Biotecnología aplicada, Vol. 7, No. 1, 66-71 (1990)

Estudio de la modulación antigénica por los anticuerpos monoclonales (AcM) anti-células T

M. E. FAXAS y C. A. GARCÍA

Departamento de Biología Tumoral, Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, 29 y E, Vedado, La Habana 4, Cuba

Recibido en septiembre de 1989
Aprobado en octubre de 1989

RESUMEN

En el presente trabajo se analizó el efecto de los anticuerpos monoclonales (AcM) anti-células T sobre la expresión de los antígenos T en los linfocitos de la sangre periférica, utilizando los AcM IOR-T1 (CD6), IOR-T3 (CD3), IOR-T3A (CD3), IOR-T4 (CD4) e IOR-T8 (CD8). Se encontró que los AcM IOR-T3 e IOR-T3A inducen pérdida de los receptores de membrana y este efecto no está asociado a la expresión de los antígenos reconocidos por los AcM IOR-T1, IOR-T4 e IOR-T8, dado que estos antígenos están presentes en las células moduladas T3 y T3A negativas. Se sugiere la utilidad de los AcM IOR-T3 e IOR-T3A como inmunosupresores, así como la posibilidad de emplear el AcM IOR-T1 en pacientes con cáncer.

SUMMARY

We studied the extent of antigenic modulation induced by the monoclonal antibodies (MAbs) IOR-T1, IOR-T3, IOR-T3A, IOR-T4 and IOR-T8. The Mabs IOR-T3 and IOR-T3A were efficient at modulating antigens but the antigens reactive with IOR-T3, IOR-T3A are not linked to the expression of subset specific antigens IOR-T1, IOR-T4 and IOR-T8 since these receptors are still present on IOR-T3 and IOR-T3A negative modulated T-cells.

We discuss the usefulness of MAbs IOR-T3 and IOR-T3A as immunosuppressors and the possibility to use the Mab IOR-T1 in cancer patients.

INTRODUCCION

El desarrollo de los anticuerpos monoclonales (AcM) dirigidos contra antígenos de superficie de las células T ha permitido caracterizar a los linfocitos T y definir subpoblaciones celulares con funciones específicas (Reinherz *et al.*, 1981).

Los linfocitos T maduros expresan en su membrana la molécula CD3 que se encuentra asociada al receptor de células T (RCT). Dentro de los linfocitos T se han identificado dos subpoblaciones, considerando las funciones auxiliadoras y supresoras, expresando en su superficie las moléculas CD4 y CD8, respectivamente (Acuto *et al.*, 1985).

Por estudios experimentales se conoce que determinados AcM que reconocen el RCT pueden producir agrupamiento de estos receptores, con modulación y desaparición de ellos en la membrana. Este fenómeno es reversible y la expresión original se alcanza después de 24-48 horas, cuando el RCT es sintetizado nuevamente (Tsoukas *et al.*, 1984; R. Palacios, 1985; Estabrook *et al.*, 1985).

En la actualidad, el empleo de los AcM se ha extendido a su utilización terapéutica, resultando de interés el efecto beneficioso

Copyright © 1990, Sociedad Iberolatinoamericana para Investigaciones sobre Interferón y Biotecnología en Salud. Publicado por el Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba

de los AcM anti-células T, en pacientes con rechazo al trasplante renal y en el tratamiento de enfermedades linfoproliferativas (Miller *et al.*, 1981; Dillman *et al.*, 1984; Kreis *et al.*, 1985; Herrera *et al.*, 1987).

El propósito de este trabajo fue analizar el efecto de los AcM anti-células T sobre la expresión de los antígenos T de los linfocitos de sangre periférica, como una evaluación previa *in vitro* de los posibles cambios que se producirían al utilizarlos con fines terapéuticos.

