

03062  
2ej.  
13



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA

# Universidad Nacional Autónoma de México

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
BIOMÉDICAS

ENMASCARAMIENTO DE LOS ANTIGENOS DE HISTOCOMPABILIDAD  
H-2 POR LA GLICOPROTEINA gp160 DE UN MIELOMA MURINO

## TESIS

IRMA J. SANCHEZ VARGAS

Maestría en Investigación Biomédica Básica

Año 1988

TESIS CON  
FOLIO DE ORIGEN



## **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.

**JURADO ASIGNADO:**

<b>Presidente</b>	<b>Dr. Armando Gomez Poyou</b>
<b>Vocal</b>	<b>Dr. Ruy Perez Monfort</b>
<b>Secretario</b>	<b>Dr. Juan Pedro Laclette San Román</b>
<b>Suplente</b>	<b>Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay</b>
<b>Suplente</b>	<b>Dr. Raul Mancilla Jiménez</b>

**La tesis se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas y recibió apoyo económico parcial del CONACYT (proyecto PCCBNA-000470) y del Fondo de Estudios e Investigación Ricardo J. Zevada.**

## INDICE.

	Pagina
I. <u>RESUMEN</u>	1
II. <u>INTRODUCCION</u>	3
1. RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL	3
A. Complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).	3
B. Respuesta inmune celular antitumoral	7
2. ANTECEDENTES.	29
III. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	35
1. METODOS GENERALES.	35
A. Ratones	35
B. Lineas tumorales	35
C. Medios de cultivos para celulas	36
D. Marcaje radioactivo ( <sup>125</sup> I) de superficie en celulas tumorales.	37
i. Iodinacion de la superficie celular.	37
ii. Solubilizacion y obtencion del extracto celular.	38
iii. Precipitacion de proteinas celulares por TCA.	38
E. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).	39
i. Tincion Coomasie	39
ii. Tincion de Schiff	39
iii. Tincion de plata	40
iv. Autoradiografia en placa de Rayos X	40
v. Transferencia a papel de nitrocelulosa	41

F. Purificación de las membranas plasmáticas	42
2. PURIFICACION DE ANTIGENOS H-2	42
A. Purificación de inmunoglobulinas por proteína A.	42
B. Purificación de antígenos H-2.	43
i. Preparación de la columna inmunoabsorbente: Acoplamiento de los anticuerpos anti-H-2.	43
ii. Purificación de los antígenos H-2d.	44
iii. Purificación de los antígenos H-2k.	45
3. PURIFICACION DE LA GLICOPROTEINA TUMORAL gp160.	46
4. PREPARACION DEL COMPLEJO LIPOSOMA-gp160-H-2.	47
A. Aislamiento de los liposomas por centrifugación en gradiente de sacarosa.	49
5. INDUCCION DE LINFOCITOS T CITOTOXICOS	51
A. Inducción de una respuesta primaria <u>in vivo</u> .	51
B. Inducción de una respuesta primaria <u>in vitro</u>	51
C. Tratamiento de las células estimuladoras con mitomicina C.	52
D. Inducción de una respuesta secundaria <u>in vitro</u>	54
E. Ensayos de citotoxicidad	54
V. <u>RESULTADOS</u> .	56
1. PURIFICACION DE LOS ANTIGENOS H-2.	56
A. Purificación de las inmunoglobulinas anti-H-2.	56
B. Purificación de los antígenos H-2.	56

2. PURIFICACION DE gp160.	58
3. INDUCCION DE LTC's CON MEMBRANAS PLASMATICAS.	61
4. INDUCCION DE LTC's CPN LIPOSOMAS H-2 Y/O gp160.	64
<b>VI. <u>DISCUSION.</u></b>	<b>73</b>
1. PURIFICACION DE LOS ANTIGENOS H-2 Y DE gp160.	73
2. INCORPORACION DE LAS PROTEINAS A LOS LIPOSOMAS.	74
3. INDUCCION DE UNA RESPUESTA DE LTC's USANDO MEMBRANAS PLASMATICAS.	75
4. INDUCCION DE UNA RESPUESTA DE LTC's USANDO LIPOSOMAS.	76
<b>VII. <u>REFERENCIAS.</u></b>	<b>86</b>

## ABREVIATURAS.

NKs	- Células asesinas naturales
Ig	- Inmunoglobulinas
Ss	- Estreptolisina
Il-1	- Interleucina 1
Il-2	- Interleucina 2
Il-3	- Interleucina 3
Il-4	- Interleucina 4
K	- células asesinas o nulas
AMPC	- 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina
Doc Na	- Deoxicolato de sodio
NP 40	- Nonidet 40
ceq	- equivalentes celulares
LTC's	- Linfocitos T citotóxicos
CMH	- Complejo mayor de histocompatibilidad
Tr	- receptor de la célula T para el antígeno
TCA	- ácido tricloroacético
FMSF	- fenil metilsulfonilfloururo
SDS-PAGE	- Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
TRIS	- [Tris (hidroximetil)aminometano]
ICAM-1	- molécula de adhesión intracelular 1

## I. RESUMEN.

Cuando las células del mieloma murino LPC-1 son crecidas en ascitis muestran una resistencia cíclica a la lisis por linfocitos T citotóxicos (LTC's). Las células cosechadas 4 días después de que haber sido trasplantadas (células tempranas) son lisadas por los (LTC's), pero si las células permanecen en su huesped por más tiempo (células tardías), se hacen progresivamente mas resistentes a la lisis inmune. El fenotipo de resistencia a la lisis es reversible si las células LPC-1 tardías son trasplantadas a un nuevo huesped, puestas en cultivo o tratadas con tripsina.

La resistencia a la lisis de las células tardías por LTC's correlaciona con la producción y acumulación de una glicoproteína de 160 000 d (gp160) rica en ácido sialico en la superficie celular. Esta acumulación ocurre sin que disminuya la cantidad de antígenos H-2<sup>d</sup>.

El objetivo de este trabajo fue el de estudiar si la accesibilidad de los antígenos H-2<sup>d</sup> a los LTC's se encuentra disminuida por la presencia de gp160. Se purificaron los antígenos clase I H-2<sup>d</sup> y H-2<sup>k</sup> asi como la glicoproteína tumoral gp160. Se incorporaron las proteínas en membranas



artificiales (liposomas), variando la cantidad de gp160 con respecto a los antígenos H-2 y se midió la capacidad de estos liposomas para inducir una respuesta de LTC's específicos.

Los resultados mostraron que aquellos liposomas que tienen incorporado H-2<sup>d</sup>, H-2<sup>k</sup>, H-2<sup>d</sup>-gp160 (1:1), H-2<sup>k</sup>-gp160 (1:1) y H-2<sup>k</sup>-gp160 (1:2), son capaces de inducir una buena respuesta de LTC's. En contraste los liposomas que contienen H-2<sup>d</sup>-gp160 (1:2) y H-2<sup>d</sup>-gp160 (1:4) no son capaces de inducir una respuesta de LTC's.

Estos resultados indican que la glicoproteína tumoral gp160, enmascara específicamente a los antígenos H-2<sup>d</sup> del complejo mayor de histocompatibilidad, impidiendo su reconocimiento por parte de las células T citotóxicas, proporcionando a la célula tumoral un mecanismo de escape de la respuesta inmune, permitiéndole crecer y reproducirse en su huésped.

## II. INTRODUCCION.

### 1. RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL.

El concepto de que un organismo posee cierta inmunidad para defenderse contra de la aparición de células malignas fue propuesto por Mac Farlane Burnet (12), en su teoría de la "vigilancia inmunológica". Esta teoría propone que durante la vida de un individuo surgen constantemente células malignas que expresan antígenos específicos, las cuales por lo general son detectadas y destruidas por el sistema inmunológico. La respuesta inmune antitumoral es llevada a cabo principalmente por los linfocitos T citotóxicos (LTC's), aunque algunos otros tipos celulares están también involucrados (ver sección II.1.B). Para llevar a cabo su función lítica los LTC's necesitan reconocer específicamente al antígeno tumoral junto con un antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad. Solo cuando la vigilancia inmunológica falla, se desarrolla los tumores.

#### A. Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

El complejo mayor de histocompatibilidad CMH ha despertado un gran interés durante los últimos años debido, en

parte, al creciente número de funciones relacionadas con la respuesta inmune que le han sido atribuidas (11,55,59,89,96). El CMH llamado H-2 en el ratón, se localiza en el cromosoma 17, mientras que en el humano se designa como HLA y se localiza en el cromosoma 6 (fig. 1) Se trata de un conglomerado de genes que determinan fenómenos tales como:

- La definición de la identidad de un individuo a través de la expresión de antígenos clase I.

- La regulación de la capacidad de respuesta inmune y de su intensidad.

- La modulación de la respuesta inmune mediante la interacción de las células que expresan antígenos clase II.

- La producción de los factores C2 y C4 y el factor B del complemento, así como de algunas enzimas (21-hidroxilasa).

Los genes del CMH se clasifican de la siguiente manera:

- Clase I, que codifican para los antígenos K (H-2K), D (H-2D) y L (H-2L) y los antígenos Qa-2 y Tla .

Los aloantígenos H-2K y H-2D están presentes en la mayoría de las células del organismo y son el producto de genes extremadamente polimórficos, es decir, que existe un gran número de formas alélicas distintas dentro de la misma especie (fig.1)(11,89). Son glicoproteínas membranales

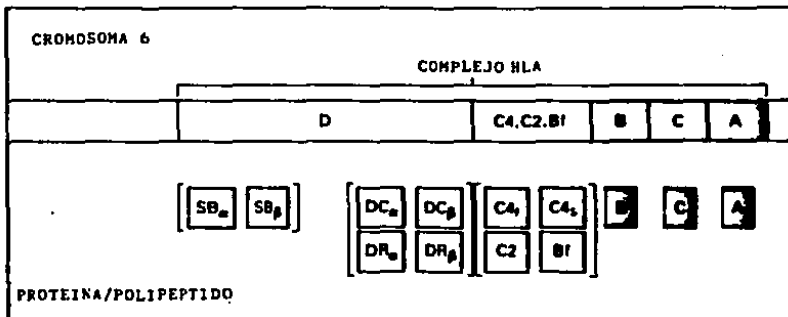
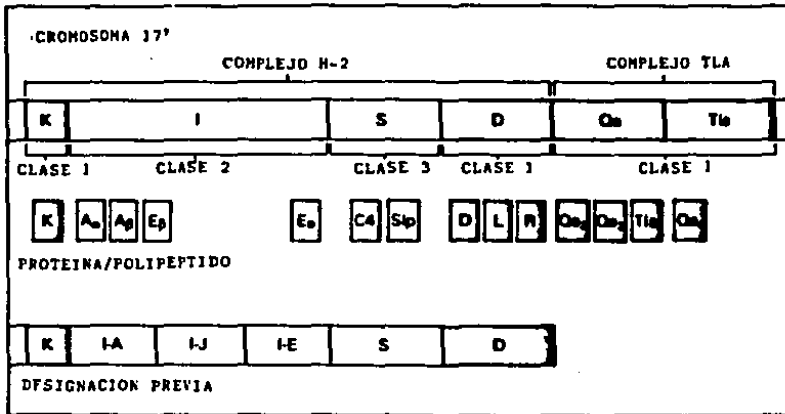


Figura 1. Mapa genético de las regiones del cromosoma 6 humano, del cromosoma 17 murino que codifica para el complejo mayor de histocompatibilidad.

compuestas por dos cadenas polipeptídicas; una cadena pesada de 44,000 dal y una cadena ligera de 12,000 dal, la beta-2-microglobulina asociada en forma no covalente. La porción extracelular de la cadena pesada esta dividida en tres dominios, alfa-1, alfa-2, y alfa-3; cada uno de ellos consta de aproximadamente 90 aminoácidos que son codificados en exones separados.

