

## Cambios en la expresión de las especificidades antigénicas H-2 en varias sublíneas procedentes de un mismo tumor

M. Pérez, A. Garrido, J. A. Berlanga \*, C. Bellido y F. Garrido \*

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Córdoba

(Recibido el 30 de enero de 1981)

M. PEREZ, A. GARRIDO, J. A. BERLANGA, C. BELLIDO and F. GARRIDO. *Changes in the Expression of H-2 Antigenic Specificities in Several Sublines of the Same Tumour*. Rev. esp. Fisiol., 37, 429-436. 1981.

Four sublines of the chemically induced BALB/c tumour MCG4 have been obtained after serial intraperitoneal transplantation in syngeneic recipients and have been named MCG4-O, MCG4-A, MCG4-B and MCG4-C. The four sublines have been typed for H-2 antigens in a complement dependent microradioassay with H-2 alloantisera defining H-2 specificities as well as with two syngeneic anti tumour sera: BALB/c anti MCG4-O and BALB/c anti MCG4-A.

The results obtained showed a progressive loss of the foreign H-2 antigens detected in the primitive line, MCG4-O, with a simultaneous appearance of the appropriate H-2 antigens detected in MCG4-B and MCG4-C. Furthermore the immunogenic capacity of the sublines decreases progressively with the transplantation procedures, rendering MCG4-O and MCG4-A highly immunogenic and capable of producing isoantibodies while MCG4-B and MCG4-C are poorly immunogenic.

The results could suggest that the primitive subline is heterogeneous mixture of different tumour cell types and that the cell clones similar to the recipient BALB/c (H-2<sup>d</sup>) are immunoselected by the transplantation procedures with rejection of the most immunogenic clones, which would express the foreign H-2 antigens.

La expresión de antígenos de trasplante extraños en células tumorales de ratón o en células infectadas por virus se está convirtiendo en un área de investigación de creciente interés (4, 10, 14).

El estudio de estos antígenos es importante para el conocimiento de la genética del sistema mayor de histocompatibilidad del ratón (H-2), para el conocimiento de la naturaleza y origen de los antígenos tumorales específicos de trasplante (TSTA) y para el análisis de las interacciones de los virus con las membranas celulares (5, 8, 12). Se ha sugerido que la derrepresión de aloantígenos celulares o virales podría

\* Dirección actual: Servicio de Análisis Clínicos, Sección de Inmunoquímica, Ciudad Sanitaria «Virgen de las Nieves», Granada.

desempeñar alguna función sobre la vigilancia inmunológica (11) y que la de-represión de antígenos H-2 y posiblemente otros antígenos no H-2 podría ser un mecanismo normal de vigilancia análogo a la situación artificial de interacción aloinmune (7). Esta hipótesis implica que las diferencias alélicas serían producto de diferentes genes presentes en la región cromosómica H-2 y que el polimorfismo genético es debido a la expresión de estos distintos antígenos (1). Varios laboratorios han obtenido resultados que pueden ser interpretados de acuerdo con esta hipótesis (2, 3, 9, 13, 19).

En este estudio presentamos los cambios fenotípicos observados en el tumor MCG4 al ser trasplantado intraperitonealmente en ratones singénicos BALB/c (H-2<sup>d</sup>) de forma rutinaria. Estos cambios han originado varias sublíneas que han sido caracterizadas serológicamente en la expresión de sus antígenos H-2; asimismo, en ratones singénicos se han producido isoanticuerpos frente a dos de estas sublíneas, de las que se ha comprobado su capacidad de crecimiento en ratones singénicos BALB/c.

### Material y métodos

*Ratones utilizados.* Se han utilizado las siguientes cepas de ratones: BALB/c (H-2<sup>d</sup>), B10.D2 (H-2<sup>k</sup>), CBA (H-2<sup>k</sup>), B10.BR (H-2<sup>k</sup>), C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>), B10 (H-2<sup>b</sup>), AJAX (H-2<sup>a</sup>), B10.A (H-2<sup>a</sup>), B10.HTT (H-2<sup>u</sup>), B10.HTG (H-2<sup>u</sup>) y B10.AKM (H-2<sup>m</sup>).

Los ratones, de padres donados por el Prof. Festenstein (London Hospital) y por el Prof. Schirmacher (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg), han sido criados en nuestro laboratorio.