MATERIALES Y METODOS

Anticuerpos monoclonales

Se utilizaron los AcM anti-células T IOR-T1, IOR-T3 e IOR-T3A y los AcM IOR-T4 e IOR-T8; estos últimos reconocen a las células T auxiliadoras y T supresoras respectivamente. Estos AcM fueron purificados a partir de líquido ascítico por la Unidad de Producción del Departamento de Biología del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR). Las características principales de los AcM utilizados se resumen en la tabla 1.

Obtención y cultivo de las células

Se obtuvo sangre venosa de siete donantes voluntarios sin enfermedad conocida y las células mononucleares periféricas (CMP) fueron aisladas por centrifugación en gradiente de densidad (García y Silva, 1979). Las células se ajustaron a 1 x 10^6 ml con medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal al 10% y antibióticos, y se incubaron con 200 μg/ml de cada AcM a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 en el aire. Como control, las células fueron incubadas solamente con el medio de cultivo. Se evaluó la presencia de antígeno después de 2, 8, 12, 24, 48 y 72 horas de incubación, utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Inmunofluorescencia indirecta

Las células fueron lavadas tres veces con tampón fosfato salino 0,15 M, pH 7,2 (TFS). Para conocer el grado de modulación antigénica, las células fueron incubadas nuevamente con los AcM IOR-T1, IOR-T3, IOR-T3A, IOR-T4 e IOR-T8, y con TFS como control durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación se repitieron tres lavados y se añadieron 50 μl de una dilución 1:30 de suero de carnero anti-inmunoglobulina de ratón conjugado, con isotiocianato de fluoresceína (Meloy Lab, USA) y se mantuvieron a 4°C durante 30 minutos.

Para evaluar la influencia de la modulación de los antígenos T3 y T3A sobre la expresión de otros antígenos, a las muestras de linfocitos que fueron previamente incubados con los AcM IOR-T3 e IOR-T3A se le añadieron los AcM IOR-T1, IOR-T4 e IOR-T8.

Finalmente, a todas las muestras se les realizaron tres lavados y se examinaron con objetivo de 100 X en microscopio de luz fluorescente (Leitz, RFA).

Evaluación de la re-expresión de los antígenos modulados T3 y T3A

Para evaluar si las células moduladas podían expresar nuevamente los antígenos, se incubaron las células con los AcM IOR-T3 e IOR-T3A, en concentraciones de 60 μg/ml durante 24 y 48 horas. Posteriormente las células fueron lavadas y resuspendidas en medio de cultivo. Después de 24 y 48 horas los antígenos T3 y T3A se determinaron por el método de inmunofluorescencia indirecta, previamente descrito.

Tabla 1
CARACTERISTICAS BIOLOGICAS PRINCIPALES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES (AcM) ANTI-CELULAS T

AcM	Cluster de diferenciación (CD)	Isotipo	Mitogenicidad
IOR-T1	CD6	IgG2a	±
IOR-T3	CD3	IgG	+
IOR-T3A	CD3	IgG2a	+
IOR-T4	CD4	IgG	NR
IOR-T8	CD8	IgG	NR

RESULTADOS

Modulación antigénica inducida por los AcM anti-T IOR-T1, IOR-T3 e IOR-T3A

El AcM IOR-T1 no induce modulación antigénica en las condiciones estudiadas. A las 48 horas hubo un ligero descenso en los valores medios de 68,1 ± 4,7 a 54,2 ± 5,6 pero esta diferencia no resultó significativa (figura 1).

A diferencia del AcM IOR-T1 con los AcM IOR-T3 e IOR-T3A, luego de 2 horas hubo una disminución en el número de células positivas. Con el AcM IOR-T3 hubo un descenso de 65,7 ± 1 a 45,7 ± 4 y con el AcM IOR-T3A los valores variaron de 65,1 ± 5,7 a 47,5 ± 6,5. En las horas siguientes este descenso se acentuó y a las 48 horas se aprecia que prácticamente hay una pérdida total de los antígenos T3 y T3A sobre la membrana celular, siendo los valores promedios de 8,4 ± 6,7 y 6,8 ± 4,3 respectivamente (figura 2).

