

## Estudio de antígenos característicos de cepa en células tumorales murinas mediante heteroantisueros producidos en conejo

E. García-Olivares, F. Garrido \*, F. Gutiérrez y C. Osorio

Departamento de Fisiología y Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Granada

(Recibido el 1 de agosto de 1978)

E. GARCIA-OLIVARES, F. GARRIDO, F. GUTIERREZ and C. OSORIO. *Strain-Specific Antigens Detected on Murine Tumour Cells by Means of Rabbit Heteroantisera*. Rev esp. Fisiol., 35, 153-158. 1979.

The rabbit heteroantisera anti-Meth A sarcoma (H-2<sup>d</sup>) (RAMA) and rabbit anti-RBL-5 leukemia (H-2<sup>b</sup>) (RAR-5) have been used to study the presence of normal strain antigens on the surface of different murine tumour cells.

RAR-5 detected H-2-like structures on TLX9 (H-2<sup>b</sup>) lymphoma, however RAMA did not on LSTRA leukemia (H-2<sup>d</sup>) and P815Y (H-2<sup>d</sup>) mastocytoma.

Neither RAR-5 nor RAMA contained antibodies against non-H-2 and differentiation antigens.

En estas últimas décadas se han llevado a cabo numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* sobre los antígenos de membrana de células tumorales. El interés principal ha sido, en unos casos, el encontrar una relación directa entre estos antígenos y la aparición de una neoplasia (11) y en otros, el determinar estructuras antigénicas susceptibles de ser atacadas por un sistema inmune competente que garantice el rechazo del tumor (10).

Recientes investigaciones han detectado en la membrana de ciertos tumores

murinos la presencia de antígenos alógenos codificados por el complejo H-2; es decir, antígenos no correspondientes con el haplotipo H-2 característico de esos tumores (2, 5, 6). Estos antígenos «extra» parecen estar relacionados con el rechazo inmune del tumor por el huésped singénico (4, 7, 8). En otros casos, lo que se ha observado en determinadas neoplasias, ha sido la ausencia de ciertos antígenos de membrana característicos de estas células, aunque sin conocer la influencia que pudiera tener este fenómeno en el desarrollo del proceso neoplásico.

Así, parece ser, que la célula tumoral murina y probablemente de cualquier especie, por un proceso aún no conocido

\* Dirección actual: Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina. Córdoba (España).

expresa antígenos extraños y/o inhibe la aparición de los antígenos característicos de cepa normalmente expresados en la membrana. Las nuevas especificidades aparecidas, parecen estar implicadas en el proceso del rechazo inmunológico; ahora bien, no sabemos qué implicaciones puede tener la desaparición de especificidades características (¿escape tumoral?).

En el presente trabajo se estudian estas especificidades características (antígenos codificados por el complejo H-2, antígenos no-H-2 y antígenos de diferenciación) en la membrana de células tumorales murinas, empleando heteroantisueros de conejo obtenidos por inmunización con células neoplásicas de ratón. El uso de heteroantisueros permite el reconocimiento de antígenos comunes de distinta naturaleza que pueden ser definidos mediante absorciones específicas. En anteriores publicaciones, siguiendo esta metodología, se detectaron antígenos específicos de especie y antígenos específicos de tumor en diversos tumores de ratón (1). En la presente se completa el mosaico antigénico reconocido por heteroantisueros de conejo en la membrana de células tumorales murinas, estudiando los antígenos específicos de cepa en estas células.

### Material y métodos

**Ratones.** Se han utilizado cepas endogámicas: BALB/c (H-2<sup>d</sup>), C57B1/6 (H-2<sup>b</sup>) y cepas congénicas: B10 (H-2<sup>b</sup>), B10 BR (H-2<sup>k</sup>) y B10 D2 (H-2<sup>d</sup>), mantenidas y criadas en el propio Departamento.

**Células tumorales.** Leucemia RBL-5 inducida por el virus Rauscher; linfoma TLX9 inducido por rayos X, ambos procedentes de la cepa C57B1/6 (H-2<sup>b</sup>). Sarcoma Meth A de origen químico; leucemia LSTRA, producida por el virus Moloney, ambos tumores proceden de la cepa BALB/c (H-2<sup>d</sup>). Mastocitoma P815Y,

inducido químicamente en la cepa DBA/2 (H-2<sup>d</sup>).

**Heteroantisueros.** El RAMA (rabbit anti Meth A) fue producido inoculando un conejo con sucesivas inyecciones de células del sarcoma Meth A y el RAR-5 fue inducido con inoculaciones de células de la leucemia RBL-5. Las pautas seguidas para la producción de ambos heteroantisueros han sido descritas anteriormente (1).

