

03062

19-3

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

"RESISTENCIA A LA LISIS INMUNE MEDIADA POR ANTICUERPOS
Y COMPLEMENTO EN ALGUNOS MIELOMAS MURINOS"

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA PRESENTA

BARBARA CELIS FLAM

1983

TESIS CON
VALA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INTRODUCCION

El concepto de que un organismo posee cierta inmunidad que le provee una defensa en contra de la aparición de células malignas fue propuesto inicialmente en 1909 por Paul Ehrlich (1) con su teoría de la vigilancia inmunológica. Esta teoría propone esencialmente que durante el curso de la vida de un individuo aparecen en numerosas ocasiones células tumorales, las cuales por lo general son detectadas y destruidas por el sistema inmunológico. Si la teoría de la vigilancia inmunológica resulta ser verdadera, surge la interrogante del porqué en un gran número de casos, los tumores sí llegan a desarrollarse, crecer y diseminarse hasta matar a sus huéspedes.

Los tumores malignos por lo general se caracterizan además de su crecimiento incontrolable acelerado y no regulado, y de su capacidad de diseminación (metástasis), por poseer en su superficie celular estructuras "alteradas" que el organismo reconoce como extrañas conocidas como antígenos tumorales. La naturaleza bioquímica de los antígenos tumorales es bastante diversa. Los tumores experimentales inducidos por virus tienden por lo general a expresar antígenos similares, los cuales son producto del genoma viral. Por otro lado, los tumores inducidos por sustancias químicas expresan antígenos tumorales muy diversos; algunos de ellos probablemente de origen fetal y otros productos de mutaciones inducidas por las sustancias químicas tumorigénicas (2,3,4).

En condiciones experimentales se ha podido demostrar que algunos productos de la respuesta inmune tales como son los anticuerpos y algunas células como los linfocitos T citotóxicos, las células asesinas naturales y los macrófagos, son capaces de rechazar y destruir tumores transplantables (5,6,7,8). Dentro de las reacciones inmunes mediadas -- por células con actividad antitumoral, la más importante parece ser la -- producida por los linfocitos T citotóxicos. Estas células, que se dife-- rencian en el timo, son también las encargadas de combatir algunas infec-- ciones virales y de rechazar transplantes alogénicos de tejidos. Aunque el mecanismo de lisis de los linfocitos T citotóxicos es todavía descono-- cido, se sabe que para que éstas células reconozcan y eliminen a sus cé-- lulas blanco, es necesario que éstas últimas expresen en su superficie -- algunos de los productos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) además de la estructura antigénica (antígeno viral, tumoral) que estuvieron presentes en la célula que inició la generación de las células citotóxi-- cas (9,10,11,12).

El gran interés que ha despertado el complejo genético de -- histocompatibilidad dentro del campo de la inmunología durante los últi-- mos años es en parte debido al creciente número de funciones ligadas a la respuesta inmune que le han sido atribuídas a éste (13-15). Este comple-- jo genético llamado H-2 en el ratón y HLA en el humano, es un conglomerado de genes que determinan fenómenos inmunes tales como la regulación de respuestas de anticuerpos, la expresión de moléculas de la superficie ce-- lular involucradas en las interacciones celulares complejas, la expre--- sión de moléculas inmunoregulatoras y otras (16).

Comprendidas dentro de las moléculas de la superficie celular codificadas por el CMH H-2 se encuentran los antígenos mayores de histocompatibilidad H-2D y H-2K, presentes en la mayoría de las células del ratón (16). Estas moléculas cuya estructura bioquímica ha sido estudiada con gran profundidad, se encuentran codificadas por genes extremadamente polimórficos; es decir, que existe un gran número de distintas formas alélicas dentro de una misma especie. Los aloantígenos H-2D y H-2K son glicoproteínas de 45 000 daltones que por lo general se encuentran asociadas en forma no-covalente a una proteína llamada beta-2microglobulina (17,18).

Por otro lado son estos los aloantígenos H-2K y H-2D los que necesitan ser reconocidos por los linfocitos T citotóxicos para que estos lleven a cabo su función citolítica.

La lisis mediada por anticuerpos y complemento constituye otro de los mecanismos efectores del sistema inmune por medio del cual un organismo suele defenderse en contra de una agresión externa (infecciones) o interna (aparición de células aberrantes o tumorales). El descubrimiento del complemento surgió de las observaciones de Buchner, Von Fodor y Nuttal (19) de que el suero de cobayo tenía actividad bactericida. Posteriormente Bordet (19) demostró que la actividad bactericida del suero requería de la cooperación de una substancia termoestable llamada anticuerpo y de otra termolábil nombrada complemento. Desde entonces, se ha demostrado que el complemento es capaz de interaccionar y lisar protozoarios (20), virus (21), eritrocitos (22,23) y células nucleadas (24). Además, la actividad del complemento ha sido detectada en mu-

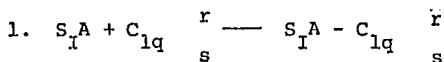
chos sueros de distintas especies mamíferas así como en suero de algunas especies de invertebrados (25).

La activación por la vía clásica del complemento se inicia - por los complejos antígeno-anticuerpo que se forman en la membrana de la célula blanco. Las once proteínas presentes en el suero que constituyen al complemento han sido agrupadas en tres unidades: la unidad de reconocimiento formada por Cl_q, Cl_r y Cl_s. La unidad de activación formada por C2, C3 y C4 y la unidad de ataque de membrana formada por C5, C6, C7 C8 y C9 (26).

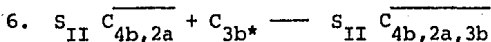
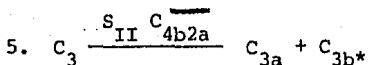
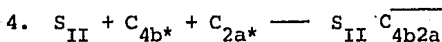
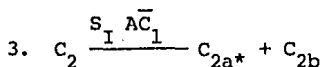
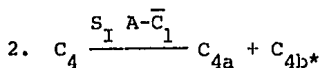
Cl, es un complejo Ca⁺⁺ dependiente formado por tres proteínas: Cl_q, Cl_r y Cl_s que se combina reversiblemente con los complejos -- antígeno anticuerpo por medio de la fijación de la subunidad Cl_q a la - fracción Fc de los anticuerpos. Esta fijación de Cl_q inicia una serie - de reacciones proteolíticas que culminan con la formación de dos enzimas la C3 convertasa (C42) y la C5 convertasa (C423). Esta última, a la vez, determina que los demás componentes del complemento formen el complejo - lítico C5b-C9, el cual se incrusta en la membrana plasmática de la célula blanco provocando la pérdida de su integridad física y funcional, causando la muerte celular (27,28). La cascada de eventos del complemento se llevan al parecer en tres sitios distintos en la membrana celular tal -- como se explica en la Figura 1 (26).

FIGURA 1. La reacción citolítica del complemento: unidades funcionales y sitios en la membrana^(a)

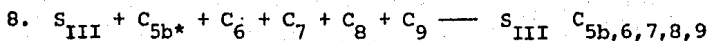
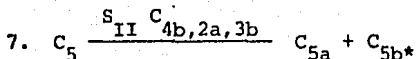
Primer sitio: Activación de la Unidad de Reconocimiento



Segundo sitio: Formación de la Unidad de Activación



Tercer sitio: Formación de la Unidad de Ataque a la membrana



(a) S_I , S_{II} , S_{III} son sitios topográficamente distintos sobre la superficie de la membrana celular. A: Anticuerpo adherido a la superficie celular; la barra denota enzima activa: el asterisco denota actividad enzimáticamente, sitio lábil de unión

El ataque celular mediado por anticuerpos y complemento es una complicada serie de reacciones e interacciones entre la superficie celular, las moléculas de anticuerpo y los componentes del complemento. El mecanismo básico del ataque requiere de: (1) la fijación del anticuerpo a los antígenos de la superficie celular, (2) la activación y fijación de el complemento a la superficie celular y (3) la permanencia sobre la superficie celular de los componentes del complemento, por un periodo de tiempo suficientemente largo para causar un desarreglo físico e integral de la membrana.

Es claro que la fijación y activación del complemento en la superficie celular no necesariamente resulta en la muerte de la célula tumoral. Por lo tanto, tal parece que las propiedades metabólicas de la célula blanco pueden influencia en el resultado final de este ataque. Muchos estudios hoy en día estan dirigidos para determinar los eventos celulares que gobiernan las propiedades de la superficie celular que logran modificar la susceptibilidad de la célula a la lisis por complemento.

El fracaso de la vigilancia inmunológica en la destrucción de las células tumorales podría ser explicado por una o varias de las siguientes posibilidades:

1. Los estados de inmunosupresión en que el huésped puede llegar a encontrarse, facilitándose así el desarrollo del tumor (29). - Dichos estados de inmunosupresión pueden ser inducidos por el mismo tumor (30). Aunque el índice de tumores espontáneos en individuos inmunosuprimidos no parece ser significativamente mayor al de los individuos con funciones inmunológicas normales, sí existe claramente una gran diferencia en cuanto al desarrollo de tumores inducidos por agentes virales o químicos (31).
2. Los antígenos tumorales pueden no ser lo suficientemente "fuertes" para inducir una respuesta inmune rápida y eficaz que proteja al huésped y destruya el tumor a tiempo (32,33).
3. El tumor puede crecer con tal rapidez que no da tiempo al organismo para elaborar una respuesta inmune adecuada protectora y eficaz.
4. En sus inicios, las células tumorales pueden no expresar antígenos tumorales en su superficie y no es hasta que el tumor se desarrolla que éste expresa nuevas entidades antigénicas (34).
5. La modulación antigénica, la cual vincula diferentes grados de pérdida de antígenos de la superficie celular por medio de internalización o desprendimiento, dependiendo del tipo de célula y del sistema antigénico (35).

6. Los antígenos de las células tumorales no son accesibles a los linfocitos T citotóxicos por encontrarse bloqueados por anticuerpos no citotóxicos llamados facilitadores (36) o por proteínas sintetizadas por el mismo tumor (37-48).
7. Las células tumorales son capaces de expresar un tipo alélico distinto a sus antígenos H-2 o HLA (49) o dejar de expresar -- estos antígenos (50) o expresarlos en cantidades mínimas (51).
8. Las células tumorales expresan cantidades normales de antígenos en su superficie pero se vuelven resistentes a la lisis por medio de la producción de material con actividad anti-complementaria (52,53).
9. Las células tumorales se pueden mostrar resistentes a la lisis del complemento dado a una rápida reparación de los sitios de la membrana celular dañados (54-56).

ANTECEDENTES

Se ha reportado anteriormente que algunos mielomas de ratón evaden la lisis por linfocitos T citotóxicos debido a un enmascaramiento de sus antígenos H-2 que se efectúa por medio de una glicoproteína que la misma célula tumoral produce y acumula en su superficie (37,39,40). Esta glicoproteína está constituida por una sola cadena polipeptídica, rica en ácido siálico y tiene un peso molecular aproximado de 160 000 daltones. La expresión de esta molécula llamada gp160 en la superficie celular y la resistencia a la lisis observada siguen un comportamiento cíclico en los mielomas que la expresan (LPC-1, MOPC-315 OPEC). Cuando estas células se transplantan a huéspedes singénicos BALB/c (H-2^d) y son obtenidas 3-4 días después de su inoculación (células tempranas), son susceptibles a la lisis por linfocitos T citotóxicos y expresan cantidades mínimas de esta glicoproteína. Por otro lado, las células obtenidas de 12-14 días después del trasplante (células tardías) son resistentes a dicha lisis y expresan en su superficie grandes cantidades de gp160 (39). La correlación entre la expresión de gp160 y la resistencia a linfocitos T citotóxicos va más allá: si las células tumorales LPC-1 tardías son tratadas con tripsina, colocadas en medio de cultivo o transplantadas a un huésped nuevo, la cantidad de gp160 disminuye significativamente y las células se muestran de nuevo susceptibles a la lisis por Linfocitos T citotóxicos (37,39,40).

Recientemente se ha observado que aunque las células LPC-1 tardías son resistentes a la lisis celular (linfocitos T) éstas pueden --

ser rechazadas al ser introducidas a otras cepas alogénica de ratón (57). Esta observación sugiere que otros mecanismos inmunes están involucrados en el rechazo inmunológico de este tumor. Al mismo tiempo se ha observado que la resistencia, de estas células a la lisis por linfocitos T citotóxicos va acompañada paralelamente con una disminución de 6-10 veces la capacidad de éstas células de reaccionar con anticuerpos anti-H-2^d en comparación con las células LPC-1 tempranas o células LPC-1 tardías tratadas con proteasas. Por medio de estudios de adsorción cuantitativa de anticuerpos anti-H-2^d, se ha observado que gp160 interacciona preferentemente con los aloantígenos H-2K y H-2D (40), enmascarándolos y no permitiendo que las células tardías reaccionen con los anticuerpos. Otros antígenos de la superficie celular no relacionados con el CMH, no se encuentran -- enmascarados ya que las células tempranas y las tardías reaccionan de un modo similar con anticuerpos dirigidos en contra de Ags no relacionados con el H-2.

En vista de que estos resultados correlacionan la expresión de gp160 con la resistencia a la lisis inmune, en este estudio se discute el papel de esta glicoproteína en la inhibición de la acción del complemento y se proponen algunas posibles explicaciones de este fenómeno.

MATERIAL Y METODOS

Animales

Los ratones BALB/c (H-2^d) fueron obtenidos a través del Instituto Mexicano del Seguro Social. Los ratones DBA/2 (H-2^d) y NZB (H-2^d) fueron originalmente obtenidos de los Laboratorios Jackson, Bar Harbor, Maine, y los ratones BALB.B del Instituto Tecnológico de Massachusetts y reproducidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Animales del mismo sexo y edad (6-10 semanas) fueron utilizados en cada experimento.

Tumores

Los tumores de células plasmáticas (mielomas): LPC-1 MOPC-315 OPEC, MOPC-167 (gp160 -), MOPC-167 (gp160 +) MOPC-460 y PC.3 y el mastocitoma P815 fueron obtenidos del laboratorio del Dr. H. Eisen (Instituto Tecnológico de Massachusetts) y se mantuvieron en forma de ascitis en sus huéspedes transfiriendo 1×10^7 células intraperitonealmente por cada animal semanalmente.

