9(2): 120-3.
207. Speiser DE, Miranda R, Zakarian A, Bachmann MF, McKall-Faienza K, Odermatt B, Hanahan D, Zinkemagel RM, Ohashi PS. (1997) Self antigens expressed by solid tumors Do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy. *J Exp Med* 186(5):645-53.
208. Fisher B, Fisher ER, Sakai A. (1965) Experimental studies of factors influencing hepatic metastases. XV. Effect of neonatal thymectomy. *Cancer Res* 25(7):993-6.
209. Fidler IJ, Gersten DM, Kripke ML. (1979) Influence of immune status on the metastasis of three murine fibrosarcomas of different immunogenicities. *Cancer Res* 39(10):3816-21.
210. Eccles SA, Heckford SE, Alexander P. (1980) Effect of cyclosporin A on the growth and spontaneous metastasis of syngeneic animal tumours. *Br J Cancer* 42(2):252-9.
211. Chow DA. (1995) Reduced tumorigenicity of threshold syngeneic tumor inocula in xid-bearing mice treated with natural antibodies. *Int J Cancer* 60(6):848-53.
212. Bennet RD, Chow DA. (1991) Inverse correlation between natural antitumor antibodies and tumor susceptibility in individual xid-bearing mice. *Nat Immun Cell Growth Regul* 10(1):45-55.
213. Chow DA, Bennet RD. (1989) Low natural antibody and low in vivo tumor resistance, in xid-bearing B-cell deficient mice. *J Immunol* 142(10):3702-6.
214. Casali P, Notkins AL. (1989) Probing the human B-cell repertoire with EBV: polyreactive antibodies and CD5+ B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 7:513-35.
215. Rothstein TL. (2002) Cutting edge commentary: two B-1 or not to be one. *J Immunol* 168(9):4257-61.
216. Bartlett GL. (1972) Effect of host immunity on the antigenic strength of primary tumors. *J Natl Cancer Inst* 49(2):493-504.
217. Restifo NP, Antony PA, Finkelstein SE, Leitner WW, Surman DP, Theoret MR, Touloukian CE. (2002) Assumptions of the tumor 'escape' hypothesis. *Semin Cancer Biol* 12(1):81-6.
218. Silvestrini R, Daidone MG, Luisi A, Mastore M, Leutner M, Salvadori B. (1997) Cell proliferation in 3,800 node-negative breast cancers: consistency over time of biological

- and clinical information provided by 3H-thymidine labelling index. *Int J Cáncer* 74(1): 122-7.
219. Nahta R, Hortobagyi GN, Esteva FJ. (2003) Growth factor receptors in breast cancer: potential for therapeutic intervention. *Oncologist* 8(1):5-17.
 220. Horig H, Kaufman HL. (1999) Current issues in cancer vaccine development. *Clin Immunol* 92(3):211-23.
 221. McGuirk P, McCann C, Mills KH. (2002) Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med* 195(2):221-31.
 222. Oosting JD, Preissner KT, Derksen RH, de Groot PG. (1993) Autoantibodies directed against the epidermal growth factor-like domains of thrombomodulin inhibit protein C activation in vitro. *Br J Haematol* 85(4):761-8.
 223. González G, Montero E, León K, Cohén IR, Lage A. (2002) Autoimmunization to epidermal growth factor, a component of the immunological homunculus. *Autoimmun Rev* 1(1-2):89-95.
 224. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. (2001) Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self *Nat Immunol* 2(11): 1032-9.
 225. Freitas CS, Dalmau SR, Kovary K, Savino W. (1998) Epidermal growth factor modulates fetal thymocyte growth and differentiation. *Dev Immunol* 5(3): 169-82.
 226. Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. (2002) Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 169(9):4712-6.
 227. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH. (2001) Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cáncer Res* 61(12):4766-72.
 228. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. (2003) Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cáncer Res* 9(2):606-12.
 229. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S. (2002) Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J Exp Med* 196(3):379-87.
 230. Woo EY, Yeh H, Chu CS, Schlienger K, Carroll RG, Riley JL, Kaiser LR, June CH. (2002) Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* 168(9):4272-6.
 231. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S. (1999) Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 162(9):5317-26.