Investigaciones realizadas recientemente para conocer la estructura terciaria de los antígenos HLA-A2 han revelado que el dominio alfa-3 de la cadena pesada así como la beta-2-microglobulina estan relativamente conservados y muestran homología con las secuencias de los dominios constantes de las inmunoglobulinas. Los dominios alfa-1 y alfa-2 son muy similares en estructura uno con otro, y no son similares a los dominios variables o constantes de las inmunoglobulinas. Ambos constituyen la región mas expuesta de la molécula. A su vez los dominios alfa 3 y la beta-2-microglobulina presentan una estructura terciaria muy semejante. (fig. 2).

Tanto en el CMH humano como en el del ratón hay un complejo oligosacarido unido en la porción N-terminal en el ASN-86 que conecta al dominio alfa-1 con el alfa-2. En el CMH murino se han visto otros sitios de glicosilación (10,11,56,61,80,97,98).

- Clase II, que corresponde a la región I del CMH que consta de 5 subregiones llamadas I-A, I-B, I-C, I-J, e I-E (fig. 1). Sus productos génicos son heterodímeros compuestos

de una cadena alfa de 30,000 d y una cadena beta de 27,000 a 29,000 d. Estas moléculas están involucradas en la regulación de las funciones de las células T supresoras (Ts) y de ayuda (Th) y en el reconocimiento de un antígeno extraño junto con un antígeno propio en la superficie de otras células T, macrófagos y células B (50,61).

- Clase III, que codifican para algunos componentes del complemento (C4) y que controla la expresión de un marcador alotípico dependiente de la testosterona, presente en la proteína Ss (60,86).

#### B. Respuesta Inmune Celular Antitumoral.

En condiciones experimentales se ha podido demostrar que los antígenos tumorales son capaces de inducir una respuesta inmune celular en la que pueden participar células asesinas naturales (38), células asesinas (90), macrófagos activados (34) y linfocitos T citotóxicos (LTC's) (87).

Las células asesinas naturales (NKs) constituyen una población de las células linfoides con actividad citotóxica antitumoral, independiente de anticuerpos y no restringida por antígenos de histocompatibilidad. Estas células presentan los antígenos de superficie: Thy-1 (en ratón), y T3, CD4, CD8 (en

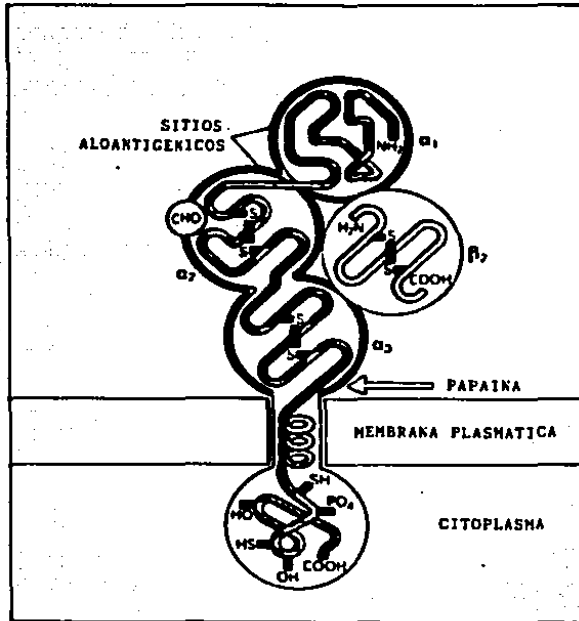


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de una molécula de antígeno clase I (HLA-A,B), incluyendo la asociación con beta-2-microglobulina.

humano), característicos de las células T. Además presentan el receptor para la porción Fc de las inmunoglobulinas, así como los marcadores de superficie Ly6, OKM1 y aloantígenos Qa-2. Se encuentran principalmente en el bazo y en la sangre.

Las células NKs son muy heterogéneas, es decir, diferentes clonas pueden variar en su susceptibilidad a efectos regulatorios por interferón e interleucina 2 (IL-2), y posiblemente en el tipo de célula blanco que lisan (44,45, 92).

El mecanismo de lisis de las células NKs no se conoce, pero se ha propuesto que se lleva a cabo en tres fases:

1. Enlace a la célula blanco, probablemente vía dos receptores.
2. Programación para la lisis. Esta etapa, dependiente de  $Ca^{2+}$ , se caracteriza por una secreción vesicular que modifica a la membrana de la célula blanco.
3. Fase tardía, independiente de la presencia de la célula NK, durante la cual la célula blanco es destruida.

Las células asesinas o nulas (K) son células que no presentan marcadores de T o B. Tienen la capacidad de destruir células tumorales recubiertas de IgG, mientras que son incapaces de destruir las recubiertas con IgA e IgM. Su actividad lítica depende de la expresión del receptor para el



fragmento Fc de la IgG y no requiere inmunización previa ni complemento (fig. 3)(6,25).

Los macrófagos requieren de un proceso de activación para llevar a cabo su función citolítica. Este proceso, puede inducirse in vivo con estimulantes del sistema reticulo-endotelial o in vitro con ciertas linfocinas y endotoxinas, además de algunos mediadores y reguladores de la respuesta inflamatoria, que ayudan a su actividad citolítica y/o citotóxica en contra de algunos tipos de células cancerosas.

Los macrófagos activados se diferencian de los macrófagos normales en que estos presentan mayor cantidad de receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas; su actividad microbicida también se encuentra aumentada así como su tamaño y su capacidad de eliminación de partículas (1,54,86). La activación de los macrófagos es un fenómeno complejo, independiente del antígeno, es decir, el macrófago activado puede destruir a otros antígenos diferentes del que se usa para su activación. Se ha propuesto que la activación de los macrófagos ocurre cuando las células T liberan linfocinas. Este fenómeno favorecería la agregación y proliferación de los macrófagos, dando lugar a la aparición de una masa nodular denominada granuloma, que consiste de células gigantes multinucleadas, células epiteloides y macrófagos activados (92).

Los linfocitos T citotóxicos (LTC's) son los principales responsables de la respuesta antitumoral (84). Los LTC's son células efectoras con la capacidad de destruir otras células que manifiestan estructuras alteradas, ajenas o modificadas. Presentan aloantígenos membranales LyT2 y LyT3 (o su equivalente humano CD4, CD8 y T3), son sumamente específicas y solo atacan células semejantes a las que se utilizaron en su inducción (43).

La activación o estimulación de los LTC's es un proceso complejo que empieza cuando la célula T se encuentra con un agente estimulante (antígeno o mitógeno) que induce su división y diferenciación. Este proceso de activación involucra fenómenos relacionados con las membranas, como son un aumento en la síntesis de fosfolípidos, un aumento en la permeabilidad a los cationes divalentes, una activación de la adenilato ciclasa y consecuentemente una elevación de AMPc. La síntesis de proteínas, RNA y DNA ocurre poco tiempo después. Es este último fenómeno el que finalmente da como resultado la división y diferenciación celular hacia LTC's (86).

Estudios con anticuerpos monoclonales que inhiben el reconocimiento de la célula blanco por la célula T, han revelado recientemente la importancia de varias interacciones moleculares que involucran al receptor para el antígeno de la célula T (TCR), y varias glicoproteínas de su superficie celular, de las cuales las más importantes son:

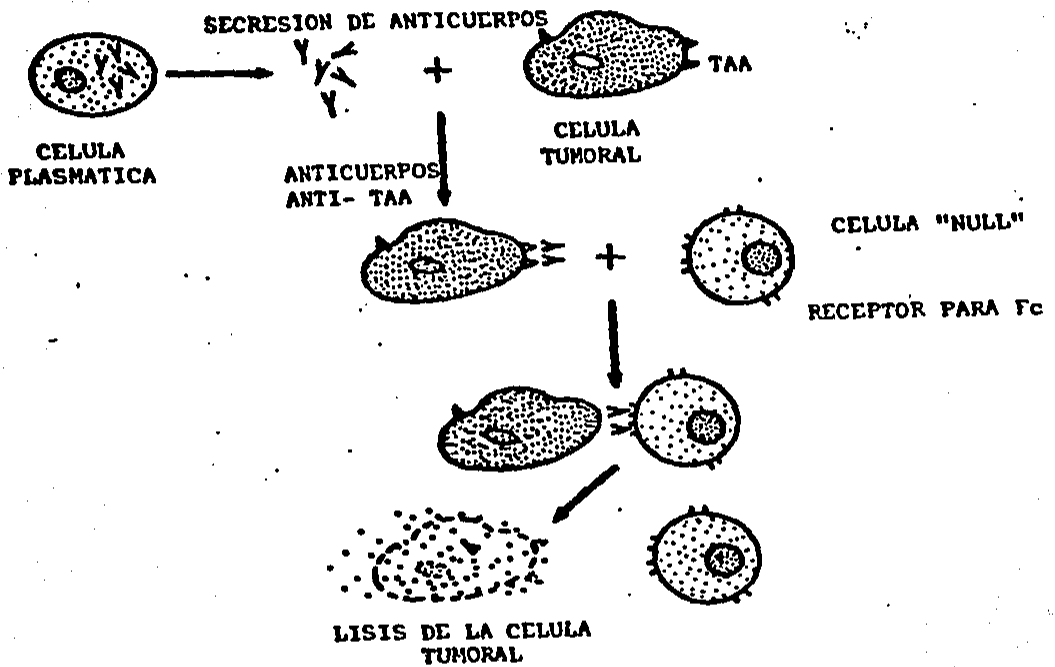


Figura 3. Proceso de citólisis mediada por células dependientes de anticuerpos. Anticuerpos específicos secretados por células plasmáticas se unen al antígeno de la superficie celular de la célula tumoral (TAA). La célula "null" que tiene receptores para Fc enlaza a la porción Fc de la inmunoglobulina que se encuentra asociado a la célula tumoral ocasionando su muerte.

- T8. Es una glicoproteína de 34,000 Dal que se encuentra en forma de dímero, denominada CD8, en el humano y Lyt 2 en el ratón. Las células T CD8<sup>+</sup> están asociadas con actividades citotóxicas y supresoras, aunque se han descrito clonas de células T CD8<sup>+</sup> con funciones ayudadoras (9,94).
  
- T4. Es una glicoproteína de 62,000 Dal, denominada CD4, en el humano y L3T4 en el ratón. Las células T CD4<sup>+</sup> están asociadas con funciones de ayuda, aunque se han descrito clonas de células T CD4<sup>+</sup> con funciones citotóxicas (9,24).
  
- T3. Forma parte del receptor de la célula T para el antígeno (Tr), es una proteína de 20,000 Dal, presente sobre todas las células T maduras. Anticuerpos monoclonales anti-T3 bloquean las funciones de proliferación antigénica y citotóxica de las células T, pero incrementan su susceptibilidad a la proliferación por Il-2. Se cree que esta molécula transmite la señal de activación (9,82).

- LFA-1. Es una glicoproteína que forma parte de la familia de las integrinas; consta de 10 diferentes complejos alfa-beta relacionados estructuralmente. Esta glicoproteína se expresa ampliamente sobre las células de la línea hematopoyética. Está compuesta por una cadena alfa de 180,000 Dal y una cadena beta de 95,000 Dal unidas no covalentemente. La función de LFA-1 como una molécula de adhesión fue definida por la capacidad de anticuerpos monoclonales anti-LFA-1 a inhibir la función de adhesión específica de la célula T (98). Uno de los ligandos de LFA-1 es una molécula denominada de adhesión intracelular 1 o ICAM-1 (69).
  