Las células LPC-1 tempranas y tardías fueron obtenidas después de 3-4 días y 12-14 días después de su trasplante respectivamente. Todos los mielomas crecidos in vivo fueron obtenidos por medio de lavados de la cavidad peritoneal del animal con 5-10 ml de solución amortiguadora de fosfatos/salina (PBS, 0.15 M NaCl, 0.01 M fosfatos pH 7.4). Cuando se presentaron eritrocitos junto con estas células, se eliminaron

por medio de varias centrifugaciones a 50xg durante 7 minutos.

Las células LPC-1C, sublínea de LPC-1, fueron adaptadas al crecimiento in vitro, y las células SP-2 y P815 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 con 10% suero fetal bovino y antibióticos (Gibco) a 37°C en una atmósfera húmeda al 7% CO₂ y 93% aire.

Antisueros

Los siguientes antisueros dirigidos en contra de antígenos no relacionados con H-2 fueron utilizados en este estudio:

DBA/2(H-2^d) anti-LPC-1. Este antisuero (anti-PC.1) fué producido al inmunizar repetidamente por vía intraperitoneal a ratones DBA/2 con 10⁷ -- células LPC-1. El tumor crece inicialmente, pero es rechazado para el día 21. Los animales fueron reforzados con 10⁷ células LPC-1 en el día 28 y después cada 15 días. Los ratones fueron sangrados 7 días después de cada refuerzo. Se ha reportado (40) que este antisuero inmunoprecipita un solo componente de la superficie celular de las células LPC-1, -- el cual corresponde al aloantígeno PC.1 descrito por Takagashi et al. (58) y Tung et al. (59).

Antisuero C57BL/10.D2 (H-2^d) anti-LPC-1. Este antisuero (anti-p30-40) fué obtenido del inmunizar animales C57BL/10.D2 con 10⁷ células LPC-1 y fué adsorbido ocho veces con volúmenes iguales de células MOPC-167 -- (gp160) para eliminar los anticuerpos dirigidos en contra de PC.1. -- Este antisuero reacciona únicamente con proteínas superficiales de 30 y 40 Kdaltones presentes en la superficie de las células LPC-1 (40).

Antisuero de cabra anti-virus Moloney. Este antisuero (anti-gp70-100) -
fué obtenido a través del Dr. David Baltimore (Instituto Tecnológico de
Massachussetts). Se ha demostrado anteriormente (40) que este antisuero
reacciona con dos glicoproteínas de 70 y 100 Kdaltones en la superficie
de algunos mielomas de BALB/c.

Antisuero de conejo anti-timocitos de ratón. Este antisuero (anti-B220),
fué adquirido comercialmente de los Laboratorios Cappel (Corchanville,
Pennsylvania) y se ha reportado que reacciona con una molécula de -
200,000 daltones presente en la superficie celular de timocitos (T-200),
y con un antígeno de 220,000 daltones de las células B (60).

Antisuero anti-H-2^d. Este antisuero esta dirigido en contra de los pro-
ductos del CMH H-2 y fué obtenido de la inmunización de animales BALB.K
(H-2^k) con 10⁷ células de bazo de animales BALB/c (H-2^d).

Antisuero BALB.B anti LPC-1. Este antisuero (anti-gp160) fué obtenido
del inmunizar ratones BALB.B (H-2^b) con 10⁷ células LPC-1 siguiendo el
mismo esquema de inmunización utilizado para anti-PC.1, contiene anti--
cuerpos anti-H-2^d y anti-gp160.

Antisuero de conejo anti-IgG de ratón. Este antisuero se produjo por --
múltiples inmunizaciones a conejos con inmunoglobulinas de ratones BALB/c
purificadas por cromatografía de afinidad con Sefarosa-Proteína A. Los
anticuerpos se purificaron por cromatografía de afinidad con Sefarosa-
IgG de ratón.

Complemento

Suero normal de conejo (Low Tox, Cedarline Lab. Canada), de cobayo (Gibco) y de sujetos humanos normales fueron utilizados como fuente de complemento para los ensayos de citotoxicidad.

Iodinación (^{125}I) de Inmunoglobulinas

Los anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón fueron iodinados por el método de Greenwood y col. Brevemente, se mezclaron 0.2 ml de anti-IgG (2 mg/ml) con 0.2 ml de PBS y 2 mCi de ^{125}I Na (New England Nuclear) neutralizado en 10-20 μl de PBS pH 7.4 y 0.1 ml de cloramina T (2 mg/ml). Esta mezcla se incubó a 4°C durante 20 minutos y se agregaron 0.4 ml de metabisulfito de sodio (2.5 mg/ml) en PBS y 0.1 ml de yoduro de potasio 0.1 M. El yodo libre se separó por medio de cromatografía en Sephadex G-25 (equilibrada con PBS, 1 % albúmina sérica bovina). Se colectaron fracciones de aproximadamente 0.5 ml y se determinó la radioactividad de cada una y se colectaron las fracciones que corresponden a los anticuerpos marcados (Figura 2).

Conjugación de Inmunoglobulinas y lectinas con isotiocianato de fluoresceína

Para conjugar los anticuerpos y lectinas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) se siguió el método descrito por Cebra y Goldstein (61) con algunas modificaciones. La concentración de proteína con la que obtuvimos mejores resultados fue de 4-5 mg/ml. Con esta concentración de proteína, se utilizaron 12.5 μg de FITC (Sigma) por ml de solución de pro

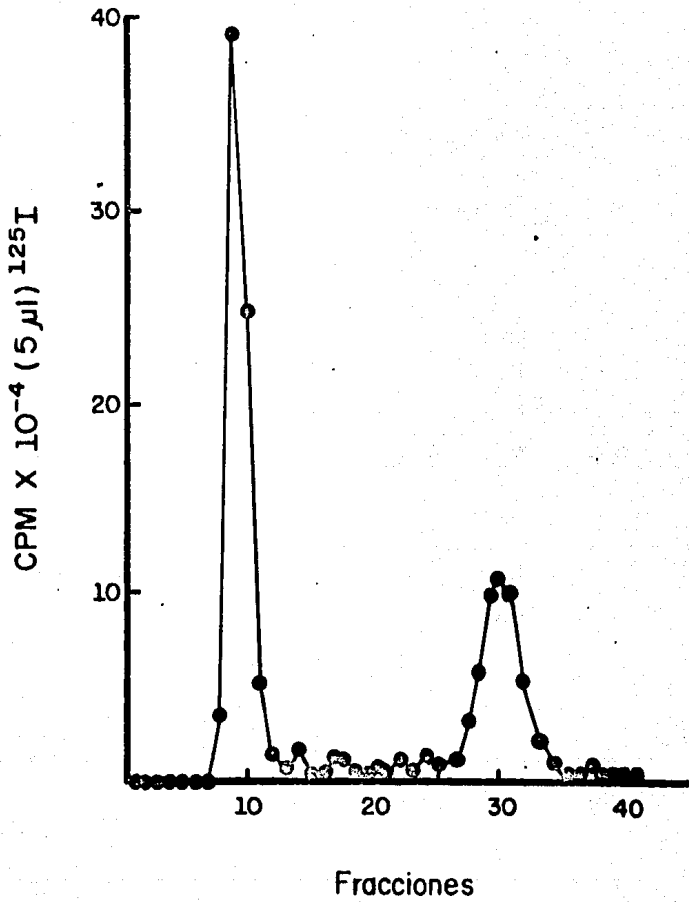


Figura 2. Perfil de elución de las inmunoglobulinas de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón en una columna de Sephadex G-25. Se muestra una separación adecuada de los anticuerpos y el ¹²⁵I libre.

teína. La reacción se llevó a cabo en una solución de 0.1 M de Na_2CO_3 pH 9.0 a 4°C durante 18 horas con agitación lenta. Al finalizar este periodo, la solución se centrifugó para eliminar cualquier precipitado formado. Para la separación del conjugado de la fluoresceína libre, se llevó a cabo una cromatografía en una columna de Sefadex G-50 equilibrada con PBS.

Radioiodinación (^{125}I) de los componentes superficiales de células tumorales

Para la caracterización de las moléculas de la superficie celular de los mielomas, se siguió la técnica de iodinación descrita por Marchalonis (62). En esta reacción los iones iodo son oxidados en presencia de lactoperoxidasa y peróxido de hidrógeno para dar lugar a un complejo enzimático con la capacidad de convertir las tirosinas de las proteínas superficiales a derivados monoiodinados. La histidina también puede iodinarse aunque en menor grado (63).

Brevemente, 10^7 células tumorales (95-100% de viabilidad) previamente lavadas con PBS, son colocadas en presencia de $10 \mu\text{l}$ de lactoperoxidasa (4 mg/ml) y $100 \mu\text{Ci}$ de NaI (^{125}I , New England Nuclear) neutralizado en $300 \mu\text{l}$ de PBS. Después de agregar $10 \mu\text{l}$ de una solución fresca de H_2O_2 al 0.03% preparada en PBS, la mezcla se incuba 10 minutos a 30°C. Al finalizar este periodo, las células se lavan 5 veces con 10 ml de PBS KI 5 mM.

Para solubilizar los componentes superficiales radioiodina-- dos, las células marcadas (10^7) se resuspenden en 100 ul de NP-40 -- (Nonidet P-40, Particle Labs) al 0.5% en PBS y se incuban a 4°C durante 30 minutos. Los restos celulares no solubles se eliminan por medio de una centrifugación a 800 xg durante 10 minutos. Estos extractos celulares se almacenaron a -70°C hasta ser utilizados.

Inmunoprecipitación de los antígenos de la superficie celular

Las células tumorales fueron iodinadas y solubilizadas en -- NP-40 como se describió anteriormente. A 100 ul del extracto celular se le añadieron 20 ul de antisuero específico y se incubó la mezcla durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se agregaron 100 ul de una suspensión al 10% de Staphylococcus aureus Cowan fijado en formaldehído e inactivado por calor (en PBS NP-40 a 0.5%). Transcurrido este periodo, los inmu-- noprecipitados se centrifugaron a 1300 xg durante 15 minutos y fueron la-- vados tres veces con NP-40 al 0.5% en PBS por medio de centrifugaciones. Los compuestos radioiodinados unidos a la bacteria, fueron eluidos con -- 50 ul de 0.1 M Tris, 5% SDS, 4% beta-mercaptoetanol, pH 6.4 en un baño -- de agua en ebullición durante dos minutos. Las muestras se centrifuga-- ron a 800 xg durante 10 minutos y los sobrenadantes se analizaron por me-- dio de electroforesis en geles de poliacrilamida en SDS. Las proteínas inmunoprecipitadas se identificaron mediante una autoradiografía de los geles secos en placa de rayos X o por medio de la cuantificación de la -- radioactividad de rebanadas de 2 mm de grosor en un contador gamma.

Electroforesis

Las proteínas de la superficie celular se analizaron mediante electroforesis de geles de poliacrilamida SDS según el método de Laemmli (64). Este método consiste en un gel discontinuo de concentraciones de acrilamida y de pH. La acrilamida de la parte superior es de 5% con un pH de 6.8, mientras que el gel inferior es al 7.5% de acrilamida con un pH de 8.8. Esta discontinuidad ayuda a concentrar la muestra en la parte superior y así obtener una mayor resolución de la separación en el gel inferior. Como solución de corrida se utilizó Tris-Glicina (pH 8.8). Inicialmente, las muestras son mezcladas vol/vol con 0.08 M Tris, 5% SDS, 5% betamercaptoetanol, 0.002% azul de bromofenol) y calentadas en un baño de agua en ebullición durante 3 minutos. Después de aplicar las muestras, se aplica una corriente de 10 mA por gel en placa o 3 mA por gel en tubo hasta que el colorante (azul de bromofenol) rebasa al gel concentrador y se continúa a 20 mA por gel de placa ó 5 mA en tubo, hasta que el colorante llegue al límite inferior. Posteriormente, los geles se fijaron en una solución de ácido tricloracético (TCA) al 12.5% y se procesaron de alguna de las siguientes formas:

- 1) Tinción de Schiff. Esta tinción es específica para glicoproteínas con ácido siálico. Después de fijar los geles en TCA al 12.5% durante 30 minutos, los geles se sumergen en una solución de ácido periódico al 0.7% durante dos horas seguido por un tratamiento con metabisulfito de sodio al 0.2% durante 3 horas con cambios cada 30 minutos. Posteriormente, los geles se tiñen con reactivo de Schiff y el color de las bandas donde se encuentran

las glicoproteínas se desarrolla en un período de 3-4 horas --
(65).

- 2) Los geles en placa de muestras radioiodinadas se procesaron para autoradiografía en placa de rayos X.
- 3) Los geles de poliacrilamida en tubo de muestras radioactivas -- fueron congeladas sobre hielo seco, rebanados en secciones de - 2 mm de grosor y se determinó la radioactividad de cada sección en un contador gamma para su cuantificación.

Ensayos de citotoxicidad con anticuerpos y complemento

Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo en una etapa de la siguiente forma: 5×10^4 células blanco marcadas con ^{51}Cr (67) se diluyeron en presencia de complemento (1:10) en RPMI 1640 y se colocaron en tubos de plástico (12x75 mm, Falcon) con diferentes concentraciones del antisuero en un volumen final de 0.1 ml. Después de 1 hora de incubación a 37°C , se añadieron 0.9 ml de PBS frío a cada tubo para parar la reacción lítica. Después de centrifugar los tubos (100 xg, 7 minutos), se determinó la radioactividad en la mitad del sobrenadante y en el paquete celular mas la otra mitad del sobrenadante en un contador gamma -- (Autologic, Abbott). La lisis específica o liberación específica de -- ^{51}Cr se calculó:

$$\% \text{ Lisis específica} = (L_{\text{ex}} - L_{\text{es}} / 100 - L_{\text{es}}) \times 100$$

Donde:

L_{ex} = liberación experimental de las células blanco en presencia de anticuerpo y complemento.

L_{es} = liberación espontánea de las células blanco en presencia únicamente de complemento.

Pruebas de adsorción cuantitativa de anticuerpos

Diferentes cantidades de células tumorales se incubaron con 75 μ l de una dilución del antisuero, a 4°C durante 30 minutos. Dos muestras de 25 μ l cada una del antisuero no adsorbido se obtuvieron después de centrifugar a 800 xg durante 10 segundos y se determinó la actividad citotóxica remanente en células blanco apropiadas marcadas con ^{51}Cr como ha sido descrito anteriormente.