**Absorciones.** 50  $\mu$ l de heteroantisuero se pusieron en contacto con  $60 \times 10^6$  células linfoides de ratón. Tras agitar, la mezcla se incubó a 4° C durante una hora; el heteroantisuero absorbido fue separado mediante centrifugación.

**Radioensayo.** La técnica utilizada (6) detecta la actividad de un antisuero al tratar con éste, células tumorales en presencia de complemento, midiendo la tasa de incorporación de timidina-C<sup>14</sup> por las células tumorales supervivientes.

### Resultados

**Establecimiento de las condiciones del radioensayo.** La tabla I muestra la captación de timidina-C<sup>14</sup> por cantidades crecientes de células tumorales del sarcoma Meth A y de la leucemia RBL-5. La tasa de incorporación del isótopo es más intensa con el Meth A que con el RBL-5.

Tabla I. Captación de timidina C<sup>14</sup> (c. p. m.  $\bar{x}$  + S.D.) por cantidades crecientes de células de sarcoma Meth A y leucemia RBL-5.

N.º de células tumorales	Meth A	RBL-5
8.000	714,00 ± 31,43	631,00 ± 29,70
20.000	1.790,67 ± 100,16	1.264,00 ± 42,43
40.000	3.698,00 ± 196,00	2.360,67 ± 111,79
80.000	7.016,67 ± 172,63	4.030,00 ± 76,21
160.000	11.394,00 ± 279,63	4.870,00 ± 16,97

Tabla II. Titulación de los heteroantisueros RAMA y RAR-5 frente a Meth A sarcoma y RBL-5 leucemia respectivamente.

Las diluciones mínimas de los antisueros que no producen citotoxicidad son 1/625 en ambos casos. Los controles (medio de cultivo sin complemento, heteroantisuero sin complemento y suero normal de conejo más complemento) no producen citotoxicidad. Los valores se expresan en c.p.m. ( $\bar{x} \pm S.D.$ ).

	Medio —C'	Heteroanti-suero —C'	Suero normal de conejo + C'
RAMA-METH A	1.616,33 $\pm$ 42,09	1.532,41 $\pm$ 101,09	1.749,36 $\pm$ 14,37
RAR5-RBL5	1.016,00 $\pm$ 26,45	1.163,33 $\pm$ 23,09	1.210,66 $\pm$ 57,07
Diluciones del heteroantisuero + C'			
1/5	1/25	1/125	1/625
% reducción de la captación de C <sup>14</sup> timidina			
96,80 $\pm$ 1,69	94,83 $\pm$ 2,10	43,34 $\pm$ 9,81	2,70 $\pm$ 6,91
84,08 $\pm$ 3,26	84,16 $\pm$ 6,97	87,93 $\pm$ 3,70	-2,83 $\pm$ 3,44
			8,64 $\pm$ 2,89
			-3,34 $\pm$ 4,72

El título de ambos heteroantisueros fue semejante, 1/625 (tabla II). Los resultados se expresan en tanto por ciento de inhibición de la captación de timidina-C<sup>14</sup> cuando se compara esta captación con la de controles con suero normal de conejo en lugar de heteroantisuero.

*Reconocimiento antigénico del heteroantisuero RAR-5 en RBL-5 y TLX9.* El heteroantisuero RAR-5 mostró actividad frente a RBL-5 y TLX9, ambos de haplotipo H-2<sup>b</sup> (tabla III). La citotoxicidad frente a RBL-5 no desapareció tras absorber con células linfoides de distintas cepas C57B1/6 (H-2<sup>b</sup>), B10 (H-2<sup>b</sup>), B10 BR (H-2<sup>k</sup>), B10 D2 (H-2<sup>d</sup>), debido a la presencia en la membrana de las células tumorales de un antígeno no presente en las células normales: antígeno específico de tumor (TSA) (1).

La actividad del RAR-5 frente a TLX9 se mantuvo tras absorber con B10 BR y B10 D2, indicándonos la presencia de un antígeno común a TLX9 y RBL-5, no compartido por aquellas cepas. Sin embargo, la citotoxicidad RAR-5-TLX9 se perdió tras absorber el heteroantisuero con B10 y C57B1/6. Es decir, se trata de

un antígeno presente en estas dos cepas. Como la única diferencia genética entre las líneas de la serie B10 se da a nivel del complejo H-2, se deduce que el antígeno detectado pertenece al haplotipo H-2<sup>b</sup> característico de B10 y de la cepa C57B1/6 de la que proceden RBL-5 y TLX9.

