

CELULAS ASESINAS NATURALES

E. KLEIN

Pruebas de citotoxicidad mediadas por células en inmunología tumoral.

La respuesta inmune contra los tumores experimentales inducidos a la vez químicamente y por virus fue descubierta en los estudios de trasplante realizados hace dos décadas. Se ha demostrado que la inmunización de animales consanguíneos con tumores singénicos transplantados, o los huéspedes autóctonos con tumores primarios, produce varios grados de protección contra el desafío subsiguiente de las células viables del mismo tumor (1).

El trabajo en el cual se basa esta publicación fue realizado acorde al Contrato NOI - CB - 64023 y NOI-CB - 74144 con la División de Biología y Diagnóstico del Cáncer, Instituto Nacional del Cáncer, Departamento de Salud, Educación y Bienestar, Suecia. Algunos subsidios fueron igualmente otorgados por la Sociedad Sueca de Cáncer.

Dra. Eva Klein: Subdirectora del Instituto de Biología Tumoral, Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia.

Solicitud de separatas a la Dra. Klein.

La inmunidad celular fue demostrada por primera vez mediante transferencia adoptiva, en experimentos de neutralización en los cuales las células linfoides derivadas de donantes inmunes, combinadas con los injertos tumorales impedían su crecimiento (2,3).

Habiéndose demostrado que las reacciones mediadas por células eran probablemente más importantes para el rechazo del tumor que los anticuerpos séricos se puso mayor énfasis sobre las pruebas de linfocitotoxicidad in vitro y muchos investigadores presumieron que esas pruebas reflejarían los eventos in vivo. Sin embargo esas suposiciones resultaron erróneas. Una de las contradicciones más frecuentemente mencionadas, es la reactividad cruzada in vitro de tumores inducidos químicamente, con las células embrionarias, y su antigenicidad individual en las pruebas de rechazo (4,5).

Inicialmente, los estudios de citotoxicidad mediada por células realizados en sistemas experimentales y en pacientes con diferentes tipos de tumor, mostraron invaria-

blemente reactividades selectivas específicas del tumor (6).

Las líneas de base tomadas para el cálculo de los efectos relacionados con el tumor eran la supervivencia de las células blanco sin o después de añadir los linfocitos de control seleccionados de manera apropiada. Los efectos de las células de control eran atribuidos a la condiciones del sistema de cultivo o no eran notables si los controles del medio no eran incluidos. Tomando en consideración esos efectos, se ha revelado posteriormente que las células con capacidad de atacar algunas líneas de células tumorales están presentes en la sangre de personas sanas (7 - 10).

Similarmente en el ratón, al usar los linfomas con blanco, se descubre que algunas líneas cultivadas son afectadas por las células del bazo de animales jóvenes no manipulados (11,12). Además de las células del bazo, se ha encontrado que los linfocitos de la sangre son altamente activos (13), las células de los ganglios linfáticos y de la médula ósea menos activas y las del timo inactivas. En el hombre, el efecto se demostró primero con linfocitos de la sangre; las células de los ganglios linfáticos y los linfocitos infiltrados en el tumor resultaron activos sólo ocasionalmente.(14).

Células asesinas naturales (Natural Killer Cells: NK).

Este descubrimiento ha originado estudios intensos en varios laboratorios principalmente por dos razones: 1) Caracterización de un nuevo fenómeno citotóxico y 2) Con el fin de realizar una condición de prueba que se podría usar en los estudios de inmunidad tumoral para revelar los efectos relacionados con la enfermedad. En este caso es necesario caracterizar y remover la subpoblación responsable de este efecto.