Tratamiento de células tumorales con proteasas

1×10^7 células tumorales fueron lavadas tres veces con PBS y se resuspendieron en 10 ml de PBS con 0.25 mg/ml de tripsina o subtilisina (Sigma). Las células se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron 5 veces con PBS (100 x g 7 minutos). Estas células se marcaron con ^{51}Cr cuando se utilizaron como células blanco -- en los ensayos de citotoxicidad.

Microscopía de Fluorescencia

La detección de C_{1q} y C_3 y de los receptores de la aglutinina de germen de trigo en la superficie de células LPC-1 se llevó a cabo en una

suspensión de células vivas (10^7 /ml) en medio RPMI 1640, 1% BSA (68). --
Para ello, se colocaron 50-100 μ l de la suspensión de células con 50 μ l
del antisuero (anticuerpo de cabra anti-Clq y anti-C3 humano, Boehringer,
Mexico) o de la lectina conjugados a fluoresceína a 4°C durante 20 minu-
tos. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces por medio de centri-
fugación (100 xg, 10 minutos) con el mismo medio y se resuspenden en --
500 μ l para de ahí tomar alícuotas y llevar a cabo observaciones en el -
microscopio de epifluorescencia.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Expresión de gpl60 en otros mielomas de ratón

Tres diferentes mielomas: MOPC-460, MOPC-167 y PC.3 fueron ensayados para determinar su susceptibilidad a la lisis por anticuerpos anti-H-2^d en presencia de complemento de conejo, por medio de ensayos de citotoxicidad. Como se muestra en la figura 3 éstas células se mostraron significativamente más resistentes a la lisis por anticuerpo -- anti-H-2^d y complemento al ser comparadas con las mismas células tratadas previamente con tripsina.

Para determinar si la resistencia a la lisis por complemento y anti-H-2^d observada en estas células podía deberse a un enmascaramiento de los aloantígenos H-2 por la glicoproteína gpl60, como sucede con el tumor LPC-1 (40), se analizaron los componentes radioiodinados de la superficie celular por medio de electroforesis en poliacrilamida y SDS. Es evidente que las células de mieloma MOPC-460, MOPC-167 -- (gpl60 +) y PC.3 expresan una molécula de peso molecular aproximado de 160,000 daltones que migra idénticamente a la gpl60 presente en las células LPC-1 (Figura 4 A). Esta glicoproteína es eliminada, casi en su totalidad, de la superficie celular por medio de un tratamiento de las células con tripsina (Figura 4 B).

2. Inmunoprecipitaciones de gpl60 de los diferentes mielomas con anti-gpl60 (BALB.B anti LPC-1)

Para determinar si la glicoproteína de 160,000 daltones presente en los tumores MOPC-160 y PC.3 era antigénicamente idéntica a la

gp160 anteriormente descrita en el tumor LPC-1, se llevaron a cabo inmuno-- precipitaciones con un antisuero BALB.B anti LPC-1 (anti-gp160) de los componentes radioiodinados de la superficie celular de éstos mielomas.

En la Figura 5 se puede apreciar que este antisuero inmuno-- precipita de igual forma a gp160 (junto con los antígenos H-2D y H-2K) - de LPC-1 que de MOPC-460.

En la Figura 6 se hace una comparación de la habilidad de -- distintos anticueros para precipitar a gp160 de la superficie de células LPC-1 y PC.3. Se puede observar que en todos los casos, los anticuerpos inmunoprecipitan a gp160 (junto con otros antígenos: p30 y p40) de todas las líneas celulares.

Estos datos indican que la gp160 de los distintos mielomas - es antigénicamente idéntica.

3. Accesibilidad de los antígenos no relacionados con H-2 a sus anticuerpos en células LPC-1

Para determinar si los antígenos de la superficie celular de LPC-1 no relacionados con H-2 (PC.1, gp-70, B220 y p30-40) se encuentran igualmente accesibles a sus respectivos anticuerpos en las células LPC-1 tardías y LPC-1 tempranas, se llevaron a cabo las adsorciones cuantitativas de anticuerpos mostradas en la Figura 7. Estos resultados indican -- que las células intactas LPC-1 tardías y LPC-1 tempranas no difieren significativamente en su capacidad de adsorber la actividad citotóxica de -- los diferentes antisueros probados. Asimismo, así se muestra la expre--

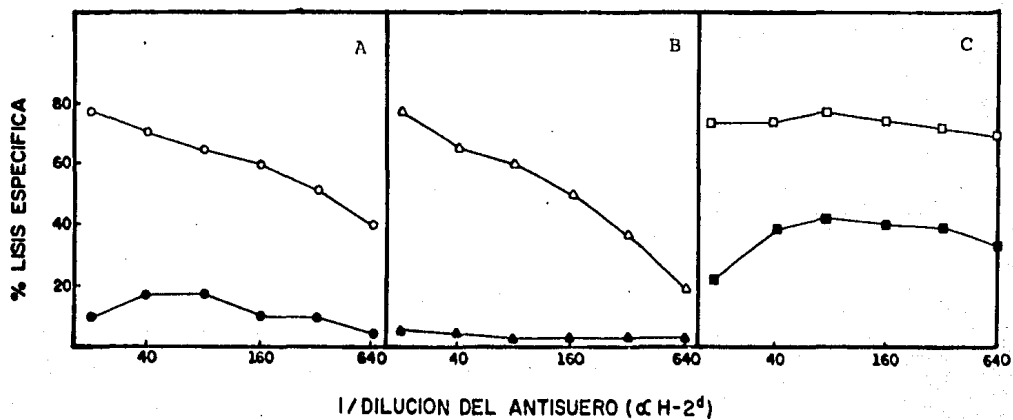


Figura 3. Efecto del tratamiento con tripsina en la lisis mediada por anticuerpos anti-H-2^d y complemento. La susceptibilidad a la lisis fué determinada en las siguientes células: MOPC-460(A), PC.3(B) y MOPC-167(gp160+) (C). Células normales (●) Células tratadas con tripsina (○).

Figura 4. Autorradiografía de geles de electroforesis en poli-
acrilamida SDS de extractos de células radioiodi-
nadas. Las células tumorales fueron iodinadas y so
lubilizadas en NP-4 y sometidas a electroforesis en
geles de placa.

- A) 1. Células LPC-1 tardías
- 2. Células MOPC-167 (gp160)
- 3. Células PC.3
- 4. Células MOPC-460

- B) 1. Células LPC-1 tardías
- 2. Células LPC-1 tardías tripsinizadas
- 3. Células PC.3
- 4. Células PC.3 tripsinizadas

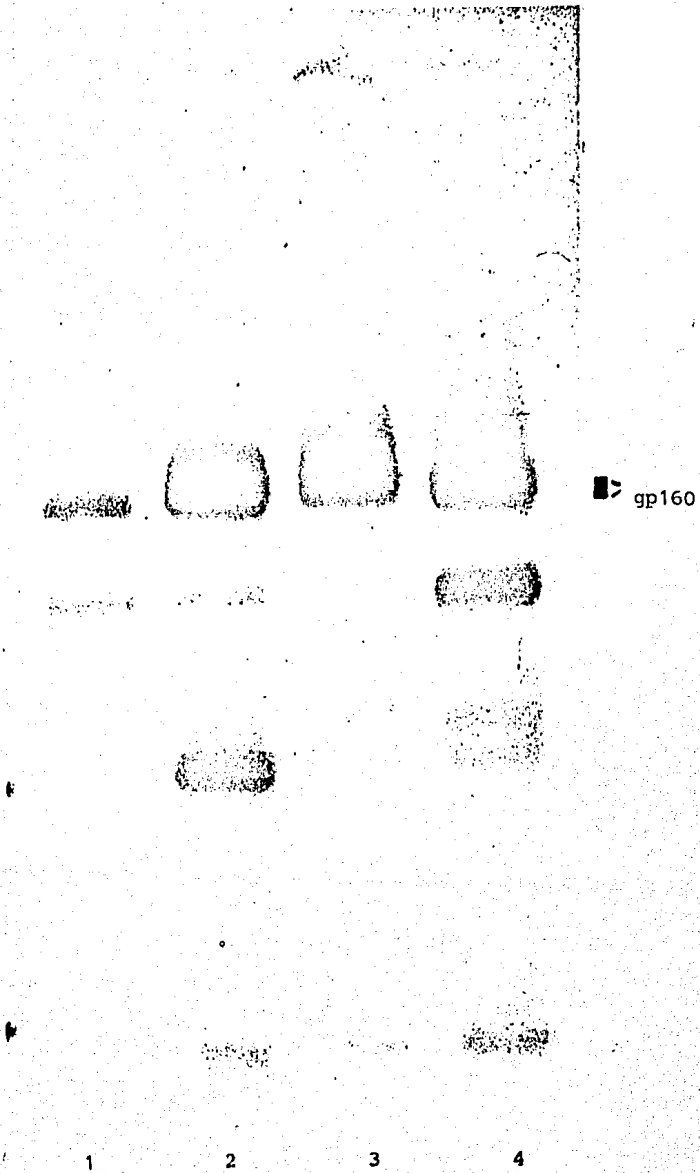


Figura 4 A.

GP-160

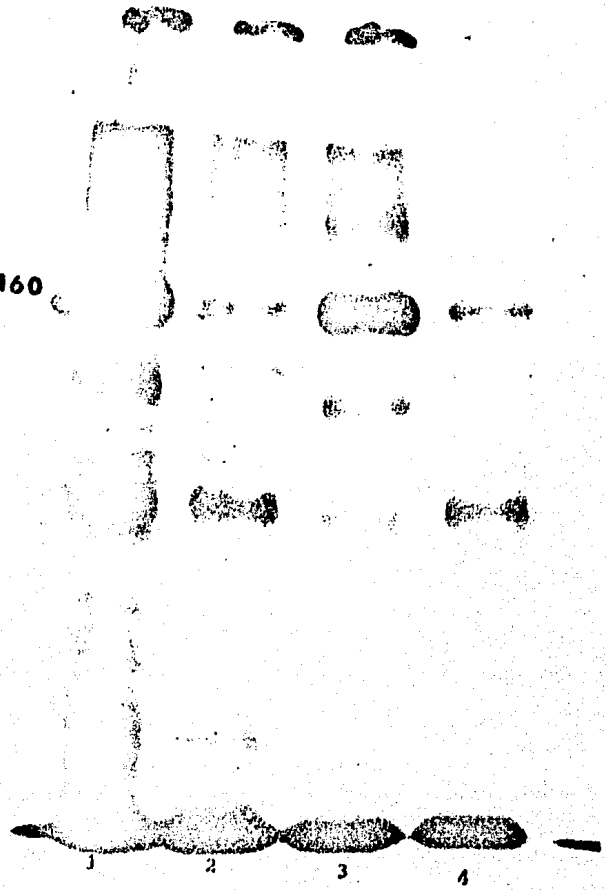
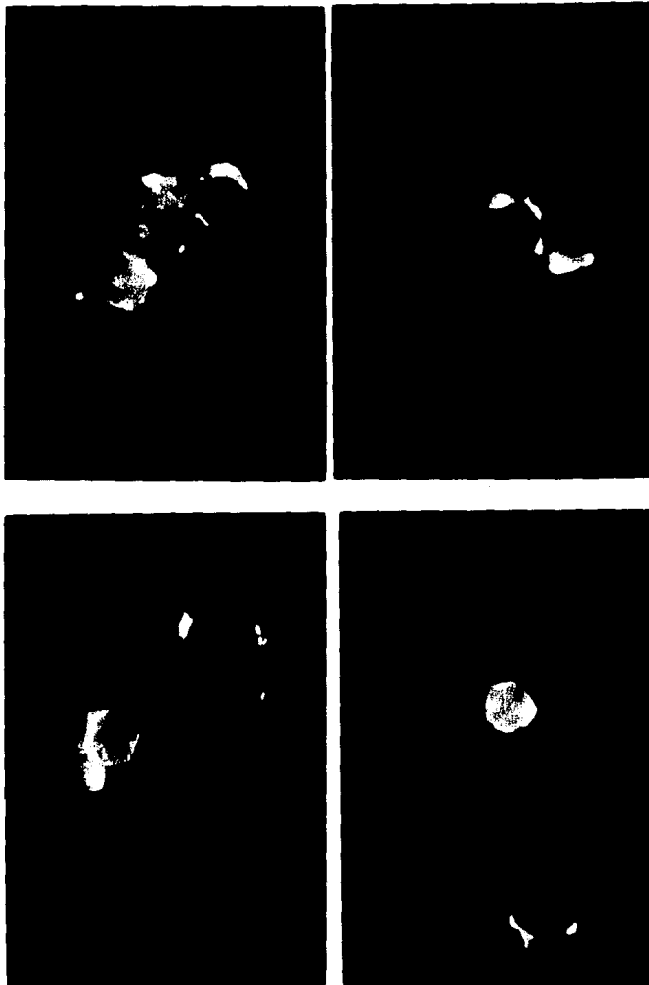


Figura 4 B.