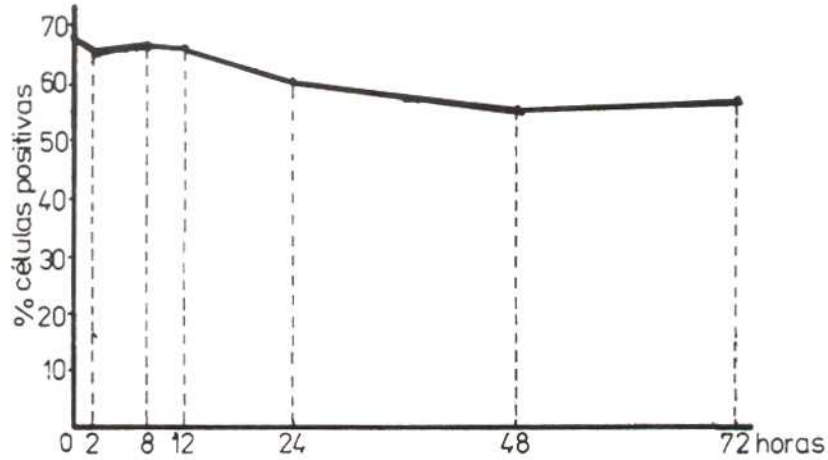

FIG. 1. Modulación antigénica inducida por el AcM IOR-T1.

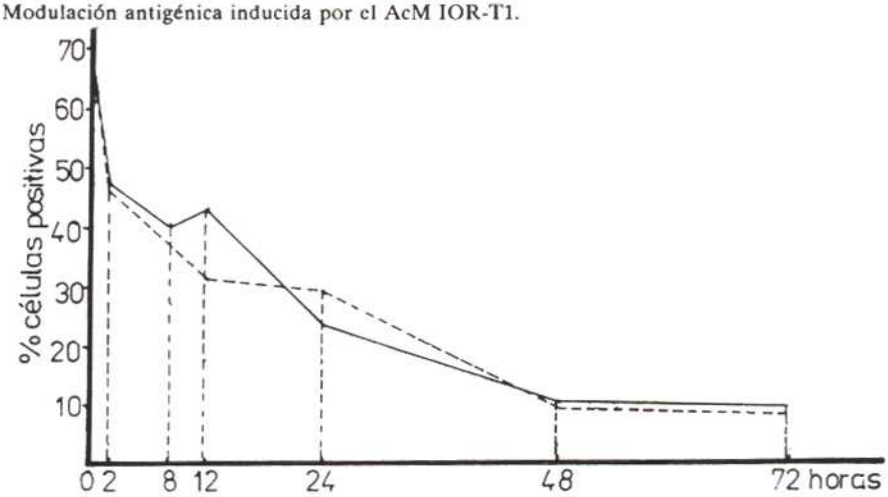

FIG. 2. Modulación antigénica inducida por los AcM IOR-T3 e IOR-T3A.
Leyenda: _____ AcM IOR-T3
---------- AcM IOR-T3A

Modulación antigénica inducida por los AcM IOR-T4 e IOR-T8

Con el AcM IOR-T4, el valor promedio inicial fue de 46,5 ± 7,3 observándose una disminución no significativa en la cifra media en las primeras 24 horas. Los valores mínimos fueron de 38,2 ± 6,3 y de 36,1 ± 7,6 a las 48 y 72 horas respectivamente.

Con el AcM IOR-T8, la media de 26,1 ± 7,3 descendió a 18,1 ± 5 a partir de las 8 horas, y a las 72 horas los valores de la media fueron de 16,3 ± 7,1 (figura 3).

Influencia de la modulación de los antígenos T3 y T3A sobre otros antígenos de células T

La modulación antigénica inducida por los AcM IOR-T3 e IOR-T3A sobre los antígenos T3 y T3A no origina variación sobre la expresión de los otros antígenos de la serie T (T1, T4 y T8). Cuando las células incubadas previamente con los AcM IOR-T3 e IOR-T3A fueron evaluados por IFI con los AcM IOR-T1, IOR-T4 e IOR-T8, los valores de células positivas fueron similares a los obtenidos con los linfocitos incubados directamente con estos AcM (tabla 2).