- CD2. Es una glicoproteína de 40,000 a 50,000 Dal que se expresa sobre todo en los linfocitos T, linfocitos granulares grandes y timocitos. Anticuerpos anti-CD2 inhiben una variedad de funciones de células T, incluyendo la citolisis mediada por LTC's antígeno específicos y la respuesta proliferativa a lectinas, aloantígenos y antígenos solubles (99,102).

Existe una correlación entre el fenotipo de la célula T y la clase de antígeno del MHC que la célula T reconoce. Generalmente las células T CD8<sup>+</sup>, son específicas para antígenos de la clase I del MHC (95), mientras que las células T CD4<sup>+</sup> son específicas para antígenos de la clase II del MHC (24). Esto sugiere que las moléculas CD8 y CD4 son receptores para determinantes no polimórficos de la molécula del MHC clase I y II, respectivamente, mientras que el Tr interacciona con regiones polimórficas de la molécula del MHC, y que la interacción del receptor CD4/CD8 con las regiones constantes del antígeno MHC, aumenta la avidéz funcional de la célula efectora por su blanco, llevando a la activación de la célula T. Cuando el enlace del Tr con el antígeno de la célula blanco es de alta afinidad, la célula depende poco de la interacción con estas moléculas accesorias (fig.4)(92).

En la activación de los linfocitos T ocurre una serie de eventos sincronizados que están regulados por señales transmitidas por receptores de la superficie, lo cual implica una interacción física entre la célula T y la célula presentadora de antígeno. Estas últimas pueden ser células de la serie monocitos/macrófagos que expresan antígenos clase II (Ia), células del endotelio vascular etc.(92).

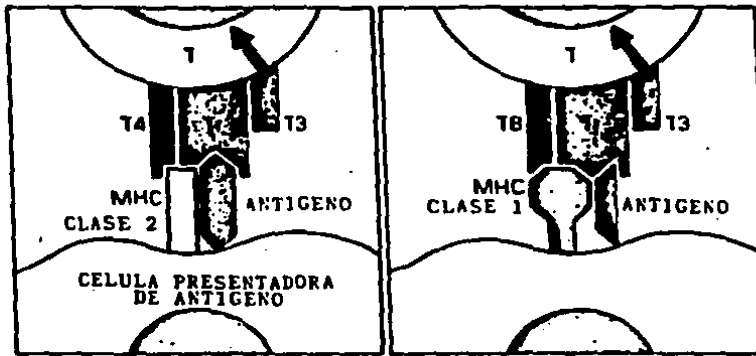


Figura 4. Esquema grafico de la hipótesis para explicar el reconocimiento de la célula T del antígeno. El receptor de la célula T (Tr), reconoce la proteína del MHC y al antígeno. La señal de activación es transmitida a la célula T vía el péptido T3, que se encuentra asociado Tr.

Esta interacción tiene como resultado la inducción de Il-1 e Il-2 (señal 1), pero son necesarias otras señales subsecuentes proporcionadas por monocitos, para iniciar la síntesis de DNA y la mitosis. Esta señal es un producto soluble (posiblemente Il-1), que aumenta la producción de Il-2 y este aumento favorece a su vez una mayor cantidad de receptores para Il-2 (Señal 2). Finalmente, el enlace de la Il-2 con su receptor específico (Señal 3), inicia la síntesis de DNA y la mitosis, teniendo como resultado la formación de LTC's específicos (fig.5)(48,49,76).

Sin embargo, existen reportes en los cuales se muestra que la linfocina del factor estimulante de las células B (BSF-1 o Il-4), también juega un papel importante en la generación de LTC's. Se cree que el BSF-1 actúa como un potente factor ayudador para la generación de CTL's en cultivos primarios mixtos de linfocitos y que induce una actividad citolítica in vitro (11,79,85).

La lisis celular por LTC's requiere del contacto entre una célula efectora viable y una célula blanco y es una función lineal del tiempo de contacto entre ambas células. De los requerimientos metabólicos necesarios para que la célula efectora (LTC) lleve a cabo su función lítica se conoce poco, algunos de ellos se enlistan en la tabla I.



TABLA I. REQUERIMIENTOS PARA LA CITOLISIS MEDIADA POR LTC's.\*

Dependiente de	Independiente de
-La viabilidad de la célula efectora.	La síntesis proteica, DNA o RNA
-Del contacto célula efectora-célula blanco.	Anticuerpo
-Un receptor de la célula T para el antígeno.	Sistema de complemento
-De una red de microfilamentos y microtubulos de la célula efectora.	Síntesis de linfocinas
-Cationes divalente ( $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ ), glucosa.	Metabolismo de la célula blanco.
-Los productos del MHC presentes en la célula blanco y linfocito.	
-Temperatura	

\*Tomada de la referencia (43)

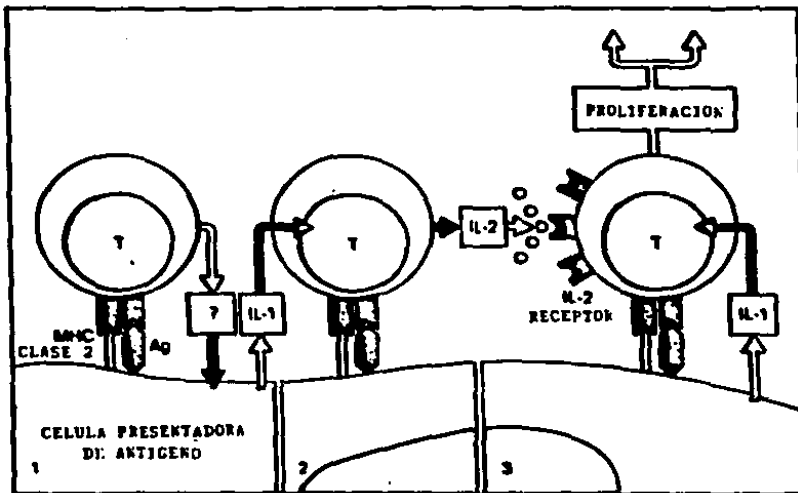


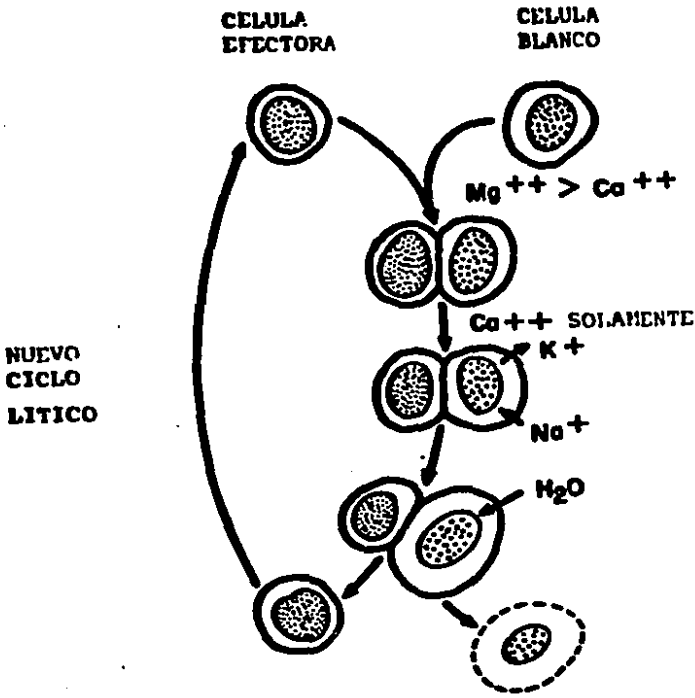
Figura 5. Activación de las células T por la célula presentadora de antígeno (APC). Después del enlace de la célula T a la célula presentadora de antígeno un factor desconocido (?) de la célula T induce la producción de Il-1 (1). Esta, en asociación con la estimulación antigénica induce receptores Il-2 sobre la célula T (3 posiblemente un subconjunto separado del que induce la producción de Il-1) y la células estimuladas a liberar Il-2 (2) llevan a la activación de la célula T.

La célula efectora tiene la capacidad de sobrevivir a la interacción con la célula blanco y puede interaccionar y dañar otras células blanco. Las células blanco tienen un papel completamente "pasivo" en el evento lítico, sirviendo solamente como "presentadoras de antígeno".

En la lisis por linfocitos T citotóxicos se reconocen tres etapas (fig.6):

i. reconocimiento y adhesión.

En esta etapa se incluyen una serie de eventos encabezados por la adhesión de los LTC's a la célula blanco. Para que los LTC's se adhieran a la célula blanco necesitan reconocer específicamente a los antígenos extraños (virales, haptenos sintéticos, etc.) y a los antígenos clase I de la célula blanco (30,31,35,109). Este evento de reconocimiento es necesario para que se lleve a cabo la interacción célula efectora-célula blanco. Se han reportado dos modelos básicos para explicar esta especificidad denominada "restricción por



ETAPA 1: ENLACE

ESPECIFICO

ETAPA 2: PROGRAMACION  
PARA LA LISIS

ETAPA 3: CAMBIOS EN LA  
PERMEABILIDAD DE  
LA MEMBRANA.

DILATACION OSMOTICA

DISRUPCION DE LA  
MEMBRANA, PERDIDA  
DEL CONTENIDO  
CITOPLASMATICO.

Figura 6. Estados de la lisis celular de una célula blanco inducida por una célula T efectora (LTC's).

CMH". El primero de estos propone un solo receptor de la célula T, que esta dirigido contra moléculas codificadas por el CMH que ha sido modificado por su interacción física con los antígenos extraños de la célula blanco y se conoce como modelo del "yo modificado". El segundo modelo propone dos receptores para la célula T, uno para el antígeno extraño y otro para los productos del CMH y se le conoce como modelo del "receptor doble" (43,104).

Los modelos proponen que la célula T citotóxica presenta un receptor que se ajusta específicamente al antígeno de la célula blanco, disparando las siguientes etapas del ciclo lítico. El proceso de adhesión es metabólicamente activo, es dependiente de la temperatura del medio, se inhibe en presencia de azida de sodio, citocalasina B y colchicina, sugiriendo la participación de algunas estructuras del citoesqueleto: microfilamentos y/o microtúbulos (88).

Investigaciones recientes han sugerido que la etapa de adhesión célula-célula se divide a su vez, en dos pasos (71):

Paso 1: independiente de cationes y sensible a citocalasina A y que corresponde al reconocimiento celular.

Paso 2: dependiente de  $Mg^{2+}$ , que corresponde a un paso no específico "reforzador" de la interacción célula-célula.

Estudios con anticuerpos monoclonales que bloquean el reconocimiento LTC-célula blanco han revelado recientemente la importancia de varias interacciones moleculares que involucran directamente al receptor de los LTC's, así como a los antígenos LyT2/T8, L3T4/T4 y LFA-3. Estos últimos antígenos, al parecer actúan aumentando la estabilidad de la interacción célula-célula cuando la unión receptor-antígeno es de baja afinidad (39).

ii. programación para la lisis y/o ataque letal.

Es el siguiente paso al reconocimiento celular incluye una serie de eventos dirigidos hacia la destrucción de las células blanco. Esta etapa fue definida en base a resultados experimentales que mostraron que cuando interaccionan células efectoras con células blanco durante 10 minutos, la remoción de las primeras ya no impide la lisis ulterior de las células blanco. Es decir, que estas habían quedado programadas para la

lisis, proceso que toma varias horas y que no requiere de la presencia de los LTC's. Esta etapa es dependiente de  $Ca^{2+}$  además de que un aumento en los niveles de AMPc linfocitario inhiben la citolisis. Asimismo, algunas prostaglandinas principalmente la E1 y la E2 y algunas drogas como la cloroquina, la monensina e inhibidores de proteasas impiden la citolisis (39,40,70,71).