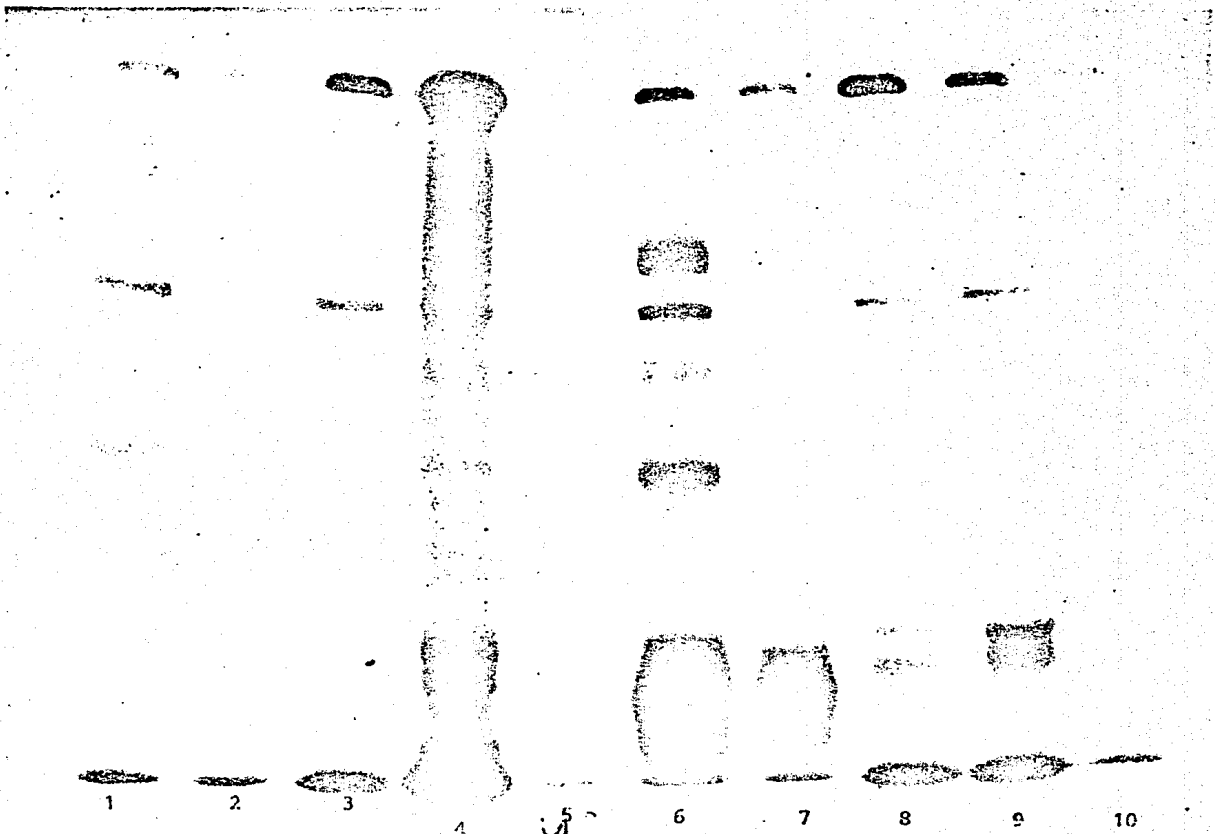


Figura 5. Autoradiografía del gel de electroforesis de poliacrilamida SDS de los inmunoprecipitados de los componentes radioiodinados de la superficie de las células tumorales con el antisuero BALB.B anti-LPC-1 (anti-gp160)
A. Células LPC-1
B. Células MOPC-460



Figura

5. PC.3 con suero normal
6. LPC-1 con BALB.B anti-LPC-1
7. LPC-1 con BALB.B anti-LPC-1
8. LPC-1 con NZB anti-LPC-1
9. LPC-1 con (NZBxNZW)_{F1} anti LPC-1
10. LPC-1 con suero normal



5
10

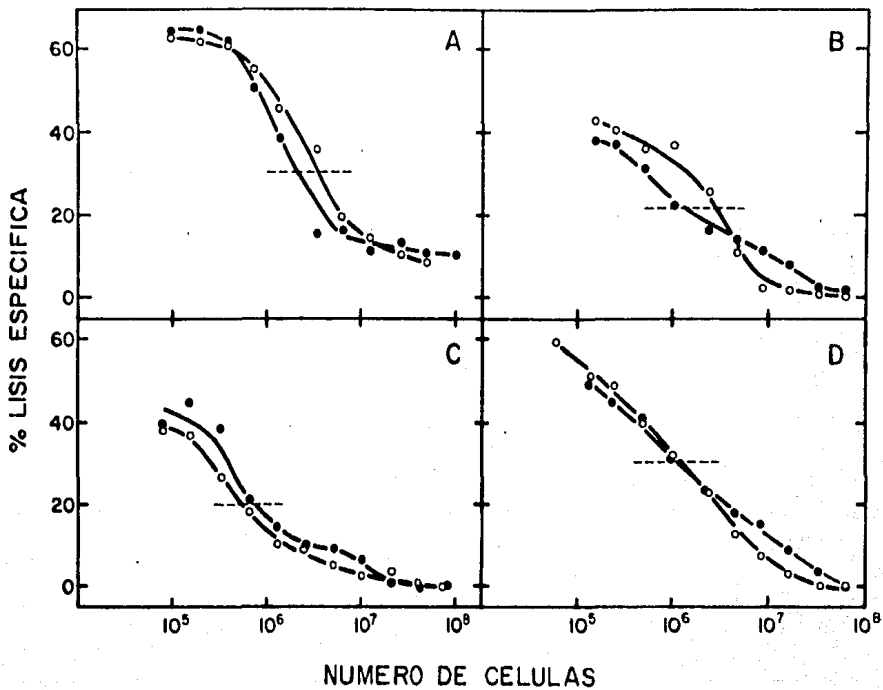


Figura 7. Comparación de la adsorción de distintos antisueros dirigidos en contra de antígenos no relacionados con H-2, por células -- LPC-1 tempranas y tardías. Diferentes cantidades de células LPC-1 tempranas (○) y tardías (●) fueron probadas para su capacidad de adsorber la actividad citotóxica complemento-dependiente de los siguientes antisueros:

A. DBA/2 anti-LPC-1

C. Anti-B220

B. B.10.D.2 anti-LPC-1

D. Anti gp70-100

La actividad remanente del antisuero fué ensayada en células LPC-1C.

sión de moléculas no relacionadas con H-2 no se encuentran enmascaradas por esta glicoproteína ya que son accesibles a sus anticuerpos.

4. Cambios en la susceptibilidad a la lisis por anticuerpos y complemento en células LPC-1

Se investigó la susceptibilidad a la lisis mediada por anticuerpos y complemento en células LPC-1 bajo tres distintas condiciones de crecimiento. Las células LPC-1 tardías y tempranas crecidas en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c, y una sublínea de este tumor adaptada al crecimiento en cultivo de tejidos (LPC-1C), se incubaron con cuatro distintos antisueros dirigidos en contra de antígenos no relacionados con H-2 (anti-PC.1, p30-40, B220, y gp-70-100) en presencia de suero normal de conejo como fuente de complemento. La Figura 8 muestra que en los cuatro experimentos, las células LPC-1 tardías fueron menos susceptibles al ataque del complemento que las células LPC-1 tempranas o las células LPC-1C. Dos de estos antisueros fueron producidos en ratón (A y B), uno de ellos en conejo (C) y el cuarto en cabra (D).

Estos resultados indican que las células LPC-1 tardías y LPC-1 tempranas muestran una diferencia considerable en cuanto a su susceptibilidad a la lisis por el mismo anticuerpo y complemento. Las células LPC-1 tardías, las cuales expresan mayor cantidad de gp160 en su superficie, siempre se mostraron menos susceptibles a la lisis por anticuerpos y complemento que las células LPC-1 tempranas o las células LPC-1C, las cuales expresan cantidades menores de gp160 en su superficie celular. La diferencia en susceptibilidad a la lisis por estos anticuerpos y com-

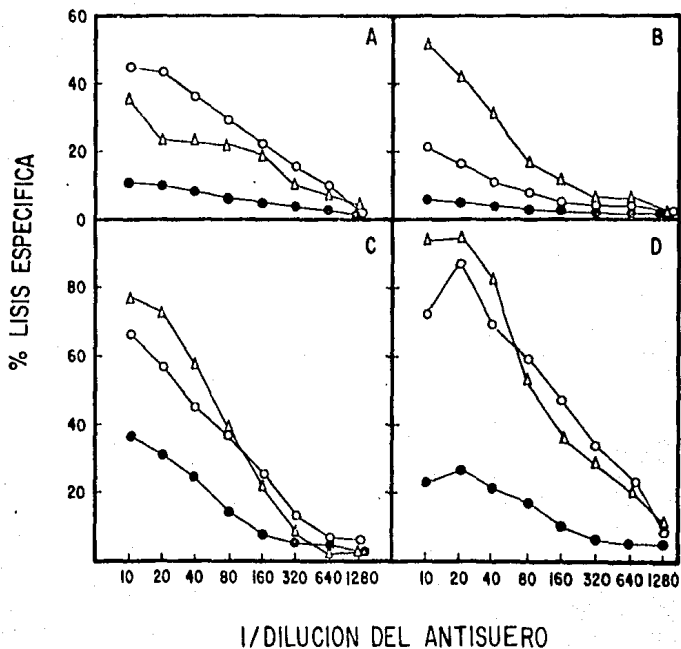


Figura 8. Reacciones citotóxicas de células LPC-1 con anticuerpos y complemento de conejo. Células LPC-1 tempranas (○), LPC-1 tardías (●) y células LPC-1C (△) fueron probadas en su susceptibilidad a la lisis por complemento de conejo en un ensayo utilizando los siguientes antisueros:

A. anti-PC.1
B. anti-B220

C. anti-p30-40
D. anti-gp70-100

plemento no puede adscribirse a diferencias en la expresión de los antígenos ya que como se demostró en la Figura 7 su accesibilidad a los Acs es la misma.

5. Comparación de diferentes mielomas en su habilidad para reaccionar con anticuerpos (anti-PC.1) y complemento

Diferentes sublíneas tumorales, con distintas cantidades de gpl60 en su superficie, fueron ensayadas para determinar su susceptibilidad a la lisis por anticuerpos anti-PC.1 y complemento de conejo, y en su habilidad de fijar estos mismos anticuerpos en un ensayo de adsorción cuantitativa. Como se observa en la Figura 9 A la sublínea tumoral más susceptible a la lisis por anticuerpos anti-PC.1 y complemento fué MOPC-167 (gpl60 -) la cual no expresa gpl60 en su superficie celular. Las otras sublíneas tumorales, que sí expresan gpl60, MOPC 315 OPEC y LPC-1, fueron significativamente menos susceptibles a la lisis por estos anticuerpos y complemento. De las curvas de adsorción cuantitativa mostradas en la Figura 9 B, es aparente que todas éstas sublíneas tumorales fijan aproximadamente la misma cantidad de anticuerpos anti-PC.1.

Estos resultados sugieren que las diferencias en la susceptibilidad a la lisis observada en la Figura 9 A no pueden ser atribuidas a diferencias en la expresión cuantitativa del aloantígeno PC.1 entre las diferentes sublíneas tumorales. Asimismo, es claro que el grado de lisis esta correlacionado con la cantidad de gpl60 en la superficie celular; ya que las células MOPC 167 (gp-160 -) no expresan cantidades detectables de gpl60 en su superficie, y fueron las más susceptibles a la lisis por

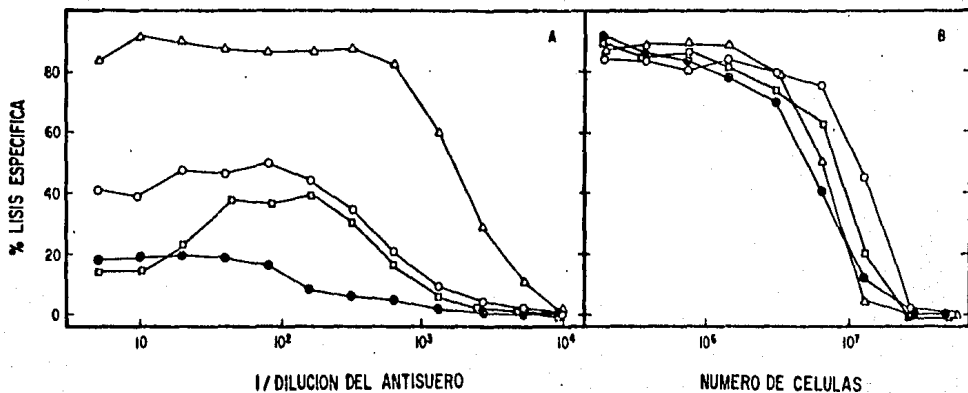


Figura 9. Reacciones de diferentes líneas tumorales con anti-PC.1.
 A. Susceptibilidad a la lisis mediada por complemento.
 B. Curvas de adsorción cuantitativa del antisuero (DBA/2 anti-LPC-1).
 Las células tumorales probadas fueron:

LPC-1 tempranas (○)
 LPC-1 tardías (●)

MOPC-167(gp160-) (△)
 MOPC-315OPEC (□)

anticuerpos anti-PC.1 y complemento, mientras que las células LPC-1 tardías que expresan gran cantidad de gpl60, fueron las más resistentes a ésta lisis (9 A). Las células LPC-1 tempranas y las células MOPC-315-OPEC, que expresan niveles intermedios de esta glicoproteína, fueron lisadas por anti-PC.1 y complemento mejor que las células LPC-1 tardías - pero no al mismo grado que las células MOPC-167 (gpl60-).

6. Diferencias en la susceptibilidad al ataque mediado por complementos de cobayo y humano

Cuando se utilizaron sueros normales de cobayo o de humano - como fuentes de complemento en los ensayos de citotoxicidad con anticuerpos anti-PC.1 y anti-B220, las células LPC-1 tardías mostraron siempre - menos susceptibilidad a la lisis que las células LPC-1 tempranas (Figura 10). En los datos mostrados en la Figura 10 B es evidente que las células LPC-1C son significativamente más susceptibles a la lisis por anti-B220 y complemento de cobayo que las células LPC-1 tardías. De igual - forma, en los otros experimentos, donde se incluyeron a células SP-2, se observa que éstas células, que no expresan gpl60 en su superficie, se -- lisan más fácilmente con anticuerpos anti-PC.1 y complemento de cobayo o - humano (Figura 10 A y 10 C) y por anti-B220 y suero humano (Figura 10 D) que las células LPC-1 tardías.