*Células tumorales.* El tumor MCG4 es un sarcoma inducido en un ratón de la cepa BALB/c (H-2<sup>d</sup>) mediante la inyección subcutánea de 0,2 mg de metil colantreno. Mediante pases intraperito-

neales del tumor sólido se consiguió una línea ascítica, el MCG-O, cuyo fenotipo y propiedades antigénicas han sido previamente publicadas (7, 8, 15). Los tumores MCG4-A, MCG4-B y MCG4-C son sublíneas obtenidas a partir del tumor MCG4-O por pases intraperitoneales rutinarios en ratones singénicos BALB/c.

*Aloantisueros anti H-2.* Se han utilizado aloantisueros de especificidad restringida (donación del Dr. G. Ray, NIH, Bethesda, USA), que definen antígenos privados y públicos.

*Isoantisueros.* El isoantisuero BALB/c anti MCG4-O ha sido obtenido en nuestro laboratorio mediante un protocolo ya descrito (8) y su especificidad ha sido descrita anteriormente (8, 16).

El isoantisuero BALB/c anti MCG4-A ha sido obtenido recientemente en nuestro laboratorio mediante inyecciones semanales subcutáneas de células tumorales en ratones BALB/c y su posterior sangría.

*Radioensayo de liberación de cromo.* Células normales de bazo se marcaron con 100 microCi Cr<sup>51</sup> durante una hora a 37° C. Las células fueron lavadas y dispensadas en pocillos de placas de microcultivo a 10<sup>6</sup> células por pocillo. 10 µl de aloantisuero 1/10, previamente absorbido o sin absorber, se añadió por triplicado a la placa y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, posteriormente se incubó una hora a 37° C después de añadirle 50 µl de suero de conejo a 1/5 como complemento. Se tomaron 100 µl de sobrenadante de cada pocillo y se contaron en un contador gamma. La liberación espontánea de Cr<sup>51</sup> fue obtenida incubando células con complemento solo o con antisuero solo. La máxima liberación fue obtenida incubando células con agua. El porcentaje de liberación específica de Cr<sup>51</sup> se calculó según la fórmula:

$$\frac{\text{cpm experimental} - \text{cpm espontánea}}{\text{cpm máxima liberación}}$$

**Radioensayo de marcaje final.** Para el tipaje de las células tumorales se utilizó un microrradioensayo de marcaje final en el cual se mide la incorporación por las células de timidina radiactiva después de incubar las células tumorales con anti-suero y complemento (6). Los resultados se expresan como el porcentaje de reducción de captación de H<sup>3</sup> timidina comparado con las células tumorales con complemento solo o con antisuero solo.

**Procedimientos de absorción.** Para caracterizar las reacciones no esperadas, los aloantisueros anti H-2 fueron absorbidos cualitativamente con células linfoides normales o células tumorales según un método descrito previamente (7, 8).

**Prueba de supervivencia ante un implante tumoral.** Ratones BALB/c fueron trasplantados subcutáneamente con células tumorales de MCG4-O y sublíneas MCG4 para determinar la resistencia *in vivo* al crecimiento tumoral. El número de ratones supervivientes de cada grupo fue revisado diariamente.

**Resultados**

En el presente trabajo se estudian tres sublíneas diferentes del tumor MCG4 aparecidas espontáneamente al hacer pases

intraperitoneales sucesivos del tumor primitivo MCG4-O en ratones singénicos BALB/c. El tipaje directo H-2 revela que han sucedido cambios importantes en el fenotipo de dichas sublíneas (tabla I). La sublínea MCG4-C recupera los dos antígenos privados H-2 que no aparecían en el tumor MCG-O, simultáneamente se observa la desaparición de la citotoxicidad obtenido con aloantisueros que definen especificidades H-2 extrañas que eran po-

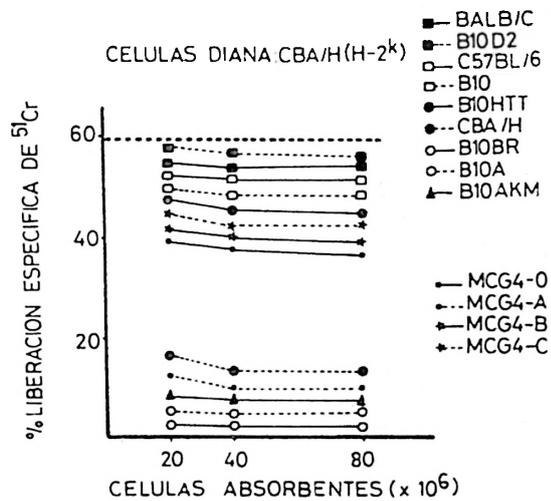


Fig. 1. Citotoxicidad del aloantisuero anti H-2K.23 absorbido cuantitativamente con células de las sublíneas del tumor MCG4 y con células linfoides normales.