En los ratones la reactividad varía mucho entre las diferentes cepas y se ha en-

contrado una influencia pronunciada de la edad con mayor actividad alrededor de los dos meses. Las células del bazo del ratón recién nacido y del ratón viejo invariablemente muestran baja o ninguna actividad. Los ratones "nude" atímicos con una variedad de bases genéticas son activos (11,12). El efecto designado como NK - efecto asesino natural - representa una citotoxicidad mediada por una célula hasta ahora desconocida puesto que no la desempeñan las células T y es diferente de la citotoxicidad linfóide dependiente de anticuerpos. Solo las líneas de células cultivadas son altamente sensibles, las células colectadas de animales son ligeramente afectadas o insensibles. Se ha encontrado que la sensibilidad de varias líneas de células de ratas o ratones varía. Se ha sugerido que el blanco en la superficie de la célula está determinado por virus tipo C (12). Sin embargo cuando se hicieron pruebas con varias líneas de células, no hubo correlación entre la sensibilidad al efecto NK del ratón y la expresión de algunos de los antígenos virales en la superficie celular (15). Se ha encontrado que las células del ratón matan las líneas celulares humanas y vice-versa, aun cuando las reactividades homologas son más fuertes (16, 17).

Existe actualmente un interés considerable en el efecto NK de los sistemas animales, puesto que uno de los problemas más importantes es la relevancia in vivo del fenómeno. Las pruebas de trasplante realizadas con una línea de linfomas han mostrado, en efecto, que el rechazo de pequeños inóculos por parte de varios ratones semisingénicos va paralelo a la reactividad in vitro de la cepa (18).

Cuando una línea sensible de linfomas YAC-1 llevada in vitro es transplantada de nuevo y propagada en ratones, su sensibilidad declina (19). Este experimento y la norma según la cual las líneas cultivadas son altamente sensibles indicarían que este tipo de respuesta del huésped es extremadamente eficiente y que sólo células de este tipo se pueden fijar por largo tiempo en el hués-

ped que carece de sensibilidad a dicho mecanismo. Consecuentemente, el sistema NK puede representar un mecanismo potente de vigilancia inmunológica. La sensibilidad no es una característica obligatoria de las células tumorales. Sin embargo se puede presumir que si durante la oncogénesis surgen células malignas con sensibilidad a la célula NK, deben ser eliminadas.

Por otra parte no hay todavía conocimiento acerca del papel del efecto, NK en la oncogénesis, a pesar de que se haya encontrado que la actividad NK del bazo se reduce relativamente en los animales con tumores (sean inducidos o transplantados) (12,13) y en pacientes con tumores (14,20). Los argumentos en contra de este papel son los siguientes: 1) No existe ninguna correlación entre la eficiencia del NK y la sensibilidad a la leucemogénesis inducida por el virus de Moloney cuando se comparan las diferentes cepas. Se admite que la leucemogénesis es el resultado de varios factores, algunos no relacionados con la respuesta inmune. 2) Los sarcomas inducidos por MSV regresan en los ratones A tan frecuentemente como en otras cepas, pero en esta cepa a diferencia de la CBA o los CBA x C57B1 F1, no se ha comprobado ninguna actividad citotóxica cuando los linfocitos infiltrantes en el tumor o el bazo son probados contra las células YAC - 1, que son uno de los blancos más sensibles al NK (13). 3) Los ratones infectados por el virus de la leucemia de Moloney (medida que conduce al desarrollo de la leucemia) no son diferentes en cuanto a las células del bazo y ejercen una actividad citotóxica (anti - YAC - 1) cuando se hace la prueba paralela con controles de la misma edad no infectados (21). 4) Los ratones, portadores de gránulos de Metilcolantreno y que por consiguiente desarrollan sarcomas, no demuestran ningún cambio en la eficiencia del NK esplénico cuando se comparan con controles de la misma edad (22). Se ha informado que esos ratones tienen disminuido el número de células productoras de anticuerpos en el bazo (23).

En todo caso, indicativo del papel de las células NK en la vigilancia inmune es la baja incidencia de tumores que ocurren naturalmente en los ratones "nude" (24), probablemente desprotegidos puesto que carecen de los mecanismos dependientes y mediados por la célula T considerados como cruciales en el rechazo del injerto. Como lo mencionamos anteriormente, los ratones atímicos poseen células efectoras NK.

La naturaleza de la estructura de superficie que reconocen las células efectoras es desconocida. Puesto que las células de cultivos continuos son generalmente sensibles, se ha propuesto, por lo menos como uno de los factores, la incorporación de algún componente de suero bovino en la membrana (25). Sin embargo esta posibilidad no fue confirmada (26); las líneas celulares cultivadas en medios que llevaran suero humano resultaron tan sensibles al efecto de los linfocitos humanos como aquellos llevados a cabo paralelamente en suero fetal bovino.