Estos resultados indican que el fenómeno de resistencia a la lisis por complemento en las células de mieloma que expresan gpl60 en su superficie, no se limita a el uso del complemento de conejo. Debe señalarse, sin embargo, que las diferencias en susceptibilidad a la lisis -- entre células LPC-1 tardías, tempranas o células gpl60 - varían y pare--

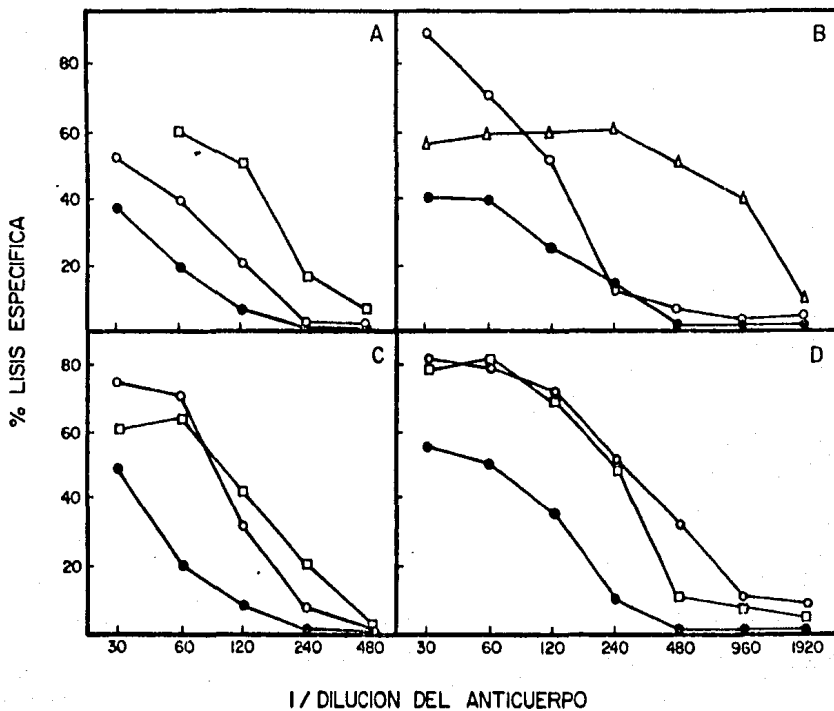


Figura 10. Susceptibilidad a la lisis por complemento de cobayo, conejo y humano de las células de mieloma. Las células blanco fueron ensayadas en su susceptibilidad a la lisis por anti-PC.1 (AyC) y anti-B220 (ByD) -- utilizando suero de cobayo (AyB) o suero humano (CyD) como fuente de complemento. Las siguientes células fueron utilizadas como blanco:

LPC-1 tardías (●)
LPC-1 tempranas (○)

sp-2 (◻)
LPC-1C (△).

cen ser mas significativas al utilizar anticuerpos de ratón y complemento de conejo.

7. Incapacidad de un segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón) de aumentar la lisis mediada por anticuerpos anti-PC.1 y complemento en células LPC-1.

Ya que las diferencias observadas en cuanto a la susceptibilidad a la lisis por complemento, en estas líneas tumorales gpl60 + y -- gpl60 -, no pueden atribuirse a diferencias en la expresión cuantitativa del antígeno y en su accesibilidad a los anticuerpos, se investigaron -- otras posibilidades para explicar éste fenómeno. Se sabe que una molé-- cula de Clq presenta seis distintos sitios para fijar a IgG y por lo tan-- to, la fuerza (avidez) de esta reacción dependerá de la proximidad entre las moléculas de IgG en la superficie celular (69). La baja eficiencia del -- ataque del complemento observada en las líneas celulares resistentes -- (gpl60 +) se podría deber a alguna falta de movilidad de las moléculas -- de IgG sobre la superficie celular, lo cual impediría la formación de a-- gregados de IgG y causaría una fijación débil e inestable de Clq. Por -- lo tanto, al usar un segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón) debería au-- mentarse la fijación del complemento, ya que éste anticuerpo ayudaría la formación de agregados de inmunoglobulinas en la superficie celular, los cuales fijarían Clq con mayor facilidad. De igual forma, este segundo -- anticuerpo también fijaría moléculas de Clq, amplificando así el efecto del ataque del complemento.

La Figura 11 muestra el efecto de la adición de un segundo - anticuerpo (dirigido en contra de IgG de ratón) en la susceptibilidad de

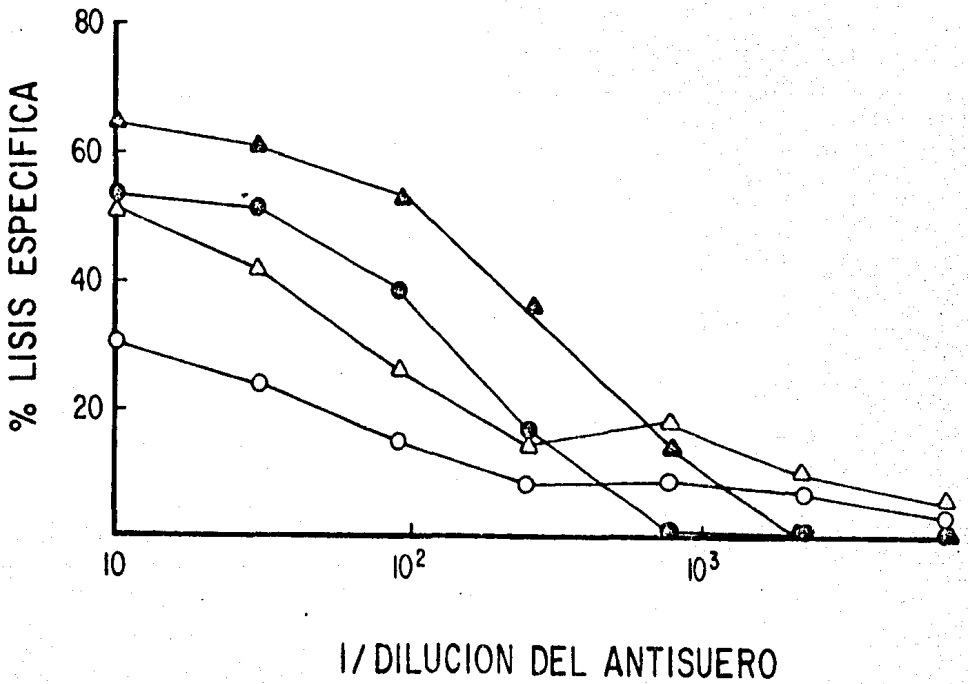


Figura 11. Efecto de un segundo anticuerpo (Ig conejo anti-IgG de ratón) en la susceptibilidad a la lisis en células LPC-1 por anti-PC.1 y complemento (suero de conejo). Las células blanco fueron incubadas con distintas concentraciones de anti-PC.1 durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente las células se lavaron tres veces con PBS a 100xg durante 5 minutos y se incubaron en presencia de complemento (●,▲) y con una concentración 1:20 del antisuero de conejo anti-IgG de ratón (○,△) durante 1 hora a 37°C. Las células ensayadas fueron:

LPC-1 tardías (○,●)

LPC-1C (△,▲).

las células LPC-1 tardías y LPC-1C a la lisis por anti-PC.1 y complemento de conejo. En ambos casos, el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón, - disminuyó significativamente la lisis de éstas células tumorales, indicando, probablemente, que el mecanismo antes propuesto no es el responsable de la falta de susceptibilidad al ataque del complemento de las células que expresan gpl60 en su superficie.

8. Estabilidad de los complejos inmunes (antígeno-anticuerpo) en la superficie de las células LPC.1

Los resultados de la Figura anterior (Figura 11), sugieren - por otro lado, la posibilidad de que las células LPC-1 resistentes a la lisis por complemento estuvieran, de alguna forma, desprendiendo moléculas de anticuerpos o complejos inmunes (antígeno-anticuerpo) de su superficie y que al utilizar un segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón) se aumenta la velocidad de éste desprendimiento y causando así la disminución de susceptibilidad a la lisis por los anticuerpos anti-PC.1 y complemento. Con esta segunda hipótesis en mente, decidimos determinar la estabilidad de las moléculas de anticuerpo (anti-PC.1) en la superficie de éstas células.

En los reportes previos (40) y en el presente, hemos observado que cuando se realizan experimentos de adsorción cuantitativa de anticuerpos (Figura 9 B), la fijación de inmunoglobulinas a la superficie de células de mielomas gpl60 + permanece estable durante por lo menos 30 minutos a 4°C. Sin embargo, puede ser posible que a 37°C, temperatura a la que se fija el complemento y la célula es metabólicamente activa, los anticuerpos o los complejos inmunes puedan desprenderse de la superficie celu-

TABLA 1. ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS INMUNES EN LA SUPERFICIE DE CELULAS LPC-1

Células	Temperatura	¹²⁵ I-Ig de conejo anti-IgG ratón fijado (CPM) ^a		
		-Ab	+Ac	Fijado específico ^b
LPC-1 tempranas	4°C	33,132	61,976	28,844
LPC-1 tempranas	37°C	30,583	70,507	39,924
LPC-1 tardías	4°C	4,473	45,210	40,737
LPC-1 tardías	37°C	4,780	60,668	55,888

a) 1×10^6 células en 100 ul de medio RPMI 1640 se incubaron con o sin 20 μ l de una dilución 1:2 de antisuero anti-PC.1 durante una hora a la temperatura indicada. Las células se lavaron tres veces en PBS por medio de centrifugaciones a 100 xg durante 5 minutos y se les agregaron 4×10^6 CPM de anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón ¹²⁵I y se incubaron 30 minutos a 4°C. Los tubos se lavaron cuatro veces y se determinó la radioactividad de cada uno de ellos en un contador gamma. Los valores representan un promedio de dos duplicados.

b) Fijado específico = (CPM + AC) - (CPM-AC).

lar por medio de endocitosis o por medio de la formación de parches y casquetes que se desprenden al espacio extracelular.

La cantidad de anticuerpos (anti-PC.1) en la superficie celular de células LPC-1 tempranas y tardías se determinó bajo dos distintas condiciones de incubación. Los resultados presentados en la Tabla 1 indican que tanto las células LPC-1 tardías como las células LPC-1 tempranas, después de una hora de incubación a 37°C, la cantidad de anticuerpos anti-PC.1 presente en la superficie celular, es aproximadamente igual a la determinada a 4°C. Además, las células LPC-1 tardías parecen tener cantidades un poco mayores de anticuerpos anti-PC.1 fijados a su superficie en las células LPC-1 tempranas, tanto a 4°C como a 37°C. Estos resultados indican que la diferencia en susceptibilidad a la lisis mediada por anticuerpos y complemento probablemente no se deba a una pérdida de moléculas de anticuerpo de la superficie celular de los mielomas gpl60 +. El dato inesperado de que las células LPC-1 tempranas fijan siete veces más anti-IgG que las células LPC-1 tardías en ausencia de anticuerpos anti-PC.1 puede ser explicada si las células tempranas expresan más receptores de superficie para Fc de inmunoglobulinas que las células LPC-1 tardías.

9. Fijación de Clq y C3 por las células de mieloma gpl60 + y gpl60 -

Para determinar si la falta de susceptibilidad a la lisis por anticuerpo y complemento observada en las células gpl60 + se debe a una falta de activación de la fuente de complemento o a la falta o disminución de su fijación de algunos de los componentes de éste sistema, se llevaron a cabo experimentos en los cuales se incubaron células gpl60 + y

Figura 12. Fijación de C1q y C3 humano a la superficie de las células gp160+ y gp160-.

Las células de mieloma fueron colocadas durante 15 minutos en presencia de anti-PC.1 (1:100) y suero humano como fuente de complemento(1:3); lavadas 4 veces con PBS. Posteriormente a éstas células se les agregó anticuerpos de cabra anti-C1q y anti-C3 humano acoplados a fluoresceína y se les observó bajo microscopía de epifluorescencia.

1. Células sp-2(gp160-)+anti-C1q
2. Células LPC-1 (gp160+)+anti-C1q
3. Células sp-2(gp160-)+anti-C3
4. Células LPC-1 (gp160+) +anti-C3

gp160- en presencia de anticuerpos anti-PC.1, complemento humano y anticuerpos fluorescentes dirigidos en contra de los componentes C3 y C1q.

Los resultados de estas observaciones bajo microscopía de fluorescencia se muestran en la Figura 12; éstos indican que las células gp160+ y gp160- fijan aproximadamente cantidades equivalentes de éstos componentes del complemento y que la resistencia a la lisis inmune por complemento de los mielomas que expresan gp160 probablemente no se debe a una falta de fijación de los primeros componentes del complemento.

10. Efecto en la susceptibilidad de las células de mieloma gp160+ a la lisis mediada por complemento por el tratamiento con proteasas.

Células LPC-1 tardías y MOPC-315-OPEC fueron sometidas a un tratamiento con proteasas para determinar si la eliminación de gp160 de la superficie celular afecta la susceptibilidad de éstas células a la lisis por anticuerpos y complemento. Los resultados presentados en la Figura 13 indican que en todos los casos las células tratadas con proteasas fueron significativamente más susceptibles a la acción lítica del complemento en presencia de anticuerpos anti-PC.1.

Estudios previos (39) y los resultados presentados en la Figura 4 han demostrado que gp160 es sensible a la actividad enzimática de la tripsina y subtilisina y que éste tratamiento transforma las células LPC-1 tardías en células blanco sensibles a la lisis por linfocitos T citotóxicos. Estos resultados indican la posibilidad de que gp160 (u otra proteína de la superficie celular de las células de mieloma sensible a la acción enzimática de la tripsina y subtilisina) se encuentre involu-

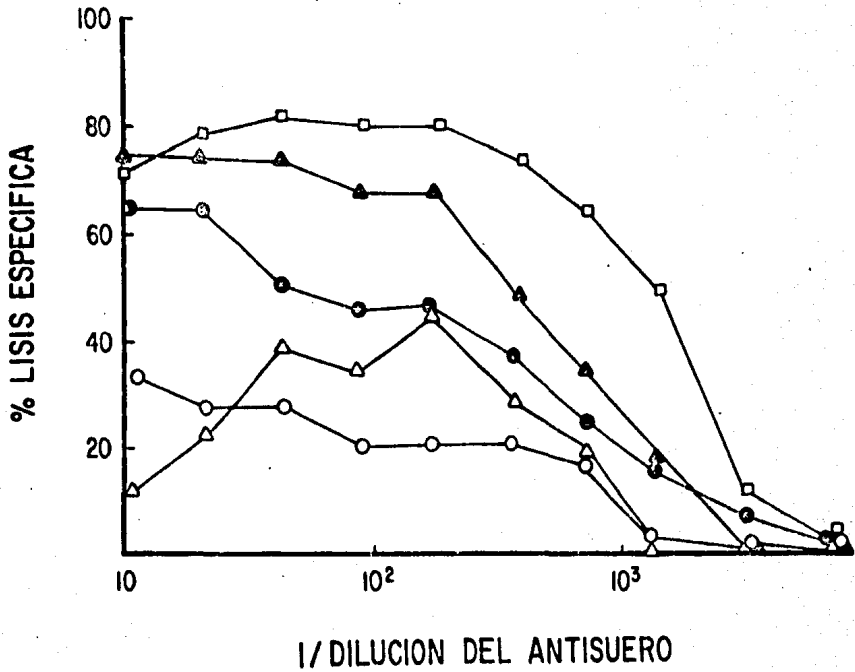


Figura 13. Efecto del tratamiento con proteasas en la lisis mediada por complemento y anti-PC.1 en células de mieloma que expresan gp160. La susceptibilidad a la lisis por anti-PC.1 y complemento (suero normal de conejo) fué probado en las siguientes células:

- LPC-1 tardías (○)
- LPC-1 tardías tratadas con tripsina (●)
- MOPC-315OPEC (△)
- MOPC-315OPEC tratadas con tripsina (▲)
- MOPC-315OPEC tratadas con subtilisina (□)

Las células tumorales fueron tratadas con proteasas bajo las condiciones descritas en Material y Métodos.

crada en la resistencia de éstas células a la lisis inmune por Acs y --
complemento.