*Reconocimiento antigénico del heteroantisuero RAMA en Meth A, P815Y y LSTRA* (tabla IV). El heteroantisuero RAMA fue citotóxico con Meth A, P815Y y LSTRA. Esta citotoxicidad se mantuvo frente a Meth A, tras absorber con

Tabla III. Inhibición (%) de la captación de timidina C<sup>14</sup> por la leucemia RBL-5 y el linfoma TLX9 ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) tratados con el heteroantisuero RAR5 absorbido con células linfoides de distintas cepas murinas.

RAR-5 absorbido con células linfoides de:	RBL-5	TLX9
—	84,08 $\pm$ 3,26	97,64 $\pm$ 1,84
C57B1/6 (H-2 <sup>b</sup> )	82,18 $\pm$ 1,12	0,07 $\pm$ 8,95
B10 (H-2 <sup>b</sup> )	89,68 $\pm$ 6,32	-3,18 $\pm$ 5,86
B10 BR (H-2 <sup>k</sup> )	93,90 $\pm$ 1,42	94,78 $\pm$ 1,03
B10 D2 (H-2 <sup>d</sup> )	75,00 $\pm$ 5,36	40,11 $\pm$ 4,00

Tabla IV. Inhibición (%) de la captación de timidina C<sup>14</sup> por el sarcoma Meth A, mastocitoma P815Y y leucemia LSTRA ( $\bar{x} \pm S.D.$ ) tratados con el heteroantisuero RAR-5 absorbido con células (linfoides de distintas cepas murinas).

RAMA absorbido con células linfoides de:	Meth A	P815Y	LSTRA
—	96,80 $\pm$ 1,69	94,19 $\pm$ 0,25	99,11 $\pm$ 1,35
BALB/c (H-2 <sup>d</sup> )	82,13 $\pm$ 7,69	-26,03 $\pm$ 10,74	- 6,68 $\pm$ 7,94
B10 D2 (H-2 <sup>d</sup> )	83,48 $\pm$ 8,69	-46,98 $\pm$ 4,27	- 3,34 $\pm$ 6,65
C57B1/6 (H-2 <sup>b</sup> )	94,57 $\pm$ 2,33	-53,22 $\pm$ 22,18	-11,56 $\pm$ 8,84
B10 (H-2 <sup>b</sup> )	89,16 $\pm$ 7,06	-39,78 $\pm$ 9,62	-16,53 $\pm$ 6,25
B10 D2 (H-2 <sup>d</sup> )	86,92 $\pm$ 3,03	- 6,35 $\pm$ 6,75	-27,48 $\pm$ 5,57

BALB/c (H-2<sup>d</sup>), B10 D2 (H-2<sup>d</sup>), C57B1/6 (H-2<sup>b</sup>), B10 (H-2<sup>b</sup>) y B10 BR (H-2<sup>k</sup>), debido a la presencia en este sarcoma de un antígeno específico de tumor (TSA) no compartido por ninguna célula normal (1).

La actividad del RAMA frente a P815Y y LSTRA desapareció tras absorber con cualquiera de las cinco cepas distintas que empleamos, indicándonos la existencia de otro antígeno ampliamente compartido por las distintas células normales y tumorales con las que se experimentó; es decir, un antígeno especie-específico (1).

En contraste con los resultados obtenidos con el RAR-5, el RAMA no contenía ningún anticuerpo dirigido frente a moléculas codificadas por el complejo H-2, pues la citotoxicidad frente a LSTRA y P815Y desapareció tras absorber con células de C57B1/6, B10 y B10 BR, incapaces de absorber anticuerpos frente a antígenos codificados por el complejo H-2<sup>d</sup> de haber existido.

### Discusión

Se ha observado que el heteroantisuero RAR-5 contiene anticuerpos frente a antígenos codificados por el complejo H-2<sup>b</sup> (tabla III), el cual codifica especificidades H-2 y especificidades Ia que han sido definidas mediante aloantisueros. El pa-

ralelismo de comportamiento entre aloantisueros y heteroantisueros sugiere que también son detectadas estas estructuras antigénicas con heteroantisueros. No obstante, al ser el RBL-5 y el TLX9 tumores Ia negativos (3) cabría pensar que son sólo las especificidades H-2 las definidas con el RAR-5 en estas células.

El caso de RAMA ha sido distinto, no se han demostrado anticuerpos dirigidos frente a antígenos codificados por el complejo H-2<sup>d</sup> (tabla IV). Para explicar este comportamiento, podría pensarse que el heteroantisuero RAMA tiene un bajo título. Esta hipótesis se puede descartar, ya que el título está en una escala semejante al del RAR-5 (tabla II).