La selectividad no es evidente, pero parece depender de la sensibilidad general de la línea celular. En todo caso, la selectividad fue señalada en estudios hechos con un conjunto de líneas de células humanas y varios donantes de sangre (27).

Como en el ratón, los linfocitos activos en el hombre no son las células T o B bien caracterizadas y el efecto no está restringido al complejo mayor de histocompatibilidad.

Varios autores han intentado definir los efectores en el sistema NK humano. La separación de subgrupos con monitoria de marcadores de superficie simultáneamente con estudios de función revelaron que la llamada fracción "null", es decir la población no adherente a la fibra de nylon a la cual se le ha removido los linfocitos formadores de rosetas con eritrocitos de carnero, es la más activa (28,29). Esta población es rica en células positivas para el receptor FC (30). La

mayoría de los autores, basándose en los resultados de varios sistemas blanco convienen en que las células activas no son portadoras de inmunoglobulinas de superficie y son positivas para el receptor FC (30,31). La divergencia de opiniones acerca de otros marcadores puede deberse en parte a la variación en la metodología de fraccionamiento y detección de los marcadores de superficie. Existe igualmente una diferencia en la consideración de los resultados. Un subgrupo de células puede ser altamente activo como el "null" - pero su representación en la población de linfocitos puede ser relativamente baja. Otros subgrupos pueden ser bajos en actividad cuando son calculados en base a una célula pero pueden ser más representativos para el total de la población como el subgrupo T que forma las rosetas E.

Los resultados de por lo menos dos estudios convienen que parte de las células activas pueden formar rosetas con eritrocitos de carnero (SRBC) dependiendo de la condición de formación de rosetas (30,32). Según nuestros resultados, esas células T son portadoras de receptores FC (30). Se ha demostrado que el subgrupo "null" altamente activo tiene una gran proporción de células portadoras de receptor C3 (33). Las células maduras T con receptores de gran avidéz para los eritrocitos de carnero y desprovistas de receptores FC no son activas. De este modo se ha demostrado en esas células los receptores FC y la poca avidéz por los receptores E y C3, y también que las verdaderas células "null" (sin marcadores) son activas (29).

Se concibe que más de un tipo de célula contribuye con diferentes funciones. Peter et al. suponían que un subgrupo produce un factor soluble que entra en contacto con las células blanco y que otro ejerce la destrucción (34). De manera similar, Tagasaki et al. (27) y Perlmann et al. (35) presumen que el efecto es esencialmente una citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) en donde las células efectoras llevan anticuerpos citofílicos en la superficie y/o un pequeño número de células combinadas

productoras de anticuerpos contribuyen durante la incubación in vitro. Se ha probado que los subgrupos hasta ahora activos en los NK son también eficientes en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Aún en los órganos, la distribución de los dos tipos de efectos se sobrepone.

En un intento de diferenciar esas dos funciones en el hombre, estudiamos las condiciones del catión y la cinética de destrucción en las células asesinas generadas por NK, ADCC y MLC (cultivo mixto de linfocitos) usando las mismas células blanco. No encontramos ninguna diferencia (36). La inhibición de la ADCC pero no del NK por adición de la proteína A y la inhibición del NK pero no del ADCC por tratamiento con tripsina, llevó Herberman et al. a suponer que el mecanismo de los dos efectos puede ser diferente.

Por falta de conocimiento acerca de su iniciación, se designa el efecto por el atributo "natural" aún cuando no se excluye la posibilidad de que podría ser generado por inmunización clásica.

Las células T citotóxicas pueden ser generadas por cultivo in vitro con células alogénicas o células de tumor singénico (37). Cuando las células esplénicas de ratón o los linfocitos de la sangre del hombre se cultivan solos, la actividad NK disminuye (12,38).

En los ratones, el cultivo de las células del bazo con células singénicas NK sensibles, genera una actividad citotóxica con características NK, es decir las células efectoras generalmente no destruyen la sublínea insensible cuando se hace la prueba con células frescas (39). Se ha demostrado también con la cepa del ratón A cuyo bazo es poco reactivo. Las células asesinas pueden así estar presentes en baja proporción en el bazo y ser seleccionadas por cocultivo con las células blanco.