Después de la adhesión célula efectora-célula blanco y de la programación para la lisis, la célula efectora produce daño a la célula blanco a través de un fenómeno conocido como "Ataque Letal", que se caracteriza por ser unidireccional y localizado (63,107).

El mecanismo de esta acción lítica es prácticamente desconocido. Se proponen cuatro teorías para explicarlo:

a. Secreción de factores solubles del tipo linfotoxina. Al interaccionar el linfocito T con la célula blanco, se liberarían ciertos compuestos que producen un daño regional en la célula blanco. Se ha demostrado que la actividad lítica de la célula efectora puede abatirse sin alterar su capacidad de secretar mediadores solubles (36,42).

b. Conexiones intercitoplásmicas. La célula efectora formaría canales de comunicación a través de los cuales pasarían los compuestos lípidos hacia la célula blanco (95,100). Sin embargo, no se dispone de evidencia que demuestre la formación de este tipo de interconexiones (8).

c. Moléculas citotóxicas enlazadas a la membrana. Estas moléculas se activarían y se orientarían en la superficie de la membrana de la célula efectora, precisamente en la zona de contacto con la célula blanco. Se ha postulado que algunas enzimas del tipo de las fosfolipasas (32), metil-trasferasas y proteasas pudieran llevar a cabo esta función. Una evidencia inesperada que apoya este modelo es la demostración de actividad citotóxica mediada por membranas plasmáticas purificadas de LTC's (Ferluga, et al, 1975).

d. La cuarta teoría también llamada "modelo de exocitosis granular", postula que la interacción de la célula blanco con la célula efectora induce un proceso de secreción que vacía los granulos citoplasmáticos al espacio entre ambas células (39). Esta teoría es la más aceptada ya que se ha encontrado una correlación entre el tipo y cantidad de granulos en los



LTCs, con su capacidad citotóxica. Los gránulos citoplasmáticos de la célula efectora contienen un agente citolítico extremadamente potente (perforina), además de una gran cantidad de enzimas lisosomales no relacionadas con la actividad citolítica (proteoglicanos de chondroitin tipo A y, dos serinas estererasas)(24,72). Hay evidencias experimentales de que los LTC's lisan a la célula blanco mediante la secreción de perforina, que se inserta y polimeriza para formar poros en la membrana de la célula blanco. La perforina es una proteína formadora de poro, con gran homología a la familia de las serinas estererasas, que se encuentra contenida en los granulos citoplasmáticos de los LTC's. Su mecanismo lítico es similar en muchos aspectos a el sistema de complemento en que el daño a la membrana es llevado a acabo por la polimerización de los nueve componentes acompañada por la inserción en la bicapa lipídica y la consecuente formación de canales (72,83).

Además, se ha descrito que la célula efectora sufre un profundo rearrreglo citoplásmico por el cual el aparato de Golgi es desplazado hacia la región de contacto entre ambas células, permitiendo la descarga de los gránulos (39).

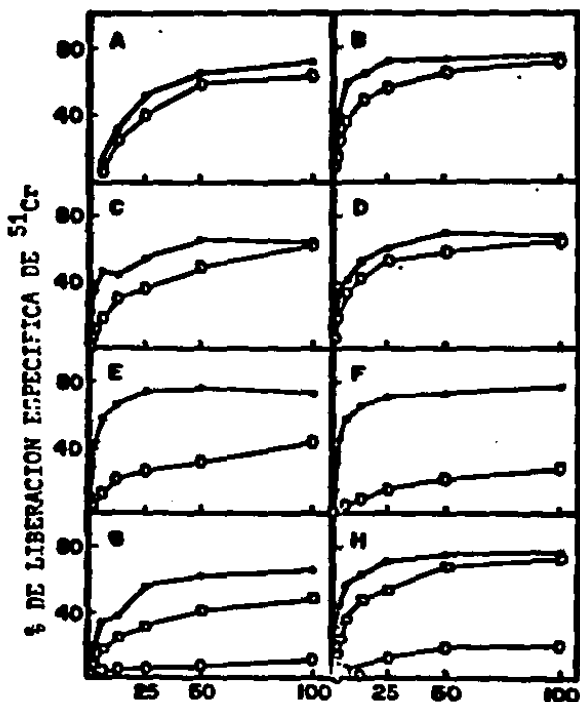
### iii. Destrucción de la célula blanco.

La destrucción de la célula blanco es el resultado final de los eventos descritos anteriormente. Durante esta etapa la célula blanco sufre una serie de cambios en la permeabilidad de su membrana que culminan con la ruptura de la célula. Inicialmente, la lesión solo permite un rápido intercambio de iones inorgánicos y pequeñas moléculas. Poco después tiene lugar la salida de macromoléculas como consecuencia de una regulación osmótica alterada (41). La destrucción final de la célula es ocasionada aparentemente por un desbalance coloidosmótico como consecuencia de la entrada de agua (41,77). Estudios con liposomas expuestos a gránulos de los LTC's, en presencia de  $Ca^{2+}$ , han mostrado la formación de poros de 15 nm de diámetro (mayores que los formados por el complemento) en la bicapa del liposoma. Asimismo, estos estudios han demostrado que las proteínas membranales de la célula blanco no participan en la formación del poro (77).

## 2. ANTECEDENTES.

El mieloma murino LPC-1 crece en forma de ascitis en ratones BALB/c. Se caracteriza por presentar cambios cíclicos en su susceptibilidad al ataque por LTC's. Las células tumorales obtenidas durante los primeros 6 días pos-trasplante (células tempranas), son susceptibles al ataque por los LTC's (Fig. 7A-D). En cambio, si las células permanecen en la cavidad peritoneal por 10-14 días (células tardías), se vuelven resistentes a la lisis por LTC's (Fig. 7F-H) (14). Si las células tardías son trasplantadas a un nuevo huésped, cultivadas in vitro o tratadas con proteasas, se vuelven nuevamente susceptibles al ataque por linfocito T citotóxicos (Fig.8) (15).

La resistencia de las células LPC-1 al ataque por los LTC's o por anticuerpos anti-H-2<sup>d</sup> + C', se ha correlacionado con la acumulación de una glicoproteína membranal con una migración relativa de 160,000 constituida por una sola cadena polipeptídica, rica en ácido siálico, denominada gp160 (Fig. 9)(13,14,37). La resistencia de estas células a la lisis por LTC's va acompañada por una disminución de 6 a 10 veces en la capacidad de reaccionar con anticuerpos anti-H-2<sup>d</sup>, en comparación con las células LPC-1 tempranas o LPC-1 tardías



RELACION EFECTORAS:BLANCO

Figura 7. Cambios con el tiempo en la susceptibilidad de las células LPC-1 a la lisis por LTC's anti-H-2<sup>d</sup>. Las células tumorales son cosechadas e inyectadas a un huésped nuevo. Se muestra la susceptibilidad de las células LPC-1 a la lisis cosechadas cada dos días (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 mostradas en los paneles A, B, C, D, E, F, G, H respectivamente).

○ — ○ Células LPC-1, ● — ● blastos H-2<sup>d</sup>, ◻ — ◻ células LPC-1 retransplantadas (tomada de la ref.13).

tratadas con proteasas. Otros antígenos de superficie, no relacionados con el CMH, no se afectan ya que tanto las células tempranas como las tardías reaccionan igual con anticuerpos dirigidos contra antígenos como PC-1, B220 (15). Por otro lado, las células LPC-1 tardías (resistentes a la lisis) pueden ser rechazadas al trasplantarse en otras cepas alogénicas de ratón (15). Esto sugiere que el rechazo inmunológico del tumor LPC-1 involucra otros mecanismos, tales como el reconocimiento de sus antígenos menores de histocompatibilidad o la producción de complejos inmunes que activen la vía del complemento o que las células LPC-1, en condiciones alogénicas, no expresan gp160.

Lo anterior sugiere al menos dos posibles explicaciones: que las células tardías dejan de expresar antígenos de histocompatibilidad clase I o que, de alguna manera, sean inaccesibles para los anticuerpos anti-H-2 y para los LTC's anti-H-2<sup>d</sup> debido a la gran cantidad de gp160. La primera de estas posibilidades ya fue comprobada y se sabe que la célula LPC-1 tardía expresa la misma cantidad de antígenos H-2<sup>d</sup> en su superficie, que las células LPC-1 tempranas (15).

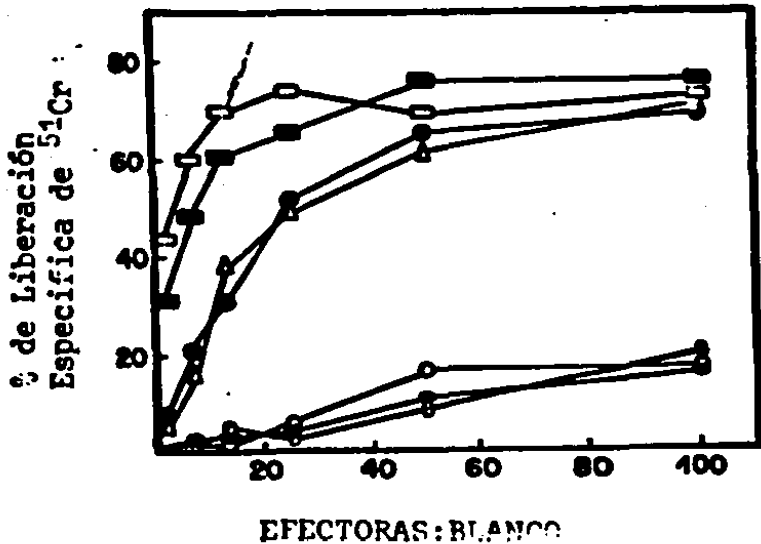


Figura 8. Efecto de diferentes proteasas sobre la susceptibilidad de las células LPC-1 tardías a la lisis por LTC's anti H-2<sup>a</sup>. Las células LPC-1 tardías son tratadas con tripsina (▲—▲), quimiotripsina (◻—◻), subtilisina (◊—◊), proteasa de Staphylococcus (○—○) y trombina (○—○). Las células LPC-1 tempranas no tratadas (○—○) y tardías (●—●) están incluidas (tomada de la ref. 37).

El objetivo de este trabajo es estudiar la capacidad de inducción de una respuesta secundaria de LTC's in vitro por parte de liposomas que tienen incorporada la glicoproteína tumoral gp160 y los antígenos clase I del complejo mayor de histocompatibilidad H-2, para intentar explicar el mecanismo de resistencia a la lisis inmune por parte de las células LPC-1. Para ello se purificaron antígenos clase I, H-2<sup>d</sup> y H-2<sup>k</sup>, así como gp160. Una vez obtenidas estas proteínas se incorporaron a membranas artificiales (liposomas), para evaluar el efecto de la presencia de gp160 sobre la capacidad de los diferentes liposomas para estimular una respuesta de LTC's in vitro. Si las diferentes poblaciones de liposomas son capaces de inducir una respuesta secundaria de LTC's in vitro, esto significaría que los antígenos H-2, no son enmascarados por gp160. Sin embargo, si los liposomas que contienen H-2 más gp160 no son capaces de inducir una respuesta secundaria de LTC's in vitro, esto implicaría que la presencia de gp160 altera la posibilidad de reconocimiento de los antígenos clase I, a través de un enmascaramiento específico.