Tabla I. Variación de la expresión de especificidades antigénicas normales y extrañas en sublíneas MCG4 (H-2<sup>d</sup>).

Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la captación de timidina tritiada (+++ reducción superior al 90 %, ++ reducción del 60 al 90 %, + reducción del 40 al 60 %, ± reducción del 20 al 40 %, — reducción inferior al 20 %).

Tumor	Año	Especificidades H-2 <sup>d</sup>					Especificidades extrañas					
		Privadas		Públicas			H-2 <sup>k</sup>		H-2 <sup>b</sup>		Públicas	
		H-2K.31	H-2D.4	H-2.3	H-2.13	H-2.28	Privadas	H-2K.23	H-2D.32	Privadas		H-2K.33
MCG4-O (1977)		±	—	—	—	+++	—	—	+++	++	+++	+++
MCG4-A (1978)		—	+++	+++	—	—	+++	+++	—	—	+++	+++
MCG4-B (1979)		+++	+++	+++	+++	+++	+	+	—	++	+	—
MCG4-C (1979)		+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	—

sitivas en MCG4-O (tabla I). Situaciones intermedias se observan en las sublíneas MCG4-A y MCG4-B; MCG4-A mantiene H-2.5 y expresa algunos antígenos H-2<sup>d</sup> (H-2 D.4 y H-2.3) y el H-2K.23 y H-2D.32 (tabla I); MCG-B mantiene H-2.5 y expresa todos los antígenos H-2<sup>d</sup> y el H-2K.23 y H-2D.32, aunque muy débilmente. Estos cambios fenotípicos fueron confirmados mediante absorciones de los aloantisueros con células de las distintas sublíneas y con células linfoides normales. Así la sublínea MCG4-A es capaz de

absorber la citotoxicidad del aloantisero anti H-2K.23, mientras que MCG4-O, MCG4-B y MCG4-C no la absorben

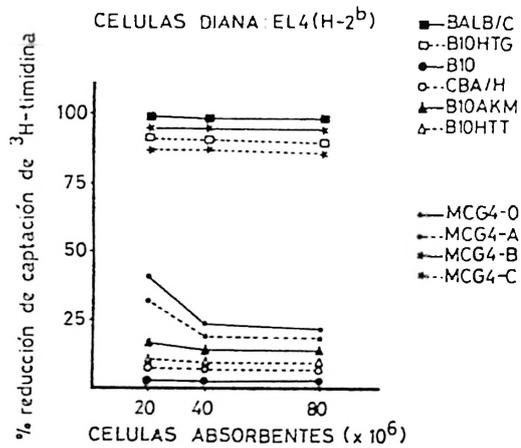


Fig. 2. Citotoxicidad del aloantisero anti H-2.5 absorbido cuantitativamente con células de las sublíneas del tumor MCG4 y con células linfoides normales.

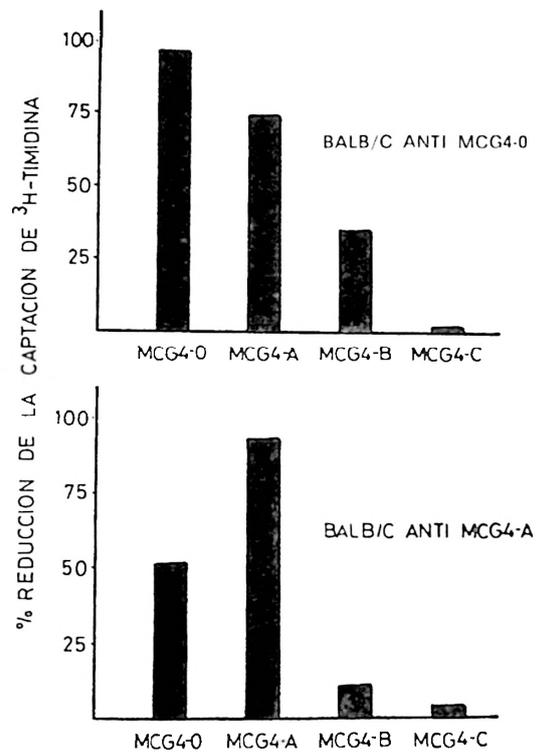


Fig. 3. Citotoxicidad de los isoantisueros BALB/c anti MCG4-O y BALB/c anti MCG4-A frente a las cuatro sublíneas del tumor MCG4.