Para determinar si el aumento de la susceptibilidad a la li--
sis por complemento en las células gp160 + causado por el tratamiento con
proteasas era reversible mediante la incubación de éstas células bajo --
condiciones metabólicas se llevó a cabo el experimento descrito en la Fi
gura 14.

Estos resultados muestran que el efecto enzimático en la sus-
ceptibilidad a la lisis por anticuerpos y complemento es parcialmente re-
versible después de 4 horas a 37°C y no a 4°C, lo cual indica que posible
mente esta resistencia adquirida durante la incubación se debe a síntesis
de novo de gp160.

11. Efecto de algunas lectinas en la susceptibilidad a la lisis por com-
plemento en las células LPC-1

Dada la afinidad de las lectinas por las glicoproteínas de la
superficie de células tumorales (70), decidimos experimentar el efecto --
en la susceptibilidad a la lisis por anticuerpos y complemento --
de la unión de diferentes lectinas (AGT:aglutinina de germen de trigo, --
ConA:concanavalina A) a las glicoproteínas de la superficie de células --
gp160 +.

Para determinar si la AGT y ConA mostraban afinidad por los -
componentes de la superficie celular de células LPC-1, se incubaron extrac

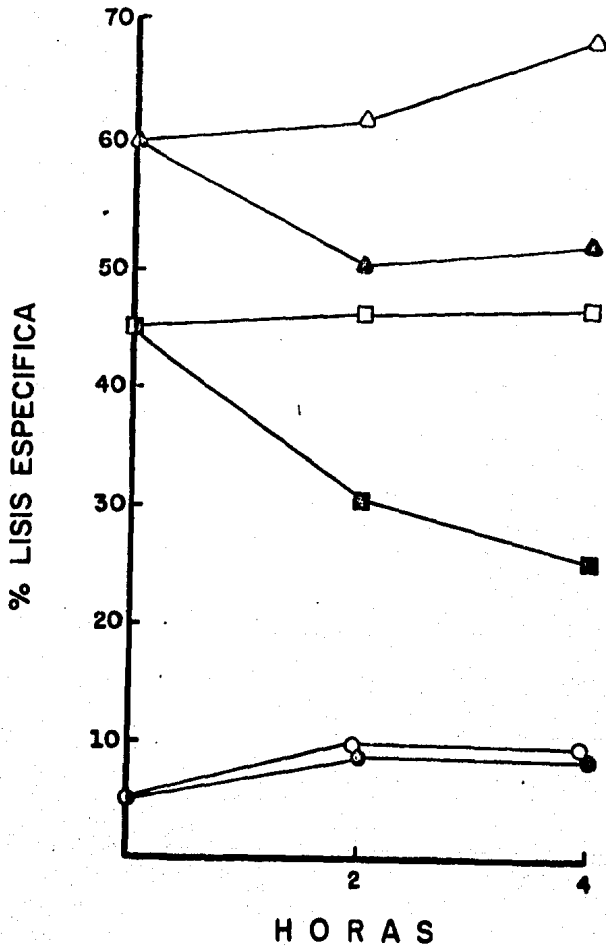


Figura 14. Efecto de la incubación (4°C y 37°C) de las células LPC-1 tardías tratadas con tripsina antes de la incubación con anticuerpos y complemento. 5×10^6 células LPC-1 fueron tratadas con diferentes concentraciones de tripsina, incubadas a 4°C y a 37°C durante distintos periodos y posteriormente sometidas a un ensayo de citotoxicidad con anti-PC.1 (1:96) y complemento de conejo.

Tripsina
 0µg/ml
 250µg/ml
 25µg/ml

Temperatura
 (●) 37°C, (○) 4°C
 (▲) 37°C, (△) 4°C
 (■) 37°C, (□) 4°C

tos radioiodinados (^{125}I) de células LPC-1 con éstas lectinas acopladas a sefarosa y se sometieron a un análisis en geles de poliacrilamida-SDS. Los resultados se muestran en la Figura 15 e indican que gp160 (junto -- con otras glicoproteínas de la superficie celular) muestra gran afinidad por ambas lectinas.

El efecto de estas dos lectinas en la susceptibilidad a la - lisis por anticuerpos y complemento fue analizado mediante la adición de AGT y ConA en diferentes ensayos de citotoxicidad. Los resultados se -- muestran en las Tabla 2 y en la Figuras 16 y 17 e indican que la AGT - causa un aumento en la susceptibilidad a la lisis con anticuerpos (anti-H-2^d, anti-B220 y anti-PC.1) y complemento en las células LPC-1, sin embargo, la ConA disminuye en cuarto grado la susceptibilidad a la lisis -- en estas células. Este último fenómeno puede deberse a un impedimento - estérico causado por la ConA en la superficie celular. Cabe mencionar - que experimentos previos (71) han demostrado por medio de epifluorescencia, que ambas lectinas, la AGT y la ConA, se fijan a la superficie de - células LPC-1; sin embargo, se puede observar claramente que la AGT aglutina a las células tumorales, mientras que la ConA no tiene la capacidad de aglutinarlas.

Para determinar si el aumento en la susceptibilidad a la li- sisis por complemento de células LPC-1 causado por la AGT se debía a una - eliminación de gp160 de la superficie celular (por medio de la formación de parches y casquetes) se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS la superficie de células LPC-1 preincubadas con AGT, ConA, Tripsina y PBS. Los resultados que se muestran en la Figura 18 indican que unicamente se

elimina gp160 mediante el tratamiento enzimático, y que las lectinas no causan una disminución aparente y significativa en la cantidad que se expresa de ésta glicoproteína.

Por último, con el objeto de observar el efecto de la AGT sobre la superficie de células LPC-1, se incubaron éstas células en presencia de AGT acoplada a fluoresceína y se llevaron a cabo observaciones en microscopía fluorescente cada 15 minutos en un periodo de 90 minutos. Los resultados se muestran en la Figura 19. Es claro, que la AGT causa un rearrreglo de la distribución topográfica de las glicoproteínas que la fijan en la membrana de las células LPC-1 formando parches y aglomerados de estas glicoproteínas en un polo.

Por otro lado, en la Figura 20 se muestra que el azúcar específico de la AGT, la n-acetil-d-glucosamina, inhibe el fenómeno del aumento en la susceptibilidad a la lisis causado por ésta lectina en las células LPC-1.

Todos estos resultados indican que la AGT causa un rearrreglo de la conformación de algunos de los componentes de la superficie de las células LPC-1 lo cual trae como consecuencia un aumento en la susceptibilidad a la lisis al usar anticuerpos anti-H-2^d causado por la fijación de la lectina a la superficie celular, podría deberse a un desenmascaramiento de los aloantígenos H-2.

TABLA 2

	Lectina ug/ml	Lisis espontánea	Lisis específica
AGT	125	13%	49.35%
	62.5	20%	50.20%
	31.3	19%	50.70%
	15.6	19%	51.9%
	7.8	19%	48.20%
	0	10%	25.0%
ConA	62.50	18%	20.5%
	31.3	18%	28.1%
	15.6	19%	32.0%
	7.8	16%	36.0%
	3.5	13%	36.0%
	0	11%	41.0%

Efecto de la AGT y ConA en la susceptibilidad a la lisis por complemento de células LPC-1 tardías con anti-PC.1 (1:96) y suero normal de conejo.

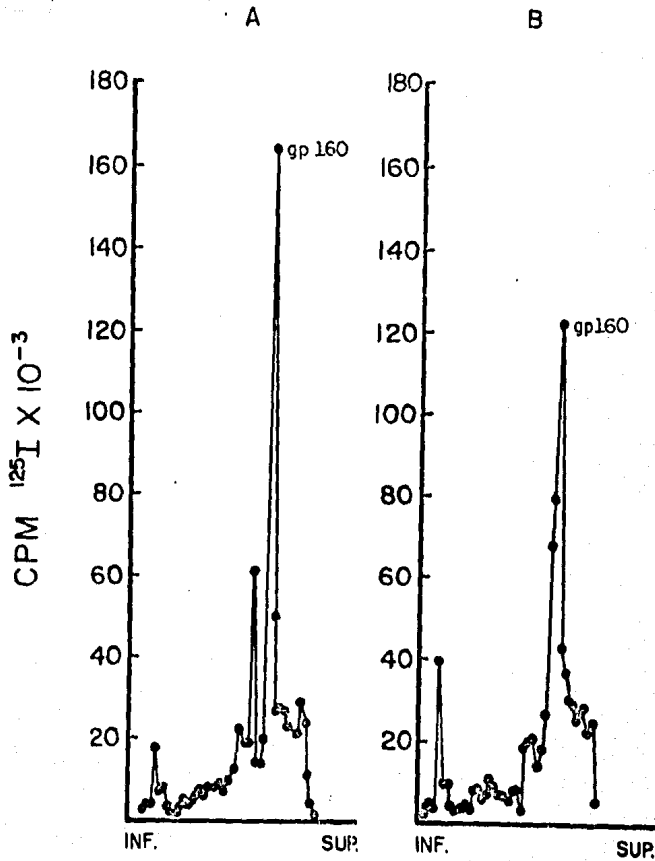


Figura 15. Patrón electroforetico de los extractos en NP-40 de células LPC-1 tardías radiiodinadas incubados con lectinas acopladas a Sefarosa. Los extractos celulares fueron incubados con AGT-Sefarosa (A) y ConA-Sefarosa (B) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el material unido a las lectinas se extrajo mediante un hervor en 0.08M Tris, 5% SDS y 5%2-mercaptoetanol y sometido a un análisis en geles de poliacrilamida SDS. Los geles fueron rebanados en secciones de 2 mm de grosor y se les determinó su radioactividad en un contador gamma.

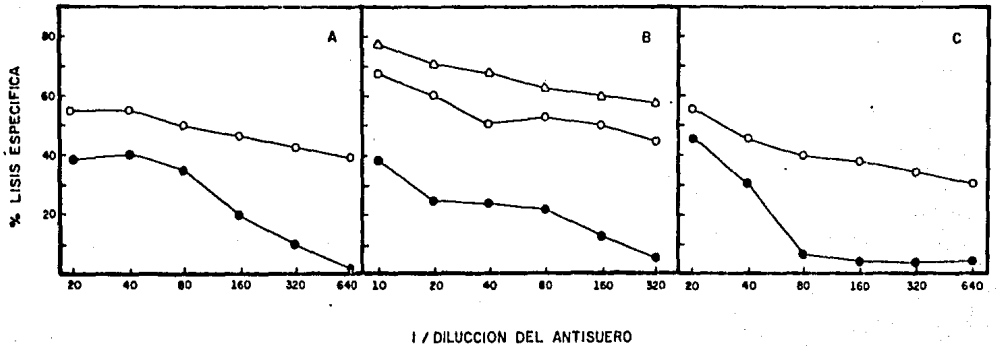


Figura 16. Efecto de la AGT en la susceptibilidad a la lisis con anticuerpos y complemento. Células LPC-1 tardías fueron probadas en su susceptibilidad a la lisis por anticuerpos:

(A) anti-PC.1, (B) anti-H-2^d y (C) anti-B220 con suero normal de conejo como fuente de complemento en presencia y ausencia de AGT (30 ug/ml).

LPC-1 tardías (●)

LPC-1 tardías + AGT (○)

LPC-1 tardías tratadas con tripsina (Δ).

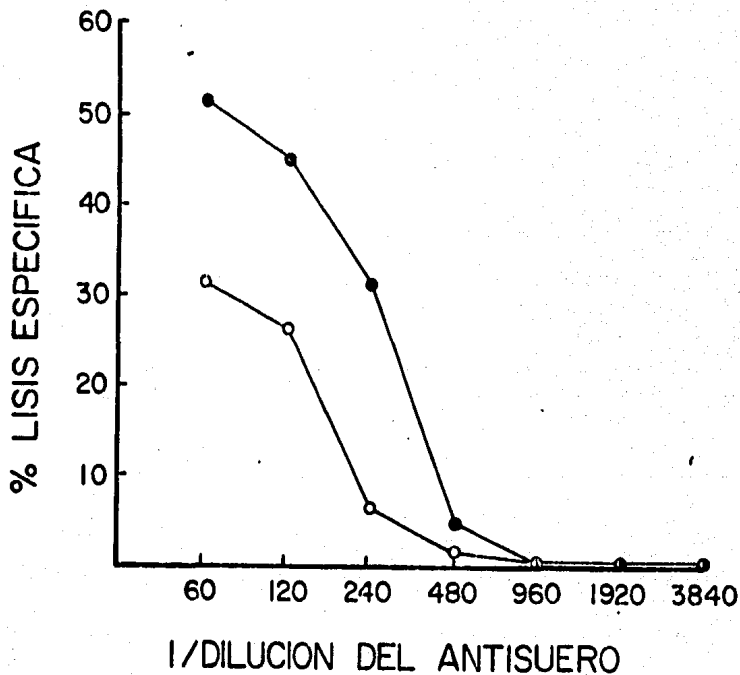


Figura 17. Efecto de la ConA en la susceptibilidad a la lisis con anti-B220 y complemento. Células LPC-1 tardías fueron probadas para su susceptibilidad a la lisis por complemento en presencia (○) y ausencia (●) de ConA (30 ug/ml) y anti-B220.