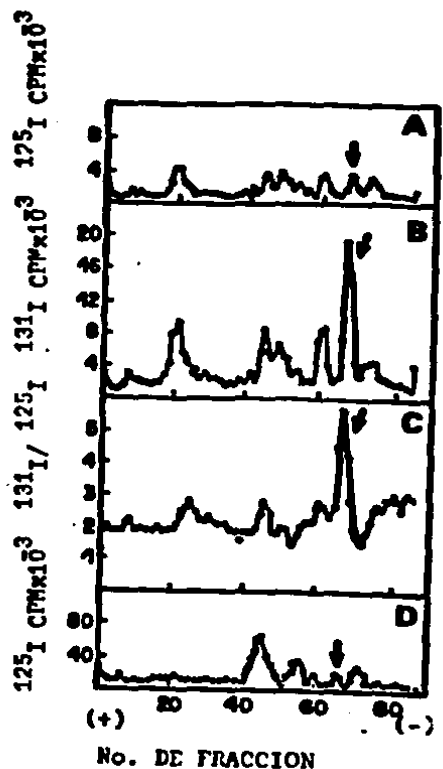


Figura 9. Electroforesis en SDS-PAGE de los componentes radioiodinados de la superficie celular de células LPC-1 tempranas (A), tardías (B), y tempranas mas tardías (C). La mayor diferencia reside en la fracción 65, indicando un aumento en la cantidad de una proteína de P.M. 160,000 en la célula LPC-1 tardías que es eliminada cuando las células son tratadas con tripsina (D) (tomada de la ref. 37).



### III. MATERIALES Y METODOS.

#### 1. METODOS GENERALES.

##### A. Ratones.

Se utilizaron varias cepas de ratones con diferente haplotipos H-2: BALB/c (H-2<sup>d</sup>), DBA/2 (H-2<sup>d</sup>), BALB.k (H-2<sup>k</sup>), BALB/c x DBA/2 F1 (H-2<sup>d</sup>), C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>). Estas cepas son mantenidas y conservadas en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomedicas de la U.N.A.M.

##### B. Lineas tumorales.

Los tumores LPC-1 (H-2<sup>d</sup>,mieloma), P815 (H-2<sup>d</sup>, mastocitoma) y El4 (H-2<sup>b</sup>,timoma), son mantenidos en ascitis en ratones BALB/c, BALB/c x DBA/2 F1 y C57BL/6 respectivamente. Los tumores son trasplantados semanalmente inyectando  $1 \times 10^7$  células por vía intraperitoneal . Los tumores RDM4 (H-2<sup>k</sup>, timoma) y X63-Ag8.653 (H-2<sup>d</sup>, mieloma), así como los hibridomas 34.2.12 (D<sup>d</sup>) y 11.4.1 (K<sup>k</sup>), son mantenidas en cultivo usando medio C (22).

### C. Medios de cultivos para células.

#### i. Medio C.

Todas las células crecidas in vitro son cultivadas en medio RPMI 1640, adicionado con 2 g de bicarbonato de sodio por litro. Cada 100 ml de medio se complementan con: 1 ml de solución de antibióticos 100x (penicilina 100 ug/ml, streptomina 100 ug/ml, GIBCO No.5640), 1 ml de solución antimicótica 100x (anfotericina B, 250 ug/ml, GIBCO No.5295), 1 ml de solución de L-glutamina 200 mM (100x) y 10 ml de suero fetal bovino inactivado por calor (SFB).

#### ii. Medio K.

El cultivo de LTC's se lleva a cabo en medio RPMI 1640 adicionado con 2 g/litro de bicarbonato de sodio. Cada 100 ml de medio se complementan con: 1 ml de solución de antibióticos 100x (penicilina 100 ug/ml, streptomina 100 ug/ml), 1 ml de solución antimicótica 100x (anfotericina B 250 ug/ml), 1 ml de solución de L-glutamina 200 mM (100x), 10 ml de suero fetal bovino inactivado por calor, 1 ml de aminoácidos no esenciales 10 mM (100x), 1 ml de buffer HEPES 10 mM (100X) y beta-mercaptoetanol a una concentración final de 50 uM.

## D. Marcaje radioactivo ( $^{125}\text{I}$ ) de superficie en células tumorales.

### i. Iodinación de la superficie celular.

Las moléculas de la superficie celular se radioiodinaron siguiendo la técnica descrita por Marchalonis (68). En esta reacción los iones iodo son oxidados en presencia de lactoperoxidasa y peróxido de hidrógeno para dar lugar a un complejo enzimático con capacidad para convertir las tirosinas de las proteínas superficiales a derivados moniodados. La histidina también puede ser iodada aunque en menor grado (52).

El alto peso molecular de la lactoperoxidasa (Mr 78 000) excluye su penetración a las células, de tal manera que proporciona un sistema particularmente útil para el marcaje de las proteínas superficiales.

Las células tumorales ( $10^7$ ) obtenidas de ascitis del ratón (con una viabilidad del 95-100 %), lavadas con una solución amortiguadora de fosfatos (SAF =  $\text{PO}_4^{3-}$  10 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.4), son colocadas en presencia de 10 ul de lactoperoxidasa (4 mg/ml SAF) y un mCi de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (New England Nuclear, actividad específica 350-500 mCi/mmol). Después de agregar 10 ul de una solución fresca de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.03 % preparada en SAF y las células son incubadas por 5 minutos a  $30^\circ\text{C}$ . Esto se repite tres veces y al finalizar, las células son lavadas 3 veces con 10 ml de KI 5 mM en SAF, centrifugando cada vez a 450 g durante 5 minutos.

ii. Solubilización y obtención del extracto celular.

Una vez marcadas las células, se hace un extracto celular solubilizando durante 30 minutos a 4°C  $10^7$  células en 100  $\mu$ l de una solución que contiene 0.5 % de Nonidet 40 (NP 40), 0.2 mM de fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), 5 mM de iodoacetamida en SAF; . La fracción soluble se obtiene por centrifugación (Centrifuga Eppendorf) a 14 000 g por 10 minutos, a 4°C (3).

iii. Precipitación de proteínas celulares por TCA.

A 10  $\mu$ l [ $10^6$  equivalentes celulares (ceq)] de extracto celular en NP 40 al 0.5 % se le añaden 10  $\mu$ l de SFB y 3 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10 %. Se incuba 10 minutos a 4°C y se centrifuga a 500 g por 5 minutos. El sobrenadante se deshecha y el precipitado se vuelve a lavar dos veces más con 3 ml de TCA al 10 %, dejando nuevamente incubar por 10 minutos y centrifugando en las mismas condiciones. El precipitado resultante, que contiene a las proteínas celulares coprecipitadas junto con las proteínas del SFB, se resuspende en 1 ml de SAF y se cuenta en un contador para radiaciones gamma (Autologic, Abbot).

E. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

La separación de proteínas por SDS-PAGE se llevo a cabo siguiendo el método de Laemmli (106).

Una vez terminada la electroforesis, los geles se procesan siguiendo alguno de los siguientes métodos:

i. Tinción de Coomasie.

El gel es puesto en colorante de Coomasie (Coomasie Brilliant Blue al 0.06 %, metanol al 30 %, ácido acético al 10 % en agua destilada) durante 20 minutos con calentamiento. Posteriormente se destiñe con varios cambios de una solución de ácido acético al 10 %, metanol al 5 % (65).

ii. Tinción de Schiff.

El gel es fijado en TCA al 12.5 % durante 30 minutos. Posteriormente es sumergido en una solución de ácido periódico al 1 %, ácido acético 3 % durante una hora. El gel es lavado exhaustivamente con agua haciendo cambios cada 30 minutos y se tiñe con el reactivo de Schiff. Las bandas de glicoproteínas aparecen en un período de 3 a 4 horas (72a).

### iii. Tinción de plata.

El gel es sumergido en una solución de alcohol metílico al 50 % y ácido acético al 12 %, por 30 minutos. Posteriormente, es cambiado a una solución de alcohol etílico al 10 %, ácido acético al 5 % por 45 minutos, para después transferirse a una solución de dicromato de potasio 3.4 mM, ácido nítrico 3.2 mM por 10 minutos. El gel es lavado exhaustivamente con agua bidestilada y a continuación se le agrega una solución de nitrato de plata 20 mM y se deja incubar por 30 minutos. El gel es revelado con una solución de carbonato de sodio anhidro 0.28 M con formaldehído (100 ug/100 ml). El proceso de revelado se detiene con ácido acético al 1 % (73).

### iv. Autoradiografía en placas de rayos X.

Los geles conteniendo muestras marcadas con  $^{125}\text{I}$  son secados y puestos sobre una placa de Rayos X, que se mantiene a  $-70^{\circ}\text{C}$  por diferentes tiempos, dependiendo de la cantidad de marca incorporada a la muestra (cinco días con 20,000 c.p.m. por muestra).

v. Transferencia a papel de nitrocelulosa.

El gel de poliacrilamida es lavado exhaustivamente con agua bidestilada para quitar el SDS y colocado sobre un papel de nitrocelulosa que ha sido previamente remojado durante 30 minutos en el buffer de transferencia [tris (hidroximetil) aminometano (TRIS) 0.025 M, glicina 0.193 M, metanol 20 % v/v, pH 8.35]. Las proteínas se transfieren al papel de nitrocelulosa con una corriente de 200 mA por 1.5 horas. Las proteínas inmobilizadas en el papel de nitrocelulosa son detectadas por métodos inmunológicos. Los sitios remanentes en el papel de nitrocelulosa son bloqueados con un exceso de proteína (seroalbumina bovina al 3 % en SAF). El antígeno fijado al papel se detecta utilizando un anticuerpo específico seguido por la adición de un segundo anticuerpo dirigido en contra del primero, conjugado a peroxidasa (91,103). La reacción es revelada con diaminobenzidina 50 mg/100 ml SAF, 0.0015 % de  $H_2O_2$  (concentración final, 50  $\mu$ l de  $H_2O_2$  al 33 %/100 ml). La reacción de revelado se detiene usando agua bidestilada con azida de sodio al 0.2 %.

## F. Purificación de las membranas plasmáticas.

Las células tumorales ( $5 \times 10^7$  células/ml) se resuspenden en solución hipotónica ( $\text{MgCl}_2$  100 mM, NaCl 30 mM, PMSF 0.1 mM, 0.02 % azida de sodio) y se incuban 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Posteriormente son rotas con un homogenizador de tejido (Wheaton 357544), subiendo y bajando el pistón por 20 veces consecutivas a  $4^\circ\text{C}$ . El homogenizado es colocado sobre un colchón de sacarosa al 41 % en tubos de nitrocelulosa y centrifugado a 95.000 g por 2 horas. Se separan las membranas plasmáticas que forman una banda blanca en la interfase del homogenizado y el colchón de sacarosa. Las membranas se lavan una vez más con solución hipotónica y dos veces con SAF a 95 000 g por 20 minutos cada vez. Las membranas se almacenan a  $-70^\circ\text{C}$  o en nitrógeno líquido hasta su uso (51).

## 2. PURIFICACION DE ANTIGENOS H-2.

### A. Purificación de inmunoglobulinas por Proteína A.

La proteína A tiene la propiedad de reaccionar fuertemente con el fragmento Fc de algunas clases de inmunoglobulinas de diferentes especies (53). Una molécula de proteína A puede enlazar al menos 2 moléculas de inmunoglobulina.