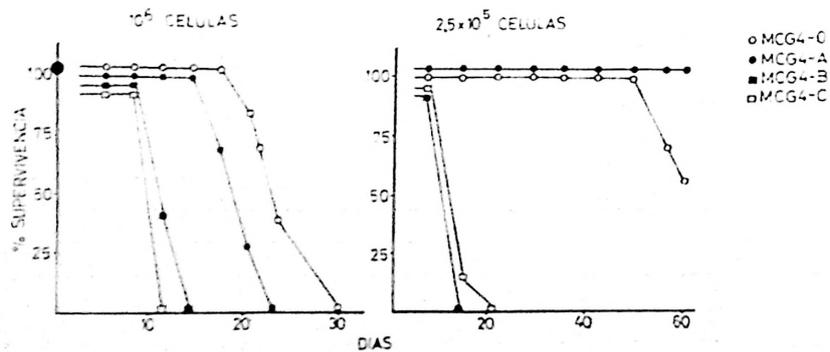


Fig. 4. Supervivencia de ratones BALB/c tras la inoculación de  $10^6$  y  $2,5 \times 10^5$  células de las distintas sublíneas del tumor MCG4.

(fig. 1); el antisuero absorbido fue probado en células de bazo de ratones CBA/H (H-2<sup>k</sup>). MCG4-O y MCG4-A absorben la actividad del antisuero anti H-2.5, mientras que MCG4-B y MCG4-C no (fig. 2); el antisuero anti H-2.5 absorbido fue positivo con células del tumor EL-4 (H-2<sup>b</sup>) (H-2.5 positivo).

Las diferencias H-2 de las cuatro sublíneas fueron también detectadas mediante los isoantisueros BALB/c anti MCG4-O y BALB/c anti MCG4-A (fig. 3), el isoantisuero anti MCG4-O fue citotóxico con las sublíneas MCG4-O y MCG4-A, débilmente frente a MCG4-B y no dio citotoxicidad frente a MCG4-C. El isoantisuero anti MCG4-A fue citotóxico con las sublíneas MCG4-O y MCG4-A y negativo con las sublíneas MCG4-B y MCG4-C.

Las diferencias serológicas encontradas se acompañan de un distinto grado de malignidad determinado por la supervivencia de los ratones portadores de las sublíneas tumorales (fig. 4).

### Discusión

En el presente estudio se ha comparado la expresión de especificidades antigénicas en las sublíneas MCG4 con el tumor ascítico original MCG4-O. Las sublíneas aparecieron espontáneamente por pases rutinarios intraperitoneales del tumor en ratones singénicos BALB/c y se les denominó MCG4-A, MCG4-B y MCG4-C. Las sublíneas fueron descubiertas al realizar controles rutinarios de tipo sobre el tumor MCG4-O.

El tumor MCG4 fue inducido en ratones BALB/c con metil colantreno en forma sólida en 1977. La forma ascítica se obtuvo por inoculaciones de trozos del tumor sólido en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c; la primera ascitis fue obtenida en 1977 mostrando importantes alteraciones fenotípicas H-2 (7), las especificidades antigénicas H-2<sup>d</sup> (H-2D.4, H-2K.31, H-2.3, H-2.8) estaban ausentes

o muy débilmente expresadas y se demostró la presencia de especificidades H-2 extrañas (H-2.5, H-2K.33 y H-2D.2). El tumor MCG4 era muy inmunógeno y se obtenían ratones regresores muy fácilmente, cuyo suero era citotóxico frente a MCG4 y reaccionaba además con células linfoides normales reconociendo un complejo aloantigénico H-2 (8, 15).