En el hombre los experimentos de este género son más complejos puesto que requieren una combinación autóloga, de otro modo las diferencias de histocompatibilidad generan células citotóxicas. La línea linfoblástica K562 ampliamente usada como blanco para el efecto NK carece de HLA y de los determinantes Ia (40). Teóricamente, esto eliminaría la posibilidad de generación de las células T citotóxicas. Al utilizar el K62 como célula sensibilizadora in vitro, hemos encontrado que el potencial citotóxico de los linfocitos cultivados está fuertemente incrementado (38). El cultivo fue realizado en presencia del suero del donante de linfocitos. Cuando se ha fraccionado el cultivo en subgrupos, la actividad depende de los linfocitos transformados en blastos y las células portadoras del receptor Fc. Se ha encontrado que las características de toxicidad son similares a las de la sangre fresca en que las células con inmunoglobulinas en la superficie (SIg) y las que sedimentan en Ficoll con SRBC no eran activas. Característico de la población cultivada, a diferencia de las células frescas es la mayor proporción de células adherentes a la fibra de nylon, entre ellas se encuentran también las portadoras del receptor E.

Citotoxicidad relacionada con enfermedad.

Puesto que se considera que el reconocimiento específico celular reside en la población de células T y que las células T maduras no tienen efecto NK sea en el hombre, el ratón o la rata, la detección de citotoxicidad relacionada con enfermedad en las líneas celulares se cree posible usando los subgrupos enriquecidos en esas células.

Los efectos mediados por la célula T se pueden investigar directamente in vitro o después de sensibilización in vitro, se logran cultivando las células efectoras de la población en presencia de células portadoras de antígeno (37).

Un nuevo aspecto del sistema efector T en las células alteradas químicamente o por virus ha suscitado últimamente un interés general porque se ha descubierto que las células blanco y las efectoras tienen que compartir antígenos de histocompatibilidad (41,42) Actualmente se piensa que la restricción no es absoluta y que puede ser superada hasta cierto punto especialmente en pruebas de citotoxicidad con incubación prolongada (43).

Basándose en esta restricción, se duda si las líneas celulares puedan usarse como blanco prototipo en los estudios humanos. Es posible que los experimentos se deban restringir a los sistemas autólogos. En todo caso, por lo menos en una enfermedad humana - la mononucleosis infecciosa - se ha demostrado en prueba a corto plazo la citotoxicidad mediada por la célula T en células blanco alogénicas.

Este estudio es interesante bajo diferentes aspectos. Es importante el haber mostrado los efectos relacionados con la enfermedad sea después de la eliminación de las células NK activas (44) sea probando el subgrupo T maduro aislado (45). Los blancos usados fueron las líneas de células linfoblásticas y sólo aquellas portadoras de la información genética EBV y que probablemente revelaban un antígeno de célula de superficie relacionada con EBV, eran dañadas. Este estudio ilustra también la relativa facilidad para planear experimentos que demuestren los efectos específicos si se conocen las características de la célula blanco en cuanto a la enfermedad estudiada. Esta condición no se encuentra fácilmente en los sistemas de tumor humano excepto en el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo. En pocos de esos pacientes, la citotoxicidad selectiva relacionada con EBV fue demostrada con linfocitos derivados de ganglios linfáticos y aquellos que infiltran los tumores (46).

Se hicieron pruebas en 10 pacientes con cáncer mamario para la citotoxicidad en

las líneas celulares establecidas a partir de tumores mamarios como blanco. No hubo indicación de efecto específico ejercido por la fracción de célula T purificada (47). El resultado negativo se puede atribuir a la histocompatibilidad de las células efectoras y blanco.

Con el fin de eliminar algunos de los factores que impiden la interpretación de los resultados con las líneas, se diseñaron en nuestro laboratorio dos pruebas que miden el reconocimiento antitumoral mediado por células en el hombre. En ambas pruebas, a las células tumorales separadas de biopsias se les permitió reaccionar con linfocitos autólogos. La ventaja de usar las células de biopsia es que la fuente del antígeno no está sujeta a modificación y condiciones selectivas de cultivo de tejido. Sus principales desventajas son la variabilidad de la cualidad, la limitación cuantitativa y la laboriosidad de la separación de la célula tumoral.