Una columna de 5 ml de proteína A acoplada a Sepharosa 4B o Agarosa (MAPS-II, Bio Rad Lab) es lavada con TRIS-HCl 0.1 M, pH 7.95, a una velocidad de flujo de 20-40 ml por hora. Posteriormente se le aplican 500 ml de sobrenadante de cultivo de los hibridomas 34.2.12 (antiH-2<sup>d</sup>) o 11.4.1 (anti-H-2<sup>k</sup>) a 4°C. La columna es lavada con TRIS-HCl, pH 7.95, para eliminar aquellas proteínas que no se pegan a la columna hasta que la absorbancia a 280 nm sea cercana a cero. Las inmunoglobulinas son eluidas con glicina-HCl 0.1 M, pH 3 a la misma velocidad de flujo. El material eluido es colectado en fracciones de 1 ml en tubos que contienen 0.1 ml de TRIS-HCl 1 M, pH 7.95. Las fracciones ricas en proteína son almacenadas a - 70°C hasta ser usadas.

## B. Purificación de antígenos H-2.

i. Preparación de la columna inmunoabsorbente: Acoplamiento de los anticuerpos anti-H-2.

Un gramo de la Sepharosa 4B-CNBr (Pharmacia) se hidrata en 150 ml de HCl 1 mM, durante 15 minutos a temperatura ambiente. La suspensión se filtra por succión y se lava con 1000 ml de agua. La resina húmeda es resuspendida en 10 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M pH 9, NaCl 0.5 M conteniendo 10 mg de

inmunoglobulinas anti-H-2 (H-2<sup>d</sup> o H-2<sup>k</sup>) purificadas (ver Tabla II). La mezcla se agita por 2 horas a temperatura ambiente y 12 horas más a 4°C. Posteriormente, la mezcla se lava sucesivamente con 200 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M, 100 ml de agua, 100 ml de glicina-HCl 0.05 M, pH 9.2, 100 ml de Acetatos 0.1 M, pH 4, NaCl 0.15 M y finalmente, con 100 ml de TRIS-HCl 0.1 M pH 7.95 sucesivamente. La resina húmeda se suspende en TRIS-HCl 0.1 M y se vacía en una columna (5 x 0.9 cm). Por último, la columna se lava con el TRIS-HCl 0.1 M pH 7.95 durante 30 min con una velocidad de flujo de 30 ml por hora, antes de usarse.

#### ii. Purificación de los antígenos H-2<sup>d</sup>.

La columna de Sepharosa 4B-anti-H-2<sup>d</sup> es lavada con NP 40 al 0.25 % en SAF, a una velocidad de flujo de 30 a 40 ml por hora. La cantidad de membranas plasmáticas equivalente a  $1 \times 10^8$  células P815 y una pequeña muestra de las mismas membranas marcadas con <sup>125</sup>I, son solubilizadas con Triton X100 al 1 % por una hora. Posteriormente se centrifugan a 500 g por 15 minutos y al sobrenadante se le agrega NP 40 a una concentración final del 0.5 % en SAF ( $5 \times 10^7$  ceq/ml) y se deja incubar por una hora más. La fracción soluble obtenida por centrifugación a 14,000 g es aplicada a la columna que se deja incubar por 2 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente, la columna es lavada con NP 40-SAF hasta que la radioactividad sea cercana a cero.

La proteína retenida por la columna es eluida con NP 40 al 0.25 % en glicina-HCl 0.05 M, pH 2.9 y colectada en fracciones de 1 ml en tubos que contienen 0.5 ml de TRIS-HCl 1 M, pH 7.9 (74,105). Las fracciones ricas en proteínas se concentran, dializan contra SAF y se les determina su concentración de proteína por el método de Lowry (67). La pureza de los antígenos obtenidos se comprueba por SDS-PAGE al 10 % de acrilamida, tiñendo los geles con nitrato de plata.

### iii. Purificación de los antígenos H-2<sup>k</sup>.

La columna de Sepharosa 4B-anti-H-2<sup>k</sup> (11.4.1) se lava con Triton X-100 al 0.5 % en fosfatos 10 mM, a una velocidad de flujo de 30-40 ml por hora. Un extracto de células RDM4 solubilizadas de la misma manera que las membranas plasmáticas P815 ( $5 \times 10^7$  ceq/ ml) es aplicada a la columna que se deja incubar por 2 horas y se lava con 100 ml de la misma solución seguido de 20 ml de una solución de NaCl 30 mM, 0.5 % de Triton X100 en carbonatos 20 mM o hasta que la absorbancia a 280 nm de las fracciones sea cercana a cero.

El material retenido por la columna es eluido con una solución de NaCl 140 mM; Doc Na al 0.5%, PMSF 0.1 mM en carbonatos 20 mM, pH 8.3 (45,46). El eluido se colecta en fracciones de 2 ml, determinando la concentración de proteína por el método de Lowry (67). La pureza de los antígenos obtenidos se verifica por SDS-PAGE, utilizando geles al 10 % de acrilamida, teñidos con nitrato de plata.

### 3. PURIFICACION DE LA GLICOPROTEINA TUMORAL gp160.

Las membranas plasmáticas de células tumorales LPC-1 tardías son solubilizadas en SAF-Doc Na al 0.5 % ( $1 \times 10^7$  ceq/ml) y aplicadas a una columna de aglutinina de germen de trigo (WGA) acoplada a agarosa (Sigma). La columna se deja incubar 30 minutos a temperatura ambiente y se lava con SAF-Doc Na al 0.25 % hasta que la absorbancia a 280 nm, o la radioactividad desprendida, sea cercana a cero.

La glicoproteína gp160 es eluida de la columna por competencia con N-acetilglucosamina al 10 %, SAF-Doc Na al 0.25 %. El eluido rico en proteína es concentrado y dializado. La concentración de proteína se determina por el método de Lowry (67). La pureza de la glicoproteína eluida se determina por SDS-PAGE en geles al 10 % de acrilamida, teñidos con Schiff, Coomassie y plata.

#### 4. PREPARACION DEL COMPLEJO LIPOSOMA gp160-H-2.

Para la preparación de los liposomas se siguió el procedimiento descrito por Herrmann y Mescher (46), con ligeras modificaciones de acuerdo con otros autores (7,21,26,101,108).

La mezcla de fosfolípidos utilizada contenía 10 mg de fosfatidilcolina, 5 mg de fosfatidiletanolamina y 5 mg de fosfatidilserina, disueltos en 1 ml de cloroformo:metanol 2:1; secados en una atmosfera de nitrógeno. Posteriormente, se le añade 1 ml de SAF-Doc Na al 0.5 % y se agita fuertemente durante 10 minutos. En todos los liposomas preparados se mantuvo siempre una relación de 20 nmol de fosfolípido por cada  $10^7$  ceq de proteína (aproximadamente 11:1 peso:peso).

En el momento de hacer los liposomas se introduce en una membrana de diálisis una alícuota de los lípidos correspondientes a 80 nmoles seguida de las diferentes proteínas que se desean introducir en la membrana lipídica del liposoma y de 0.5 ug de matriz insoluble. La cantidad de antígenos H-2 fue constante en todos los liposomas (10 ug, o sea 0.25 nmoles), así como la cantidad de matriz insoluble. La cantidad de gp160 y de otras proteínas de membrana, libres de gp160 y H-2, fue variable. En las tablas IV y V se anotan las proporciones de estas proteínas, mismas que se varió en función de la cantidad de antígenos H-2.

La matriz insoluble es el residuo insoluble que se obtiene de solubilizar membranas plasmáticas de células P815 o células RDM4 con NP 40 al 0.5 %. Esta compuesta de proteínas membranales de pesos moleculares que van desde 70,000 a 36,000 . Además contiene parte de la actina asociada a membrana (3,62,75). Se agrega 0.5 ug en cada una de las poblaciones de liposomas preparadas, pues se ha demostrado que los liposomas preparados de esta manera son mejores inductores de una respuesta in vitro de LTC's (47).

La mezcla se dializa contra un volumen 2,000 veces mayor de NaCl 140 mM, PMSF 0.1 mM, en TRIS 10 mM, pH 8; con cambios cada 6 horas, durante 3 días. En el último cambio se agrega CaCl<sub>2</sub> 5 mM. La formación de los liposomas se aprecia por el aumento de turbidez de la mezcla.

Una vez formados los liposomas, se centrifugan a 100,000 g por 2 horas . El precipitado (liposomas) se resuspende en 1 ml de SAF y se congela (-70°C)-descongela tres veces antes de usarse. Generalmente se incorpora de un 60 a 70 % de la proteína total a los liposomas (33,46,101).

A. Aislamiento de los liposomas por centrifugación en gradiente de sacarosa.

Inicialmente, este método se utilizó pensando en seleccionar una población homogénea de liposomas que se usara en los experimentos subsecuentes.

Se utilizaron liposomas obtenidos a partir de la mezcla de fosfolípidos descrita anteriormente, sin gp160 ni antígenos H-2. Estos fueron formados en un medio que contenía  $^3\text{H}$ -fucosa, de tal modo que podían ser fácilmente rastreados evaluando la radioactividad en las distintas fracciones del gradiente. La mezcla de liposomas fue aplicada sobre 17.25 ml de un gradiente lineal de sacarosa (5-35 %), con 0.5 ml de un colchón de sacarosa al 50 % en el fondo del tubo. El gradiente es centrifugado por 18 horas a 68,000 g en un rotor Beckman, SW 27. Finalmente, se colectaron fracciones de 0.5-0.6 ml, por medio de un capilar aplicado al fondo del tubo, teniendo cuidado de no alterar el gradiente. La presencia de los liposomas se determina evaluando cada fracción en un contador para radiaciones beta. La concentración de sacarosa se determino con un refractómetro.

Como se observa en la figura 10, el gradiente permite la obtención de 5 poblaciones principales de liposomas, cuya

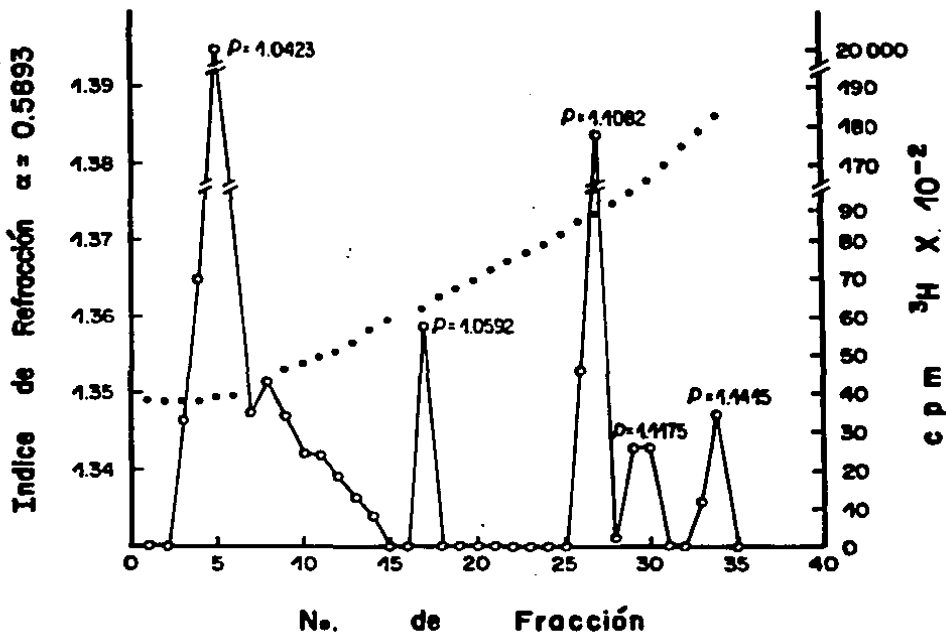


Figura 10. Analisis de las diferentes poblaciones de liposomas. 1 ml de liposomas- $^3\text{H}$ -fucosa se centrifugó sobre un gradiente de sacarosa, analizandose la distribución de las diferentes poblaciones de liposomas marcadas. Densidad de sacarosa, ..... poblaciones de liposomas obtenidos ●—●.



homogeneidad fue evaluada por microscopia electrónica. La única población de liposomas aceptablemente homogénea fue encontrada en una densidad de  $1.0423 \text{ g/cm}^3$  (Fig.11). Resultados similares son reportados por Herrmann y col.(46) quienes obtienen una población de liposomas más o menos homogénea con una densidad aproximada de  $1.03\text{-}1.04 \text{ g/cm}^3$ . Posteriormente se encontró que el procedimiento de congelación-descongelación, descrito anteriormente, era suficiente para obtener una población razonablemente homogénea.