Desde 1977 el tumor ha sido pasado intraperitonealmente de forma rutinaria por inoculación de  $3-10 \times 10^6$  células tumorales. En 1979 se observó que se podían distinguir varias sublíneas cuando se tiparon células tumorales procedentes de diferentes ascitis. Estas sublíneas se caracterizan por la recuperación de las especificidades H-2<sup>d</sup> (H-2D.4, H-2K.31, H-2.3 y H-2.13) sin extrarreacciones (sublíneas MCG4-C); la reaparición de las especificidades H-2<sup>d</sup> con extrarreacciones con anti H-2K.23, anti H-2D.32 y anti H-2D.2 (sublínea MCG4-B); la reaparición de algunas especificidades H-2<sup>d</sup> (H-2D.4 y H-2.3) y la presencia de las especificidades extrañas H-2K.23, H-2D.32 y H-2.5 (sublínea MCG4-A). El tumor MCG4 original se denominó MCG4-O. Estos resultados muestran que la expresión de antígenos H-2 extraños en las sublíneas MCG4 es inversamente proporcional a la presencia de antígenos H-2<sup>d</sup> propios (tabla I).

Las sublíneas MCG4 tienen diferente capacidad de crecimiento en ratones singénicos BALB/c. La más inmunógena es MCG4-A, seguida de MCG4-O. Ambas sublíneas tienen la capacidad de producir antisuero (8, 15); MCG4-A induce, además, linfocitos T citotóxicos que reaccionan específicamente con el tumor y también con células normales alogénicas (8). Por el contrario, las sublíneas MCG4-B y MCG4-C son muy poco inmunógenas, creciendo fácilmente en ratones BALB/c (fig. 4).

Los cambios fenotípicos H-2 observados en las sublíneas MCG4 sugieren que existen poblaciones celulares independien-

tes como resultado de la regulación de la expresión genética en los procesos de carcinogénesis. Esta interpretación implica que la línea MCG4-O original es una mezcla heterogénea de células, de las cuales las más inmunógenas son fácilmente eliminadas. Esta posibilidad está de acuerdo con nuestros resultados en los cuales las sublíneas MCG4-O y MCG4-A, que son las más antiguas, son también las más inmunógenas.

Estos cambios en el fenotipo H-2 observados en las células tumorales pueden aparecer totalmente al azar o siguiendo unas vías generales que sean predecibles. Parece que la expresión de antígenos extraños no sucede al azar y que la cepa de origen del tumor ejerce una influencia importante (17). Puede ser de particular relevancia el hecho de que la especificidad pública H-2.5 fue el primer signo de expresión anómala observada en MCG4 (7) aún antes de que el H-2K.23, H-2D.32, H-2K.33 o H-2D.2 fueran demostradas. Esto está de acuerdo con resultados similares obtenidos en células leucémicas de haplotipo H-2<sup>bp</sup>, en las cuales la primera reacción de reactividad anómala fue con el antisuero anti H-2.3, y en pases posteriores se detectaron las especificidades privadas H-2 D.4 y H-2K.31 pertenecientes al haplotipo H-2<sup>d</sup> (3).

Finalmente la cuestión de la identidad o similitud entre las especificidades H-2 extrañas y los antígenos tumorales asociados al trasplante (TSTA), están aún dentro del campo de la controversia. La exclusividad de los TSTA ciertamente no favorece la relación con los antígenos H-2 extraños si asumimos que la expresión de los antígenos extraños no es al azar. No obstante, si las poblaciones celulares tumorales son heterogéneas con diferentes clones en distintas proporciones, la exclusividad de los TSTA puede ser interpretada como el resultado de la variación del número de células de diferentes clones presentes en un determinado tumor.

Recientemente hemos comprobado que

esta interpretación es cierta en los clones obtenidos en el tumor MCG4-O, habiéndose demostrado la existencia de tres tipos de células distintas: H-2<sup>-</sup>, H-2<sup>d</sup> y H-2<sup>k</sup> que, además, poseen marcadores cromosómicos e isoenzimas distintas (18).

### Resumen

Se estudian los cambios fenotípicos aparecidos en el tumor MCG4 (H-2<sup>d</sup>) tras una serie de pases intraperitoneales en ratones singénicos BALB/c (H-2<sup>d</sup>), habiéndose detectado cuatro sublíneas que han sido denominadas MCG4-O, MCG4-A, MCG4-B y MCG4-C.