Los tumores LSTRA y P815Y expresan normalmente sus antígenos H-2<sup>d</sup> (6) y ciertos trabajos indican también la expresión normal de estos antígenos por el Meth A (5). Sin embargo, recientemente en nuestro laboratorio, se ha investigado la presencia de especificidades H-2<sup>d</sup> en el Meth A mediante aloantisueros y no se ha detectado ninguna (resultados no publicados). Parece que este sarcoma ha «modulado negativamente» sus antígenos de histocompatibilidad (9). Esta idea está corroborada por la propia historia del tumor en nuestro laboratorio. Cuando se recibió, ante la imposibilidad de disponer de ratones singénicos BALB/c, lo adaptamos a la cepa AKR (H-2<sup>k</sup>) para poder

mantenerlo. Esta cepa, al reaccionar inmunológicamente frente a los antígenos de histocompatibilidad del Meth A, probablemente determinó la modulación negativa de éstos. Este tumor, al no expresar antígenos H-2, ha inducido un heteroantisuero RAMA que no contiene anticuerpos frente a moléculas codificadas por este complejo.

Cabría pensar que los heteroantisueños contuvieron anticuerpos dirigidos frente a otros antígenos, aparte de los codificados por el complejo H-2, normalmente expresados por las distintas cepas murinas: antígenos no-H-2 y antígenos de diferenciación. De ser así, la citotoxicidad RAR-5-TLX9 se hubiera mantenido tras absorber con B10, ya que esta cepa expresa antígenos no-H-2 y antígenos de diferenciación, distintos de los característicos de la cepa C57B1/6 de la que procede el tumor TLX9. Sin embargo, tras esta absorción la citotoxicidad desapareció, indicando que estos antígenos no eran detectados en este sistema.

Resultados equivalentes se obtuvieron con el RAMA, la actividad frente a LSTRA también desapareció tras absorber con B10 D2, cepa que expresa antígenos no-H-2 y de diferenciación distintos de los expresados por la cepa BALB/c original del sarcoma Meth A.

### Resumen

Se han obtenido dos heteroantisueños de conejo, RAMA y RAR-5, el primero inducido

con el sarcoma de origen químico Meth A y procedente de la cepa BALB/c (H-2<sup>d</sup>) y el segundo inducido con la leucemia de origen vírico RBL-5 de la cepa C57B1/6 (H-2<sup>b</sup>). Se ha analizado con estos heteroantisueños la presencia de antígenos normales característicos de cepa en la superficie de diferentes células tumorales murinas con una técnica de citotoxicidad dependiente de complemento. Se han detectado con RAR-5 especificidades H-2<sup>b</sup> en tumores con este haplotipo; sin embargo, el RAMA no presentó actividad frente a estructuras H-2<sup>d</sup>. También se demostró que ambos heteroantisueños no contenían anticuerpos frente a antígenos no-H-2 y antígenos de diferenciación.

### Bibliografía

1. GARCÍA-OLIVARES, E. y GARRIDO, F.: *J. Immunogenetics*, 5, 313-322, 1978.
2. GARRIDO, F., FESTENSTEIN, H., y SCHIRRMACHER, V.: *Nature*, 261, 705-707, 1976.
3. GARRIDO, F., PÉREZ, M. y OSORIO, C.: *Rev. esp. Fisiol.*, 34, 137-144, 1978.
4. GARRIDO, F., PÉREZ, M. y TORRES, D.: *J. Immunogenetics* (en prensa), 1979.
5. GARRIDO, F., SCHIRRMACHER, V. y FESTENSTEIN, H.: *Nature*, 259, 228-230, 1976.
6. GARRIDO, F., SCHIRRMACHER, V. y FESTENSTEIN, H.: *J. Immunogenetics*, 4, 15-27, 1977.
7. MESCHINI, A., INVERNIZZI, G. y PARMIANI, G.: *Int. J. Cancer*, 20, 271-283, 1977.
8. MESCHINI, A. y PARMIANI, G.: *Immunogenetics*, 6, 117-123, 1978.
9. OLD, L. J., STOCKERT, E., BOYSE, E. A. y KIM, J. M.: *J. Exp. Med.*, 127, 523-539, 1968.
10. PREHN, R. T. y MAIN, J. M.: *J. Nat. Cancer Inst.*, 18, 769-778, 1957.
11. WEISS, R.: *Nature*, 260, 93, 1976.