## 5. INDUCCION DE LINFOCITOS T CITOTOXICOS.

### A. Inducción de una respuesta primaria in vivo.

La respuesta alogénica de LTC's inducida inyectando intraperitonealmente  $1 \times 10^7$  células tumorales P815 (H-2<sup>d</sup>), a ratones C57BL/6. Se prueba la actividad citotóxica 20 días después (ver sección III.5.E).

### B. Inducción de una respuesta primaria in vitro.

Se cultivan  $7 \times 10^6$  células de bazo de ratones C57BL/6 (células efectoras) junto con:  $3 \times 10^6$  células tumorales

pretratadas con mitomicina C, membranas plasmáticas de células tumorales ( $1 \times 10^7$  ceq), o con liposomas ( $1 \times 10^6$  ceq) en 1 ml de medio K fresco a  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ . Las células se cosechan al quinto día y se prueba su capacidad lítica y especificidad en los ensayos de citotóxicidad (ver sección III.5.E).

### C. Tratamiento de las células estimuladoras con mitomicina C.

El tratamiento de las células estimuladoras con mitomicina C por el método de Bach & Voynow (40), permite obtener una respuesta unidireccional cuando se mezclan dos poblaciones celulares, debido a que la mitomicina C inhibe la replicación del DNA.

A  $2 \times 10^6$  células/ml en medio C se le adicionan 25 ug de mitomicina C por ml y la suspensión se incuba por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ . Al terminar este período las células son centrifugadas y lavadas 2 veces con SAF frío. Las células mitomizadas se resuspenden a una concentración final de  $10^7$  células/ml en medio K, antes de usarse.

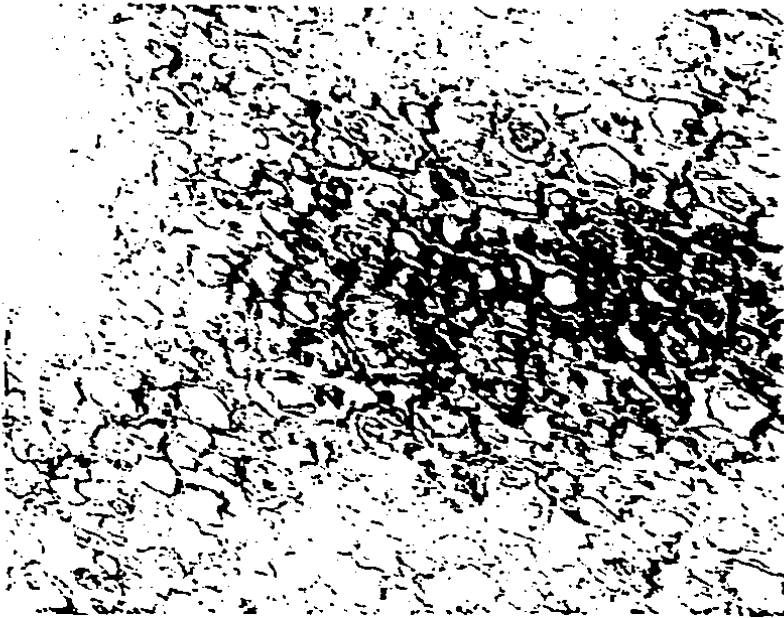


Figura 11. Microscopia electrónica de los liposomas obtenidos a una densidad de  $1.0423 \text{ g/cm}^3$ , (15000 x)

#### D. Inducción de una respuesta secundaria in vitro

Las células efectoras ( $7 \times 10^6$ ) células de bazo de ratones C57BL/6, previamente inmunizados con  $1 \times 10^7$  células tumorales PB15 se cultiva con  $3 \times 10^6$  células tumorales (pretratadas con mitomicina C), con membranas plasmáticas ( $1 \times 10^7$ ) o con liposomas ( $1 \times 10^6$  ceq) en 1 ml de medio K a  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ . Se cosechan al quinto día y se prueba su capacidad lítica y especificidad en los ensayos de citotóxicidad (ver sección III.5.E).

#### E. Ensayos de citotóxicidad.

Las células blanco son marcadas con  $^{51}\text{Cr}$ , incubando  $5 \times 10^6$  células con 250 mCi de  $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$  (New England Nuclear, actividad específica 10-35 mCi/mmol), en medio C durante una hora a  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  (26). Las células marcadas son lavadas 4 veces con SAF frío y se resuspenden a una concentración de  $5 \times 10^4$  células/ml con medio C.

Las células blanco, marcadas con  $^{51}\text{Cr}$ , son colocadas en placas de 96 pozos que contenían cantidades variables de células efectoras. Las relaciones células efectoras:células blanco utilizadas fueron: 25:1, 12:1, 6:1 y 2:1. Se adicionó medio C hasta un volumen final de 200 ul/pozo y se incubaron durante 4 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ . Terminada la incubación, las células son centrifugadas a 100 g por 5 minutos y se toman 150 ul del sobrenadante por pozo para evaluar la radioactividad liberada en un contador gamma (Autologic Abbot) cada punto se hace por duplicado o triplicado. El porcentaje de lisis específica o liberación específica de  $^{51}\text{Cr}$ , se calcula en base a la siguiente formula:

$$\% \text{ de liberación específica} = (\text{Lex} - \text{Les} / 100 - \text{Les}) \times 100$$

donde: Lex= Liberación de  $^{51}\text{Cr}$  por las células blanco en presencia de las células efectoras.

Les= Liberación espontanea de  $^{51}\text{Cr}$  por las células blanco en ausencia de las células efectoras.

## V. RESULTADOS.

### 1. PURIFICACION DE LOS ANTIGENOS H-2.

#### A. Purificación de inmunoglobulinas anti-H-2.

En la Tabla II se describen las fuentes de obtención de las diferentes inmunoglobulinas purificadas, así como su especificidad, y el método seguido para su purificación. Todas las inmunoglobulinas obtenidas se acoplaron a Sepharosa 4B, para formar el inmunoadsorbente específico (anti-H-2).

Los antígenos H-2 clase I (H-2D<sup>d</sup> y H-2K<sup>k</sup>) se purificaron por cromatografía de afinidad con Sepharosa 4B.34.2.12 (anti-H-2<sup>d</sup>) y Sepharosa 4B.11.4.1. (anti-H-2<sup>k</sup>). En el caso de los antígenos H-2<sup>d</sup> la cantidad y pureza de los antígenos obtenidos fueron los factores decisivos para emplear un anticuerpo monoclonal en vez de un antisuero policlonal que existía previamente en el laboratorio (Tabla II).

#### B. Purificación de los antígenos H-2.

Una vez obtenidos los inmunoadsorbentes se prosiguió con la purificación por cromatografía de afinidad de los antígenos

TABLA.II. INMUNOGLOBULINAS ANTI-H-2 PURIFICADAS.

Fuente de obtención	especificidad	Método de purificación.
Suero hiperinmune	H-2d	Proteína A
Sobrenadante de cultivo del hibridoma 34.2.12	Dd	MAPS II
Sobrenadante de cultivo del hibridoma 11.4.1.	Kk	MAPS II

H-2. Los anticuerpos monoclonales provenientes del hibridoma 34.2.12, fueron los que permitieron obtener una mayor cantidad y pureza de antígenos H-2<sup>d</sup>. El perfil de elución obtenidos en la cromatografía se observa en la figura 12.

Se obtuvieron 157.7 ug de antígenos H-2<sup>d</sup>, a partir de  $1 \times 10^9$  ceq de células P815 (Tabla III). Esto equivale al 0.58 % del total de proteína de células P815.

La purificación de los antígenos H-2<sup>k</sup> se llevó a cabo usando un inmunoabsorbente preparado con inmunoglobulinas del hibridoma 11.4.1 anti-H-2K<sup>k</sup>. Se obtuvieron 140 ug de antígenos H-2<sup>k</sup> a partir de  $1 \times 10^9$  ceq de células RDM4 (Tabla III). En ambos casos la pureza de los antígenos obtenidos se verificó por SDS-PAGE utilizando geles al 10 % de acrilamida. Por medio de tinciones de nitrato de plata y de azul brillante de Coomassie, se observó una banda proteica con una migración relativa equivalente a 45,000 Dal y una banda de 13,000 Dal que corresponde a beta-2-microglobulina (Fig.12 y 13).

## 2. PURIFICACION DE gp160.

Para comprobar la pureza de la glicoproteína gp160 obtenida por cromatografía de afinidad en agarosa-WGA (Fig.14), se llevó a cabo una SDS-PAGE utilizando geles al 10 %. Las tinciones de Coomassie y plata no revelaron ninguna banda proteica. Sin embargo, al teñir los geles con el



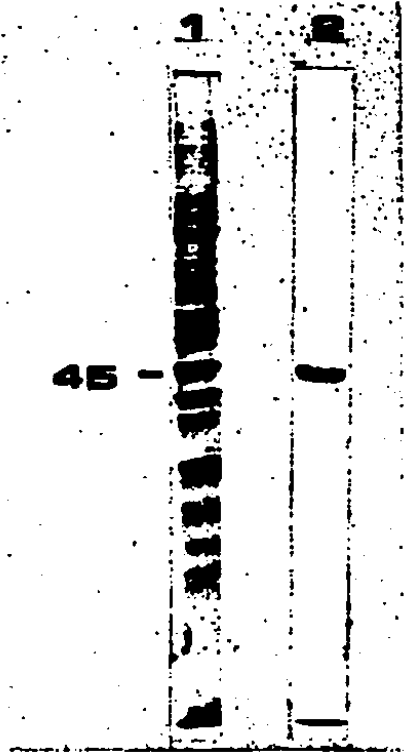
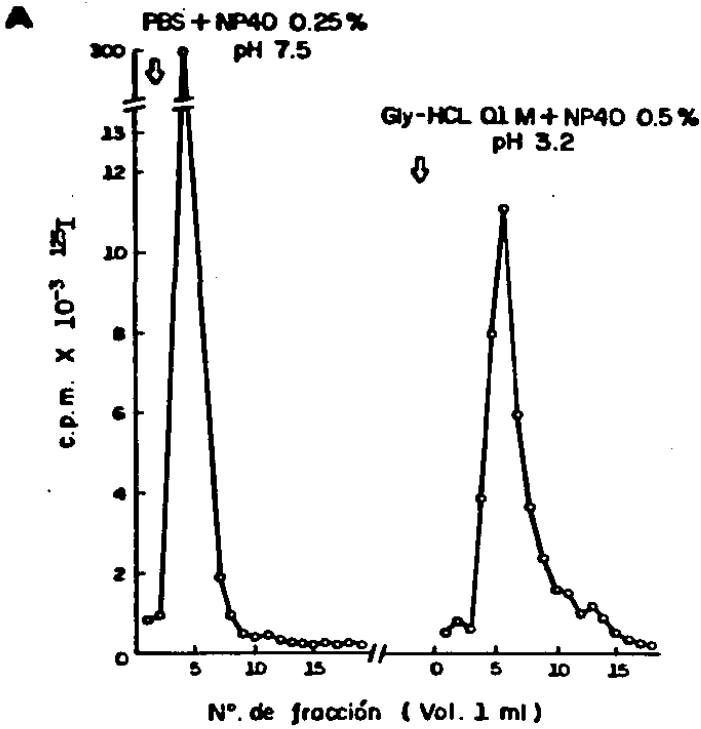


Figura 12. Purificación de los antígenos H-2<sup>d</sup>.  
 A. Perfil de elución de la columna Sepharosa 4B-34.2.12 (anti-H-2<sup>d</sup>).  
 B. Electroforesis en SDS-PAGE: Carril 1, membranas plasmáticas de células P815. Carril 2, antígenos H-2<sup>d</sup>

TABLA III. CANTIDAD OBTENIDA DE ANTIGENOS H-2d, ANTIGENOS H-2k Y gp160.