Estas cuatro sublíneas tumorales han sido tipadas mediante un microrradioensayo diseñado para células que se multiplican activamente, habiendo sido enfrentadas a un panel de aloantisueros anti H-2 de especificidad restringida, y con los isoantisueros BALB/c anti MCG4-O y BALB/c anti MCG4-A.

Los resultados obtenidos muestran una progresiva pérdida de los antígenos H-2 extraños que aparecieron en el tumor primitivo MCG4-O y una simultánea reaparición de los antígenos H-2 propios de la cepa de origen y que no aparecían en el tumor primitivo. Asimismo la capacidad inmunógena del tumor va desapareciendo progresivamente, siendo muy inmunógenas y capaces de estimular la producción de isoanticuerpos las sublíneas MCG4-O y MCG4-A, mientras que MCG4-B y MCG4-C son poco o nada inmunógenas.

Se discute la posibilidad de que el tumor primitivo MCG4-O sea una mezcla heterogénea de células y que en los sucesivos pases se van eliminando las células más inmunógenas.

### Bibliografía

1. BODMER, W. F.: *Transpl. Proc.*, 5, 1471-1475, 1973.
2. BONAVIDA, B. y ROMAN, J. M.: *Immunogenetics.*, 9, 318-319, 1979.
3. CZARNOMSKA, A. y CAPKOVA, J.: *J. Immunogenetics*, 7, 39-49, 1980.
4. FESTENSTEIN, H., GARRIDO, F., MATOSSIAN-ROGERS, A., SCHIRRMACHER, V., SCHMIDT, W., DE GIORGI, L., BIASI, G. y JARAQUEMADA,

- D.: En «HLA System, Nw Aspects» (Ferrara, G. B., ed.). Elsevier, North-Holland, Biomedical Press, Amsterdam, 1977, pp. 53-57.
5. FINBERG, R., BURAKOFF, S. J., CANTOR, H. y BENACERRAF, B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5145-5149, 1978.
  6. GARRIDO, F., SCHIRRMACHER, V. y FESTENSTEIN, H.: *J. Immunogenetics*, **4**, 15-27, 1977.
  7. GARRIDO, F., PÉREZ, M. y TORRES, M. D.: *J. Immunogenetics*, **6**, 83-86, 1979.
  8. GARRIDO, F., PÉREZ, M., TORRES, M. D., GARCÍA-OLIVARES, E., IVANYI, P. y SCHIRRMACHER, V.: *Immunobiology*, **156**, 110-120, 1979.
  9. IVANYI, P., VAN MOURIK, P., BREUNING, M. y MELIEF, C.: *Transpl. Proc.*, **11**, 642-645, 1979.
  10. LINDHAL, K. F.: *Nature*, **280**, 105-106, 1979.
  11. MARTIN, W. J.: *Cell. Immunol.*, **15**, 1-10, 1975.
  12. PARMIANI, G., CARBONE, G., INVERNIZZI, G., PIEROTTI, M., SENSI, M., ROGERS, M. y APELLA, E.: *Immunogenetics*, **9**, 1-24, 1979.
  13. SCHMIDT, W., ATFIELD, G. y FESTENSTEIN, H.: *Immunogenetics*, **8**, 311-321, 1979.
  14. SCHIRRMACHER, V.: *Bearing Institute Mitt.*, **62**, 129-137, 1978.
  15. SCHIRRMACHER, V., GARRIDO, F., GARCÍA-OLIVARES, E., PÉREZ, M. y TORRES, M. D.: *J. Immunogenetics*, **7**, 51-59, 1980.
  16. SCHIRRMACHER, V., GARRIDO, F., HUBSCH, D., GARCÍA-OLIVARES, E. y KOSZINOWSKI, U.: *Transpl. Proc.*, **12**, 32-37, 1980.
  17. SCHIRRMACHER, V., HUBSCH, D. y GARRIDO, F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5409-5413 1980.
  18. SCHIRRMACHER, V., ROBINSON, P., ALTEVOGT, P., RADBRUCH, A. GARRIDO, F., KOSZINOWSKI, U., KROG, H. y LUNDIN, L.: *Transpl. Proc.*, 1981 (en prensa).
  19. ZARLING, J. y BACH, F.: *J. Exp. Med.*, **147**, 1334-1340, 1978.