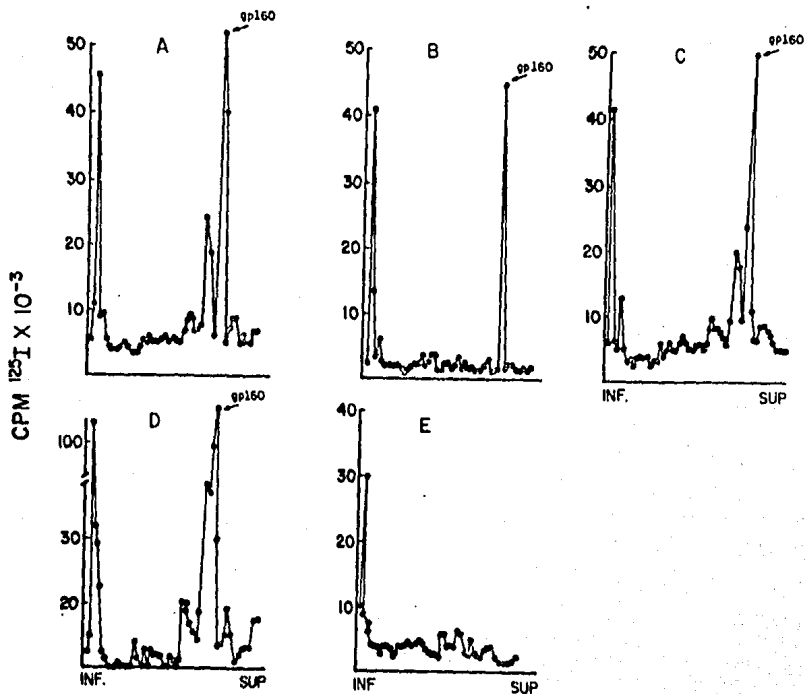


Figura 18. Electroforesis en poliacrilamida SDS de las proteínas superficiales de células LPC-1 tardías radioiodinadas incubadas con lectinas.

10^6 células LPC-1 radioiodinadas fueron incubadas durante 30 minutos con : (A) PBS, 37°C, (B) AGT, 37°C, (C) ConA 37°C, (D) PBS, 4°C y (E) Tripsina (25mg/ml) 37°C. Posteriormente las células fueron lavadas 4 veces con PBS, solubilizadas en NP-40 (100ul) y sometidas a un analisis en geles de tubo de poliacrilamida SDS.

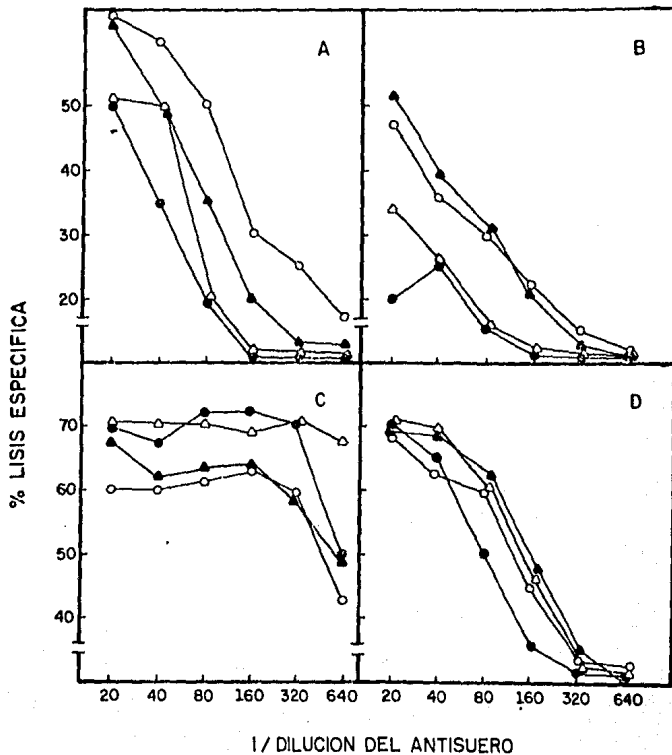


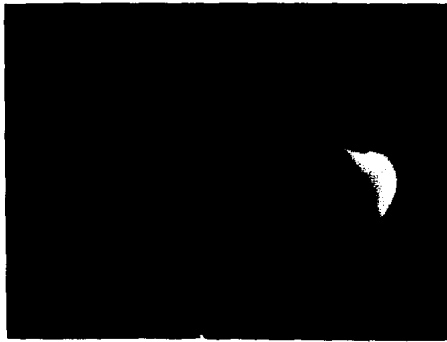
Figura 20. Efecto de la n-acetil-d-glucosamina en la inhibición del aumento de la susceptibilidad a la lisis por complemento de células LPC-1. Células de mieloma LPC-1 (AyB) y sp-2 (CyD) fueron incubadas con la lectina AGT y su inhibidor (n-acetil-d-glucosamina) bajo distintas condiciones antes de llevar a cabo el ensayo de citotoxicidad con anticuerpos y complemento. A. anti-B220, B. anti-H-2^d, C. anti-PC.1 y D. anti B220.

- (●) Células tumorales + Ac + C'.
- (○) Células tumorales + AGT + AC + C'.
- (△) Células tumorales preincubadas con AGT, lavadas 4 veces con n-acetil-d-glucosamina + Ac + C'.
- (▲) Células tumorales preincubadas con AGT+n-acetil-d-glucosamina y lavadas 4 veces con n-acetil-d-glucosamina, + Ac + C'.

Fi



ia a
las



CONCLUSIONES

No es difícil aceptar el concepto de que la célula blanco -- pueda responder o influenciar el resultado del ataque inmune cuando uno considera que las células tienen la habilidad de adaptarse al medio ambiente que le rodea. Las respuestas que las células tienen a su alcance para influenciar éste ataque incluyen su capacidad de reparar el daño -- causado por el complemento, su habilidad de desprender o degradar los -- componentes del complemento unidos a la membrana, la producción de material con actividad anti-complementaria y/o su habilidad para modificar -- sus propias propiedades fisicoquímicas. Además, la velocidad a la cual la célula es capaz de responder al ataque inmune juega un papel muy im-- portante en la habilidad de la célula para resistir este mecanismo de -- muerte. Cuando uno considera que bajo condiciones apropiadas, la muerte celular por complemento ocurre en 3-5 minutos, es claro que las células deberán responder en una forma rápida y eficaz. Por lo tanto, el resul-- tado depende, en términos simples, de los aspectos cuantitativos y cua-- litativos del mecanismo de ataque vs la capacidad total de una célula de modificar o nulificar la actividad citotóxica que se genera.

Durante los últimos años, varios grupos de investigadores -- han reportado diferencias en la susceptibilidad a la lisis por complemen-- to en células tumorales. Gran parte de este trabajo ha sido desarrolla-- do por el grupo de Ohanian en el Instituto Nacional de la Salud (NIH), - Maryland EUA (70), el cual ha reportado que un hepatoma de cobayo (línea 10) es poco susceptible a la lisis por anticuerpos y complemento cuando

se utiliza complemento humano (71,72). Esta resistencia a la acción lítica del complemento parece estar relacionada con algunos mecanismos de reparación de membrana entre los cuales están involucrados la síntesis de lípidos y proteínas (73). Por otro lado, se ha encontrado que cuando se tratan éstas células con inhibidores metabólicos o con algunas drogas quimioterapéuticas (como la puromicina o la ciclohexamina) las células aumentan su susceptibilidad a la lisis por complemento (74).

El mecanismo exacto de la resistencia a la lisis por anticuerpos y complemento en nuestro sistema es aún poco claro. Hasta ahora -- nuestros resultados indican que el anticuerpo se fija a su antígeno -- correspondiente en la superficie celular y permanece establemente unido a él durante periodos hasta de 60 minutos bajo condiciones metabólicas -- en las cuales generalmente se lleva a cabo la fijación del complemento. La presencia y cantidad de gpl60 en la superficie celular siempre se -- correlaciona con el grado de resistencia a la lisis por complemento ob-- servado en nuestro sistema. Los datos aquí presentados sugieren que -- gpl60 puede estar jugando un papel activo en la resistencia a la lisis -- por anticuerpos y complemento; por ejemplo llevando a cabo una actividad anticomplementaria o por medio de la obstrucción de la inserción de los complejos de ataque del complemento (C5-9) en la bicapa lipídica. Esta actividad podría deberse tanto a la porción proteica o a la porción de -- carbohidratos de gpl60.

Se ha detectado material con actividad anticomplementaria en la superficie de varias células (75,76) y en ocasiones este material es

liberado al medio de cultivo por las células tumorales (77,78). El tratamiento de la línea 10 de hepatoma con enzimas proteolíticas de cobayo causa un aumento en su susceptibilidad a la lisis por complemento y a la vez, aparece material anticomplementario en el sobrenadante (53). Un análisis del modo de acción de éste material sugirió que la actividad estaba en la aceleración de la degradación de C_2 . Probablemente, gp160 también actúe en una forma similar, acelerando la degradación de alguno de los componentes del complemento.

Se han reportado varios tumores resistentes a la lisis por complemento y anticuerpos anti-H-2 o anti- otro antígeno de superficie. Aparentemente, esta resistencia se deriva la presencia de ciertas glicoproteínas en su superficie. Uno de ellos, el adenocarcinoma mamario de ratón llamado TA-3Ha, puede crecer en ratones alogénicos y en ratas (79). Este tumor expresa en su superficie una glicoproteína de alto peso molecular (500 000 daltones (80)) llamada epiglicanina. TA-3Ha es una variante del tumor TA-3St, el cual no expresa la epiglicanina y solo puede ser transplantado en la cepa en la que se originó el tumor (A/HeHa). Otro ejemplo es un mieloma de Balb/c originado en Japón (81) el cual es también resistente a la lisis por anticuerpos anti-H-2 y complemento y expresa en su superficie una glicoproteína de peso molecular aproximado de 120 000 - 160 000 daltones. La eliminación de esta glicoproteína por medio de tripsina o pronasa vuelve susceptibles a estas células a la acción del complemento. Estos ejemplos de resistencia al ataque inmune y la expresión de glicoproteínas superficiales es continua y no en forma intermitente como en el caso de LPC-1 (células tempranas vs células tardías).

No se tiene aún suficiente información acerca de la naturaleza de las -- glicoproteínas asociadas con la resistencia de LPC-1 y otros tumores como para determinar si se trata de una misma proteína, tal vez con distintos pesos moleculares debido a la cantidad de azúcares unidas a ésta.

La idea de que una estructura de la superficie celular interaccione preferentemente con los aloantígenos de histocompatibilidad, bloqueando el acceso a LTC's e impidiendo la fijación de sus anticuerpos -- respectivos, puede ser punto de gran importancia tanto en células tumorales como en células normales.

a) En primer lugar, la expresión de gpl60 (o alguna otra molécula similar) en la superficie de la célula, puede ser la responsable de uno de los mecanismos por los cuales los tumores evaden su destrucción inmune. Esto puede ocurrir en dos distintos -- estados del desarrollo tumoral:

1) Cuando aparece inicialmente la célula neoplásica puede expresar ésta molécula bloqueadora y evadir la "vigilancia - inmunológica" impidiendo que se genere cualquier tipo de - respuesta inmune.

2) Por otro lado las células tumorales podrían protegerse de LTC's ya que generados por éstas mismas células, por medio del enmascaramiento de sus antígenos de histocompatibilidad.

b) Por otro lado, algunas células normales, durante su diferenciación, pueden expresar moléculas nuevas en su superficie, a las

cuales el huésped no es tolerante y así generar una respuesta inmune (LTC's o anticuerpos). Esta respuesta no favorable podría ser evitada si la célula de alguna forma enmascara nuevos antígenos o los antígenos de histocompatibilidad.

Esta importante regulación de la expresión de antígenos de histocompatibilidad en células tumorales y normales por medio de una interacción con otra molécula de la superficie celular presenta la ventaja que a pesar de que se bloquean los determinantes antigénicos de los antígenos del CMH reconocidos por los LTC's o anticuerpos, otras partes de la molécula (como la porción de carbohidratos) u otras moléculas no relacionadas con el CMH, pueden expresarse libremente y así permitir su funcionamiento.

Hasta ahora, queda la duda si gpl60 se expresa unicamente en células tumorales, por lo que la consideraríamos un antígeno tumoral; o bien, si por otro lado algunas células normales expresan gpl60 en su superficie y si esta glicoproteína en ellas desempeña alguna función reguladora. Uno de los tipos celulares normales que se beneficiaría con la expresión de gpl60 sería la célula del trofoblasto. Se sabe que durante el desarrollo embrionario en los mamíferos, el feto representa un aloinjerto, exponiendo a la respuesta inmune materna diferentes aloantígenos superficiales de origen paterno. Existen evidencias que esta protección esta brindada por un recubrimiento de la superficie del trofoblasto con una substancia mucilaginosa. Sería interesante hacer una comparación -- entre la glicoproteína de células del trofoblasto y la de las células --

tumorales.

Definitivamente, las observaciones de la resistencia a la lisis por complemento en las líneas celulares que expresan gp160 están hasta ahora consolidadas por métodos experimentales, pero su interpretación y significado último para el marco de la inmunología tumoral, aún no están establecidos sólidamente y requiere de una mayor investigación.

Los mecanismos por los cuales los tumores evaden su destrucción inmune apenas comienzan a ser entendidos. Se trata de un problema multidisciplinario y se espera que el entendimiento de éstos mecanismos proveerá nuevas herramientas para evitar éste escape: meta final de la inmunoterapia. Alcance o no esta meta, no disminuye el mérito al reto del investigar y entender estos diferentes mecanismos del escape inmunológico.

BIBLIOGRAFIA

1. Ehrlich, P. 1906. Collected Studies in Immunity. McMillan Press, London.
2. Law, L.W. y E. Appella. 1975. Studies of soluble transplantation and tumor antigens. En: Cancer: A Comprehensive Treatise. Vol. IV. Editado por F. F. Becker. Plenum Press, New York. Pp. 135-183.
3. Coggin, L.W. y N.G. Anderoon. 1974. Cancer differentiation in embrionic antigens: some central problems. Adv. Cancer Res. 19: 105.
4. Stutman, O. 1975. Immunodepression & malignancy. Adv. Cancer Res., 22: 261.
5. Hellstrom, K.E. y I. Hellstrom. 1974. Lymphocyte mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumor antigens. Adv. Immun. 18: 209.
6. Price, M.R. y R.W. Baedwin. 1975. Immunobiology of chemically induced tumors. En: Cancer: A Comprehensive Treatise. Vol. IV. Editado por F.F. Becker Plenum Press, New York. Pp. 259.
7. Golub, S.H. 1975. Host immune response to human tumor antigens. En: Cancer: A Comprehensive Treatise. Vol. IV. Editado por F.F. Becker. Plenum Press, New York. Pp.
8. Perlman, P., H. Perlman y H. Wigzel. 1972. Lymphocyte mediated cytotoxicity in vitro: induction and inhibition by humoral antibody and nature of effector cells. Transpl. Rev., 13: 91

9. Zinkernagel, R.M. y P.C. Doherty. 1975. H-2 compatibility requirement for T-cell mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Exp. Med.*, 141: 1427.
10. Fink, P.J. y M.J. Bevan. 1978. H-2 antigens of the thymus determine lymphocyte specificity. *J. Exp. Med.*, 138: 766.
11. Forman, J. 1975. On the role of H-2 histocompatibility complex in determining the specificity of cytotoxic effector cells sensitized against syngenic TNP-modified targets. *J. Exp. Med.*, 142: 403.
12. Gomrad, E.V., T. Duprez, T. Reme y M.J. Colomban. 1977. Exclusive involvement of H-2^b or H-2^d product in the interactions between T-killer lymphocytes and syngenic H-2^b or H-2^d viral lymphomas. *J. Exp. Med.*, 146: 909.
13. Klein, J. 1975. *Biology of the Mouse Histocompatibility H-2 Complex.* Springer-Verlag, New York. Pp. 600.
14. Snell, G.D., J. Daussett y S. Nathenson. 1976. *Histocompatibility.* Academic Press, New York. Pp. 385
15. Shreffler, D.C. y S.C. David. 1974. The H-2 major histocompatibility complex and the I immune response region: genetic variation, function and organization. *Adv. Imm.*, 20: 125.
16. Katz, D.H. y B. Benacerraf (Editores). 1974. *The Role of the Products of the Histocompatibility Gene Complex in Immune Responses.* Academic Press, New York. Pp. 780.
17. Nathenson, S.G. y S.E. Cullen. 1974. Biochemical properties and immunochemical genetic relations of mouse H-2 alloantigens. *Biochem. Biophys. Acta.*, 344: 1.