La prueba de estimulación autóloga del tumor (ATS) (48), detecta la actividad DNA de los linfocitos después del cocultivo con las células tumorales tratadas con Mitomicina. Las células respondedoras parecen pertenecer al subgrupo T puesto que los linfocitos ligados a las células tumorales durante el primer período de cocultivo y las células blásticas transformadas al final de 6 días de cocultivo formaban rosetas con el SRBC. Igualmente cuando se usaba la población prefraccionada, la fracción enriquecida con T reaccionaba mientras que las fracciones bajas en T no lo hacían.

El ATS fue obtenido en 30% de los tumores probados. Las células derivadas de tejidos no malignos no estimulaban.

La prueba de linfocitotoxicidad autóloga (ALC) últimamente fue elaborada en una microprueba a corto plazo de liberación de ^51Cr (49). En 30 de los 90 casos, se logró la destrucción de las células de biopsia por linfocitos derivados de la sangre autóloga. En 8 pruebas las combinaciones alogé-

nicas podían ser usadas simultáneamente, permitiendo una combinación cruzada. Solo una prueba mostró una reacción cruzada. Las células de biopsia son rara vez sensibles al afecto destructivo de los linfocitos de la sangre de donantes sanos, pero el efecto NK no perturba en esta prueba.

En un paso siguiente, la generación de células citotóxicas secundarias fue intentada por cocultivo durante 6 días de linfocitos con células tumorales autólogas de biopsia, procedimiento que ha probado ser operante en algunos sistemas experimentales de tumores. En 8 de 15 casos (2 también presentaron un ALC primario) se obtuvo un ALC secundario.

Los efectos citotóxicos orientados para demostrar el reconocimiento celular selectivo en relación con la enfermedad en sistemas experimentales y en el hombre, son realizados ahora con la prevención de que existen por lo menos tres mecanismo conocidos efectores en los cuales participan los linfocitos. Los blancos pueden ser destruidos por células equipadas con receptores específicos para el antígeno (probablemente T) blancos que han sido previamente seleccionados por el reconocimiento de anticuerpos - efecto ADCC - y células que ejercen el afecto destructivo en una base aparentemente indiscriminativa por un mecanismo desconocido.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Sjögren, H.O.: Progr. Exp. Tumor Res. 6:289, 1965.
- 2.- Klein, E. and Sjögren, H.O.: Cancer Res. 20:452, 1960.
- 3.- Winn, H.J.: J. Immunol. 86:228, 1961.
- 4.- Baldwin, R.W., Glaves, D. and Vose, B.M.: Int. J. Cancer 13:135, 1974.
- 5.- Steele, G.J. and Sjögren, H.O.: Int. J. Cancer 14:435, 1974.