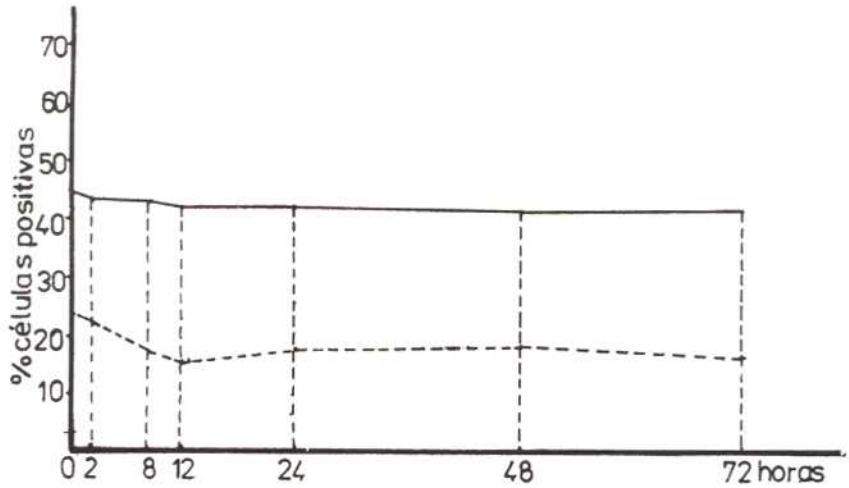

FIG. 3. Modulación antigénica inducida por los AcM IOR-T4 e IOR-T8.
Leyenda: _____ IOR-T4
---------- IOR-T8

Tabla 2
EFECTO DE LA MODULACION DE LOS ANTIGENOS T3 Y T3A SOBRE LA EXPRESION DE OTROS ANTIGENOS DE LAS CELULAS T, A LAS 48 HORAS DE CULTIVO

Incubación 48 horas	Marcaje de los AcM (IFI)				
	IOR-T3	IOR-T3A	IOR-T1	IOR-T4	IOR-T8
Medio	64,7 ± 7,3*	64,2 ± 6,6	67,3 ± 4,2	45,3 ± 5,3	26,0 ± 4,6
AcM IOR-T3	8,4 ± 6,7	29,2 ± 3,6	69,6 ± 9,3	49,6 ± 7,2	32,4 ± 9
AcM IOR-T3A	36,3 ± 5,6	6,8 ± 4,3	70,1 ± 8,6	48,7 ± 6,9	33,6 ± 8,1

* $\bar{x}$ ± DS del % de células positivas.

Re-expresión de los antígenos T3 y T3A

A las 24 horas las células comenzaban a expresar nuevamente los antígenos T3 y T3A y ya a las 48 horas los porcentajes de células $T3^+$ y $T3A^+$ fueron de 63,6 ± 6,8 y 62 ± 7,1 respectivamente, muy similares a los valores obtenidos sin inducir modulación antígénica.

DISCUSION

Los AcM que reconocen específicamente a determinantes antigénicos expresados en la superficie de los leucocitos humanos, pueden producir diversos efectos sobre estas células (Kung *et al.*, 1979).

La modulación antigénica fue observada por Ritz *et al.* (1980) con el AcM J-5 que reconoce un antígeno asociado a la leucemia linfocítica aguda (CALLA), reconocida como CD10 (4th International Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens, 1989).

En el presente estudio se encontró que los AcM IOR-T3 e IOR-T3A inducen la pérdida de los receptores antigénicos por ellos reconocidos, estando relacionado este efecto con el tiempo de incubación. Por otra parte, los AcM anti T IOR-T1, IOR-T4 e IOR-T8 no modifican la expresión de los antígenos T1, T4 y T8.