18. Silver, J. y L. Hood. 1974. Detergent solubilized H-2 alloantigen is associated with a small molecular weight polypeptide. *Nature*, 249: 764.
19. Ohanian, S.H., S.I. Seymour y T. Borsos. 1977. Molecular interactions of cells with antibodies and complement: influence of metabolic and physical properties of the target cells on the outcome of humoral immune attack. En: *Contemporary Topics in Molecular Immunology*. Vol. VII. Plenum Press, New York, Pp. 153-180.
20. Anziano, D.F., A.P. Dalmasso y R. Lehauk. 1972. Role of complement in immune lysis of Trypanosoma cruzi. *Infect. Imm.*, 6: 860.
21. Almeida, J.D. y A.P. Waterson. 1972. Complement action on viral cells. *Adv. Virus. Res.*, 15: 307.
22. Kabat, E.A. y M. Mayer. 1961. *Experimental Immunochemistry*. Charles, Illinois. Pp. 176.
23. Rapp, H.J. y T. Borsos. 1970. *Molecular Basis of Complement Action*. Appleton Century, New York. Pp. 238.
24. Ohanian, S.H. y I. Seymour. 1981. Humoral immune killing of complement mediated attack and target cell defense. En: *Critical Reviews in Immunology*. Vol. I. CRC Press, Boca Raton, Florida. Pp. 165.
25. Day, N.K. y R.A. Good (Edit.) 1977. *Comprehensive Immunology*. Vol. II. Plenum Press, New York. Pp. 183.
26. Müller - Eberhart, M.M. 1975. Complement. *Ann. Rev. of Bioch.*, 44: 697.
27. Mayer, M.M. 1978. Complement: past and present. *Harvey Lectures* 72: 139.

28. Kolbw, P., Muller-Eberhard H-J. 1974: Mode of action of human C_{1q} : adsorbtion of multiple C_{1q} molecules to cell bound C_8 . J. Immunol., 113: 479.
29. Allison, A.C. 1975. Immunological surveillance against tumor cells. En: Cancer, A comprehensive Treatise. Becker, F.F. (Edit.). Plenum Press, New York. Pp. 237.
30. Berendt, M.J. y R.J. North. 1980. T cell mediated suppression of anti-tumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. J. Exp. Med., 151: 69.
31. Howell, S.B., J.H. Dean y L.W. Law. 1974. Cell interactions in adoptive immune rejection of a syngenic tumor. Int. J. Cancer, 14: 662.
32. Old, L.J., E.A. Boyse, P.A. Clarke y E.A. Carswell. 1962. Antigenic properties of chemically induced tumors. Ann. N. Y. Acad. Science 101: 80.
33. Waters, H. 1981. The Handbook of Cancer Immunology. Vol. VIII. Garland STPM Press, New York. Pp. 418.
34. Boyse, E.A., L.H. Old y E. Stockert. 1965. The TL (thymus leukemia) antigen: a review. En: Immunopathology, 4th International Symposium. Edit. por Grabar P. y P.A. Miescher. Schwake & Co., Basel.
35. Stackpole, C. y J. Jacobson. 1978. Antigenic modulation. En: The Handbook of Cancer Immunology. Vol. II. Edit. Waters, H., Garland STPM Press, New York. Pp. 55.
36. Hellström, I. y K.E. Hellström. 1969. Studies in cellular immunity and its serum mediated inhibition in Moloney virus induced mouse sarcomas. Int. J. Cancer, 4: 587.

37. Celis, E., A.H. Hale, J.H. Russell y H.N. Eisen. 1979. Cyclical changes in susceptibility of a myeloma tumor (LPC-1) to immune destruction. I. Changes in reactivity with cytotoxic T lymphocytes and anti-H-2^d sera. J. Immunol., 122: 954.
38. Hale, A.H., E. Celis, J.H. Russell y H.N. Eisen. 1979. Cyclical changes in susceptibility of a myeloma tumor (LPC-1) to immune destruction II. Periodic fluctuation during growth in normal and nude mice in culture. J. Immunol., 122: 959.
39. Celis, E., T.W. Chang y H.N. Eisen. 1979. Cyclical changes in susceptibility of a myeloma tumor (LPC-1) to immune destruction III. Periodic production of a cell surface glycoprotein and changes in reactivity with cytotoxic T cells and anti-H-2^d sera. J. Immunol., 122: 2245.
40. Celis, E. y H. N. Eisen. 1980. Interactions between a novel cell glycoprotein and the H-2K and H-2D antigens on myeloma tumor cells. Eur. J. Immunol. 10: 455.
41. Celis, E. 1980. Cellular recognition in tumor immunology: tumor resistance to immune destruction by cytotoxic T lymphocytes. En: Larralde, C., K. Willms, L. Ortiz-Ortiz & M. Sela (Edit.) Molecules, Cells and Parasites in Immunology. Academic Press, New York. Pp. 75.
42. Ohno, S.S., S. Natsa-Ume, y S. Migita. 1975. Alteration of cell surface antigenicity of the mouse plasmocitoma. I. Immunologic characterization of surface antigens masked-during successive transplantation. Natl. Cancer Inst. 55: 569.
43. Tokuyama, H. y S. Miqita. 1978. Cell surface major glycoprotein of Balb/c mouse plasmacytoma 58-8 cells. J. Natl. Cancer Inst., 61: 203.

44. Codington, J.F. 1978. Masking of cell surface antigens by ecto-glycoproteins. En: Glycoproteins & Glycolipids in Disease Processes, American Chemical Society, p. 277.
45. Fridberg, S. 1972. Comparison of an immunoresistant and an immunosusceptible ascites subline from murine tumor TA-3. Transplantability, morphology and some physicochemical characteristics. J. Natl. Cancer Inst., 48: 1463.
46. Sanford, B.H., R.W. Codington, P.D. Palmer. 1973. Transplantability and antigenicity of two sublines of the TA3 tumor. J. Immunol., 110: p 33.
47. Miller, S.C., E.D. Nay y J.F. Codington. 1977. Ultrastructural & histochemical differences in cell surface properties of strain-specific and non-strain specific TA3 adenocarcinoma cells. J. Cell Biol. 72: 511.
48. Celis, E. 1981. Decrease in susceptibility to complement-mediated attack in myeloma tumor cells. Fed. Proc., 40: 358.
49. Fenyo, E.M., E. Klein y K. Swiech. 1968. Selection of an immunoresistant moloney-lymphoma subline with decreased concentrations of tumor specific antigens. J. Natl. Cancer Inst., 40: 69.
50. Dalianis, T., G. Klein y B. Anderson. 1979. Column selection of antigenic variants from tumors YAC lymphoma variants with reduced antigen expression. Immunogenetics, 9: 465.
51. Berke, G., E. McVey y W. Clark. 1981. T lymphocyte mediated lysis. Role of target cells histocompatibility antigens in recognition and lysis. J. Immunol., 127: 782.

52. Bernard, A., L. Bounsell, T. Borsos, R.A. Good, y N.K. Day. 1975. Complement inhibitors released by leukocytes. III. Evidence o a "new" C₁q inhibitor in the supernatants of short term cultures of mouse spleen & thymus cells. J. Immunol. 115: 109.
53. Boyle, M.D., S.H. Ohanian y T. Borsos. 1978. Effect of protease treatment of the sensitivity of tumor cells to antibody-GPC killing. Clin. Immunol. Immunopathol. 10: 84.
54. Schlager, S.I. y S.H. Ohanian. 1979. A role for fatty acid composition of complex cellular lipids in the susceptibility of tumor cells to humoral immune killing. J. Immunol. 123: 146.
55. Schlager, S.I. y S.H. Ohanian. 1980. Tumor cell lipid composition & sensitivity to humoral immune killing. I. Modification y cellular lipid and fatty acid content by metabolic inhibitors and hormone J. Immunol., 154: 626.
56. Schlager, S.I., S.H. Ohanian y T. Borsos. 1978. Correlation between the ability of tumor cells to resist humoral immune attack and their ability to synthesize lipids. J. Immunol. 120: 463.
57. Celis, E. y T.W. Chang (comunicación personal).
58. Takahashi, T., L.S. Old, y E.A. Boyse. 1970. Surface alloantigens of plasma cells. J. Exp. Med. 131: 1326.
59. Tung, J.S., F.W. Shen, E.A. Boyse y E. Fleinsner. 1978. Properties of the PC.1 molecule. Immunogenetics, 6: 101.
60. Trowbridge, I.S., P. Ralph y J.M. Bevan. 1975. Differences in the surface proteins of mouse B and T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 72: 157.

61. Cebra, J.H. y G. Goldstein. 1965. Chromatographic purification of the tetramethylrhodamine immune globulin conjugates and their use in the cellular localization of rabbit γ -globulin polypeptide chains. *J. Immunol.*, 95: 230.
62. Marchalonis, J.J., R.E. Cone y V. Sauter. 1971. Enzymatic iodination aprobe for accesible surface proteins of normal and neoplastic lymphocytes. *Bioch. J.*, 124: 921.
63. Hubbard, A.L. y Z.A. Cohn. 1976. Specific labels for cells surfaces. En: *Biochemical Analysis of Membranes*. Maddy, A.H. (Edit.) Chapman and Hall, London. Pp. 427.
64. Weber, K. y M. Osborn. 1979. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244: 4406.
65. Fairbanks, G., T. Stack y D.F. Wallabach. 1971. Electrophoretic analysis of major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10: 2606.
66. Braun, D.G., Hild, K. y Ziegler, A. (1979) Resolution of immunoglobulin patterns by analytical isoelectric focusing. En: Lefkovits, I., y Pernis, B. *Immunological Methods*. Academic Press, New York. Pp. 461.
67. Longhorne, J. y K.F. Lindhal. 1981. Limiting dilution analysis of precursors of citotoxic T lymphocytes. En: Lefkovits, I., y B. Pernis (Edit) *Immunological Methods*, Vol. II. Academic Press, New York, Pp. 223.
68. Forni, L. 1979. Reagents of immunofluorescence and their use for studying lymphoid cell products. En: Lefkovits, I. y Pernis, B. (Edit.) *Immunological Methods*. Academic Press, New York. Pp. 151.
69. Schumaker, U.N., M.A. Calcott, H.L., Spieldberg, y H.J. Müller-Eberhard. 1976. Ultracentrifuge studies of the binding of IgG of different subclasses to the C_{1q} subunit of the first component of complement. *Biochem.*, 15: 5175.

70. Rappin, A., y M. Berger. 1974. Tumor cell surfaces. General alterations detected by agglutinins. *Adv. Cancer Rev.* 20: 2137.
71. Ohanian, S.H. y T. Borsos. 1977. Killing of nucleated cells by antibody and complement. En: *Comprehensive Immunology*. Vol. II. Day, N.K., y R.A. Good (Edit.). Plenum Press, New York. Pp. 115.
72. Ohanian, S.H., T. Borsos y H.J. Rapp. 1973. Lysis of tumor cells by antibody and complement. I. Lack of correlation between antigen content and lytic susceptibility. *J. Natl. Cancer Inst.*, 50: 1313.
73. Ohanian, S.H. y T. Borsos. 1975. Lysis of tumor cells by antibody and complement. III. Lack of correlation between amount of C_4 & C_3 fixed and cell lysis. *J. Immunol.* 114: 1292.
74. Schlager, S.I., S.H. Ohanian y T. Borsos. 1978. Correlation between the ability of tumor cells to resist humoral immune attack and their ability to synthesize lipids. *J. Immunol.*, 120: 463.
75. Segerling, M.S., S.H. Ohanian y T. Borsos. 1975. Enhancing effect by metabolic inhibitors on the killing of tumor cells by antibody and complement. *Cancer Res.*, 35: 3195.
76. Hoffman, E.M. 1969. Inhibition of complement by a substance isolated from human erythrocytes. II. Studies in the mechanism of action. *Immunochemistry*, 6: 391.
77. Bernard, A., L. Boumasell y R.A. Good. 1976. Complement inhibitor(s) released from leukocytes. II. Evidence that lymphocytes release & produce an inhibitor of C_2 activation. *Cell. Immunol.*, 22: 351.

78. Tompkins, W.A., P. Seth, S. Gee y W.E. Rowles. 1976. Neuramidase reversal of resistance to lysis of Herpes Simplex virus infected cells by antibody and complement. J. Immunol.,116: 489.
79. Sanford, B.H., J.F. Codington, R.W. Geanloz, y P.D. Palmer. 1973. Transplantability and antigenicity of two sublines of TA3 tumor. J. Immunol., 110: 1233.
80. Sanford, B.H., J.F. Codington, R.W. Jeanloz, y T. Osawa. 1975. Immunochemical and chemical investigations of the structure of glycoprotein fragments obtained from epiglycanin, a glycoprotein of the surface of the TA2-Ha cancer cell. Carbohydr. Res.,40: 171.
81. Tokuyama, H. y S. Migita. 1978. Cell surface major glycoprotein of Balb/c mouse plasmacytoma 58-8 cells. J. Natl. Cancer. Inst.,61: 203.