- 6.- Hellström, K. E. and Hellström, I.: *Adv. Immunol.* 18:209, 1974.
- 7.- Takasugi, M., Mickey, M.E. and Terasaki, P.I.: *Cancer Res.* 33:3898, 1973.
- 8.- Skurzak, H., Steiner, L., Klein, E. and Lamon, E.: *Nat. Cancer Inst. Monogr.* 37:93, 1973.
- 9.- Jondal, M. and Pross, H.: *Int. J. Cancer* 15:596, 1975.
- 10.- De Vries, J.E., Meyerung, M., Van Dongren, A. and Rümke, P.: *Int. J. Cancer*, 15:301, 1975.
- 11.- Kiessling, R., Klein, E. and Wigzell, H.: *Eur. J. Immunol.* 5:230, 1975.
- 12.- Herberman, R.B., Nunn, M.F. and Lavrin, D.H.: *Int. J. Cancer* 16:230, 1975.
- 13.- Becker, S. and Klein, E.: *Eur. J. Immunol.* 6:892, 1976.
- 14.- Vose, B.M., Vanky, F., Argov, S. and Klein, E.: *Eur. J. Immunol.* In press, 1977.
- 15.- Becker, S., Fenyö, E.M. and Klein, E.: *Eur. J. Immunol.* 6:882, 1976.
- 16.- Haller, O., Kiessling, R., Örn, A., Kärre, Nilsson, K. and Wigzell, H.: *Int. J. Cancer* 20:93, 1977.
- 17.- Hansson, M., Kärre, K., Bakács, T., Kiessling, R. and Klein, G. To be published.
- 18.- Kiessling, R., Petrányi, G., Klein, G., and Wigzell, H.: *Int. J. Cancer* 15:933, 1975.
- 19.- Becker, S., Kiessling, R and Klein, G.: To be published.
- 20.- Pross, H.F. and Baines, M.G. *Int. J. Cancer* 18:593, 1976.
- 21.- Klein, E. and Asjö, B.: To be published.
- 22.- Argov, S. and Klein, E.: To be published.
- 23.- Stjernswärd, J.: *J. Nat. Cancer Inst.* 35:885, 1965.
- 24.- Stutman, O.: *Science*, 183:534, 1974.
- 25.- Sulit, H.L., Golub, S.H., Irie, R.F., Gupta, R.K., Grooms, G.A. and Morton, D.L.: *Int. J. Cancer* 17:461, 1976.
- 26.- De Vries, J. E. and Rumke, Ph.: *Int. J. Cancer* 17:182, 1976.
- 27.- Takasugi, M., Koide, Y., Akira, D. and Ramseyer, A.: *Int. J. Cancer* 19:291, 1977.
- 28.- Hersey, P., Edwards, A., Edwards, J., Milton, G.W. and Nelson, D.: *Int. J. Cancer* 16:173, 1975.
- 29.- Bakács, T., Gergely, P., Cornain, S. and Klein, E.: *Int. J. Cancer* 19:441, 1977.
- 30.- Bakács, T., Gergely, P. and Klein, E.: *Cellular Immunology* 32:317, 1977.
- 31.- Peter, H.H., Knopp, G. and Kalden, J.R.: *Z. Imm. Forsch.* 151:263, 1976.
- 32.- West, W.H., Cannon, G.B., Kay, H.D., Bonnard, G. D. and Herbermann, R.B. *J. Immunol.* 48:355, 1977.
- 33.- Bakács, T., Klein, E., Gergely, P., and Steinitz, M.: *Z. Imm. Forsch.* In press, 1977.
- 34.- Peter, H.H., Eife, R.F. and Kalden, J.R.: *J. Immunol.* 116:342, 1976.
- 35.- Perlmann, P., Perlmann, H., Wahlin, B. and Hammarström, S.: *Proceedings of the 7th Int. Symp. of Immunopathology.* In press, 1977.
- 36.- Argov, S., and Klein, E.: To be published.
- 37.- Engers, H.D. and MacDonald, R.: *Contemporary Topics in Immunobiology.* Plenum Press, New York 5:145, 1976.
- 38.- Poros, A. and Klein, E.: To be published.
- 39.- Klein, E.: To be published.
- 40.- Drew, S.I., Terasaki, P.I., Billing, R.J., Bergh, O.J. Minowada, J. and Klein, E.: *Blood* 49:715, 1977.
- 41.- Zinkernagel, R.M. and Doherty, P.C.: *J. Exp. Med.* 141:1427, 1975.
- 42.- Shearer, G.M.: *Eur. J. Immunol.* 4:527, 1974.
- 43.- Ting, C.C. and Law, L.W.: *J. Immunol.* 188:1259, 1977.
- 44.- Svedmyr, E. and Jondal, M.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72:1622, 1975.
- 45.- Bakács, T., Svedmyr, E. and Klein, E.: To be published.
- 46.- Klein, E., Becker, S., Svedmyr, E., Jondal, M. and Vánky, F.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 276:207, 1976.
- 47.- Bakacs, T. and Klein, E.: To be published.
- 48.- Vánky, F. and Stjernswärd, J.: In: *In vitro methods in cell mediated and tumor immunity.* B. Bloom and J.R. David, eds. Vol. II, 597-606, 1976.
- 49.- Vose, B.M., Vánky, F. and Klein, E.: *Int. J. Cancer* 20:512, 1977.