La modulación antigénica inducida por los AcM IOR-T3 e IOR-T3A no afectó la expresión de los antígenos T1, T4 y T8, por lo que no existe asociación molecular entre los antígenos reconocidos por los AcM IOR-T3 e IOR-T3A y los antígenos T1, T4 y T8 dado que estos receptores están presentes en las células moduladas T3 y T3A.

La densidad antigénica de los antígenos T3 disminuyó en las células moduladas por el AcM IOR-T3A, y este hecho también se observó con el antígeno T3A, cuando las células fueron incubadas previamente con el AcM IOR-T3A. Estos resultados sugieren la presencia de estructuras antigénicas similares que son identificadas, tanto por el AcM IOR-T3 como por el AcM IOR-T3A.

Los AcM han sido utilizados en el tratamiento de varios linfomas B y T (Miller *et al.*, 1981; García *et al.*, 1985); de leucemias (Dillman *et al.*, 1984); de tumores gastrointestinales (Sears *et al.*, 1984); de melanomas (Goodman *et al.*, 1985) y en el rechazo de los trasplantes (Kreis *et al.*, 1985; Herrera *et al.*, 1987).

Estos AcM empleados con fines terapéuticos presumiblemente actúan a través de las células efectoras humanas o por mecanismos humorales (Herlyn *et al.*, 1982; Hale *et al.*, 1985).

En nuestro trabajo encontramos que los AcM IOR-T3 e IOR-T3A inducen modulación selectiva de los receptores T3 y T3A, sin producir cambios en la densidad de otros antígenos anti T.

Simultáneamente, en el estudio de inhibición de la citotoxicidad con estos AcM, se encontró que estas inmunoglobulinas bloquean la lisis mediada por linfocitos T citotóxicos en la fase efectora (Faxas *et al.*, 1989) (en preparación). Estas propiedades sugieren que tanto el AcM IOR-T3A como el IOR-T3 pueden utilizarse, por su actividad inmunosupresora, en el tratamiento del rechazo a los trasplantes y en otras enfermedades como la anemia aplástica.

La pérdida de los antígenos específicos de membrana es, además, un mecanismo por el cual las células evitan su destrucción por vías inmunológicas. Dado que el AcM IOR-T1 no induce modulación antigénica y es una inmunoglobulina del tipo IgG2a, puede sugerirse su empleo en enfermedades neoplásicas donde

predominan alteraciones de los linfocitos T, como ocurre en las leucemias y linfomas a células T.

La alta especificidad de los AcM unida a la escasa toxicidad encontrada en humanos, posibilita que las perspectivas futuras de estas inmunoglobulinas sean ilimitadas.

REFERENCIAS

ACUTO, O.; M. FABBI; A. BENSUSSAN; C. MILANESE; T. J. CAMPEN; H. D. ROYER y E. L. REINHERZ (1985). *The human T-cell receptor*. J. Clin. Immunol. **5** (3): 141-157.

DILLMAN, R. O.; D. L. SHAWLER; J. B. DILLMAN e I. ROYSTON (1984). *Therapy of chronic lymphocytic leukemia and cutaneous T-cell lymphoma with T101 monoclonal antibody*. J. Clin. Oncol. **2**(8): 881-891.

ESTABROOK, A.; C. L. BERGER; R. MITTLER; P. LOGERFO; M. HARDY y R. L. EDELSON (1983). *Antigenic modulation of human T-lymphocytes by monoclonal antibodies*. Transpl. Proc. **XV** (1): 651-656.

FAXAS, M. E.; G. EXPOSITO; A. M. BARRAL y C. A. GARCIA (1989). *Inhibición de la lisis celular con anticuerpos monoclonales anti-células T*. (En preparación.)

GARCIA, C. A. y C. SILVA (1979). *Cultivo y estimulación de linfocitos humanos purificados con Verografín*. Rev. Cub. CNIC **10**: 119-203.

GARCIA, C. A.; J. F. AMADOR; M. E. FAXAS; J. GAVILONDO; A. M. VAZQUEZ y Z. MARINELLO (1985). *Regresión de lesiones dérmicas de un paciente con Micosis Fungoides tratado tópicamente con el anticuerpo monoclonal IOR-T1 (Pan T)*. III Jorn. Nac. y II Jorn. Latinoam. de Hematol. Inmunol. y Hemoterapia (Resumen), p. 19.

GOODMAN, G.; P. BEAUMIER; I. HELLSTROM; B. FERNYHOUGH y K. HELLSTROM (1985). *Pilot trial of murine monoclonal antibodies in patients with advanced melanomas*. J. Clin. Oncol. **31**: 340-352.

HALE, G.; M. CLARK y H. WALDMANN (1985). *Therapeutic potential of rat monoclonal antibodies: isotype specificity of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity with human lymphocytes*. J. Immunol **134**: 3056-3061.

HERLYN, D. y H. KAPROWSKI (1982). *IgG2a monoclonal antibodies inhibit human tumor growth through interaction with effector cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **47**: 61-65.

HERRERA, R.; A. LAGE; D. MORENO; G. GONZALEZ; O. SUAREZ; A. M. VAZQUEZ; A. COSTA; H. GOMEZ y M. E. FAXAS (1987). *Evaluación clínica de un anticuerpo monoclonal terapéutico en el rechazo del trasplante renal*. Primer Simposium Internacional de Trasplantes y Avances Tecnológicos (Resumen) p. 67.

KREIS, H.; N. CHKOFF; L. CHATENOUD; H. CAMPOS; J. F. BACH y G. GOLDSTEIN (1985). *Prolonged administration of a monoclonal anti-T3 cell antibody (Orthoclone OKT3) to kidney allograf recipients*. Transpl. Proc. **XVII** (6): 2734-2736.

KUNG, P. C.; G. GOLSTEIN; E. L. REINHERZ y S. F. SCHLOSSMAN (1979). *Monoclonal antibodies defining distintive human T cell surface antigens*. Science **206**: 347-349.

MILLER, R. A.; D. G. MELONEY; J. Mc KILLOP y R. LEVY (1981). In vivo *effects of murine hybridoma monoclonal antibody in a patient with T-cell leukemia*. Blood **58**: 78-86.

MILLER, R. A.; D. G. MALONEY; R. WARNKE y R. LEVY (1982). *Treatment of a B cell lymphoma with monoclonal anti-idiotype antibody*. N. Engl. J. Med. **306**: 517-522.

PALACIOS, R. (1985). *Mechanisms by which accessory cells contribute in growth of resting T lymphocytes initiated by OKT3 antibody*. Eur. J. Immunol. **15**: 645-651.

REINHERZ, E. L. y S. F. SCHLOSSMAN (1981). *The characterization and function of human immunoregulatory T lymphocyte subsets*. Immunology Today **2**: 69-71.

RITZ, J.; J. M. PESANDO y N. Mc CONATRY (1980). *Modulation of human acute lymphoblastic leukemia antigen induced by monoclonal antibodies* in vitro. J. Immunol. **126**: 1506-1514.

SEARS, H.; D. HERLYN; Z. STEPLEWSKI y H. KOPROWSKI (1984). *Effects of monoclonal antibody immunotherapy on patients with gastrointestinal adenocarcinoma*. J. Biol. Resp. Mod. **2**: 138-150.

SHAWLER, D. L.; M. C. MICELI; S. B. WORMSLEY; I. ROYSTON y R. O. DILLMAN (1984). *Induction of* in vitro *and* in vivo *antigenic modulation by the anti-human T-cell monoclonal antibody T101*. Cancer Res. **44**: 5921-5927.

TSOUKAS, C. D.; M. VALENTINE; M. LOTZ; J. H. VAUGHAN y D. A. CARSON (1984). *The role of the T3 molecular complex in antigen recognition and subsequent activation events*. Immunology Today, **5** (11): 311-313.

_____. 4th International Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. Vienna, February 1989.