	H-2d		H-2k		gp160	
	ug	%	ug (1 x 10 <sup>9</sup> ceq)	%	ug	%
Células rotas	27,000	100	20,000	100	47,000	100
Antígenos puros	157.5	0.58	140	0.70	187.4	0.4
-----						
157.4 ug de H-2d	= 21 x 10 <sup>14</sup> moléculas					
140 ug de H-2k	= 19 x 10 <sup>14</sup> moléculas					
187.4 ug de gp160	= 7 x 10 <sup>14</sup> moléculas					

reactivo de Schiff, aparece una sola banda proteica de 160,000 d, aproximadamente (Carril 2, Fig. 14), de tal modo que se puede decir que se cuenta con una preparaci3n muy pura de gp160.

Se obtuvieron 187.4 ug de gp160 (0.4 %) a partir de 777.3 ug de membranas plasmáticas, equivalentes a  $1 \times 10^7$  células tumorales LPC-1 tardías (Tabla III). Esta cantidad de gp160 corresponde al 0.4 % de la proteina total en las celulas LPC-1 tardías.

### 3. INDUCCION DE LTC's CON MEMBRANAS PLASMATICAS.

Antes de llevar a cabo los experimentos con las proteínas puras incorporadas a los liposomas, se realizaron algunos ensayos de inducci3n de LTC's, utilizando membranas plasmáticas de las células P815 o LPC-1 tardías. Se probaron varias concentraciones de membranas a fin de determinar las condiciones óptimas para inducir una respuesta de LTC's con fragmentos subcelulares. La concentraci3n óptima para inducir una respuesta de LTC's fue de 4 ug de membranas, que corresponde a  $1 \times 10^7$  células. En la figura 15, se observa que tanto las membranas plasmáticas de células P815 como las células enteras de la misma línea, son capaces de inducir una

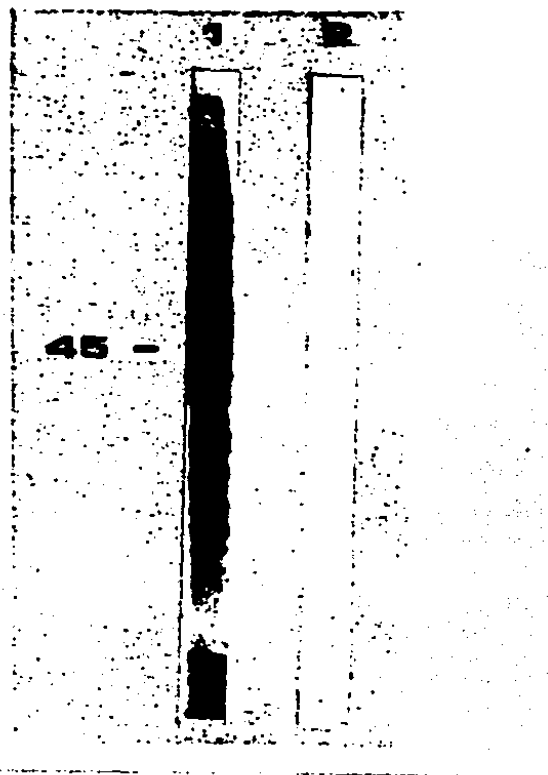


Figura 13. Electroforesis en SDS-PAGE de los antígenos H-2<sup>k</sup> purificados de la columna Sepharosa 4B-11.4.1. Carril 1, extracto celular de células RDM4. Carril 2, antígenos H-2<sup>k</sup>.

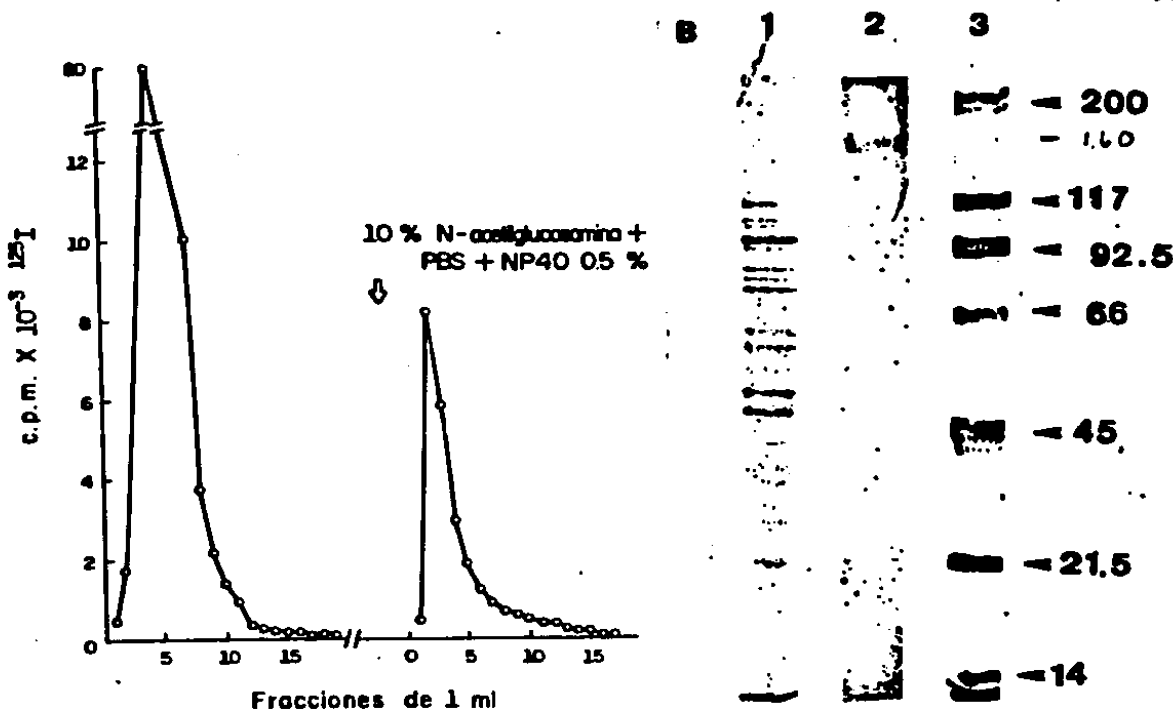


Figura 14. Purificación de la glicoproteína tumoral gp160.

A. Perfil cromatográfico obtenido al pasar un extracto de membranas de células LPC-1 tardías por una columna d Agarosa-WGA.

B. Electroforesis en SDS-PAGE del eluato de la columna d Agarosa-WGA: Carril 1, Membranas de células LPC-1 solubilizadas en DOC Na al 0.5%. Carril 2, Glicoproteína tumoral gp160 purificada. Carril 3, marcadores de peso molecular; 14 kDal lisosima, 21.5 kDal inhibidor de tripsina, 45 kDal ovalbumina, 66 kDal seroalbumina bovina, 92.5 kDal fosforilasa B, 117 kDal beta-galactosidasa, 200 kDal miosina.

buena respuesta de LTC's (75 % de liberación específica de  $^{51}\text{Cr}$ ). En cambio, las membranas plasmáticas de células LPC-1 tardías así como las células enteras de esta línea no son capaces de inducir una respuesta de LTC's (15 % de liberación específica).

#### 4. INDUCCION DE LTC's CON LIPOSOMAS H-2 y/o gp160.

La incorporación de las proteínas a la membrana lipídica de los liposomas ocurre al momento de prepararlos. Para realizar los experimentos, se añadió siempre la misma cantidad de antígenos H-2 puros (H-2<sup>d</sup> y/o H-2<sup>k</sup>). En cambio, la cantidad de gp160 fue variable con el fin de determinar si existe una concentración mínima de la glicoproteína necesaria, para alterar la capacidad de los antígenos H-2 clase I de inducir una respuesta secundaria de LTC's.

Cuando gp160 y los antígenos H-2<sup>d</sup> se encuentran incorporados en la bicapa lipídica del liposoma en una relación molar 2:1, se observa una inhibición total en la capacidad de inducción de LTC's anti-H-2<sup>d</sup> (90 % de inhibición) comparada con la respuesta con liposomas en los que únicamente hay antígenos H-2<sup>d</sup>. En cambio cuando la relación molar

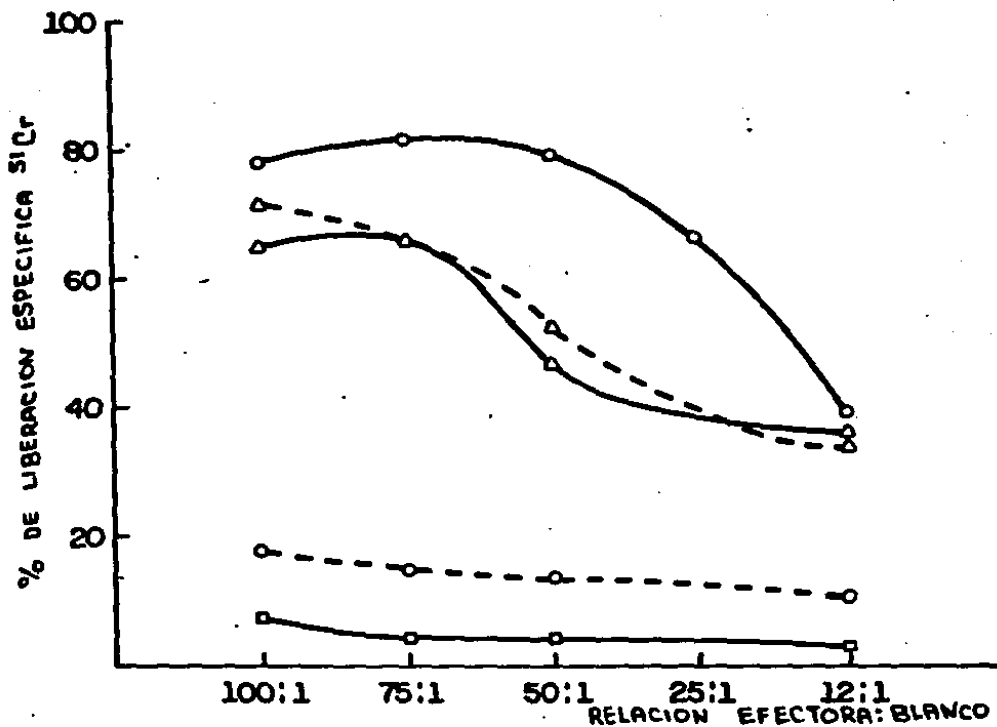


Figura 15. Ensayo de citotoxicidad de: células de bazo de ratones C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) estimuladas con células de bazo de ratones BALB/c (H-2<sup>d</sup>)  $\circ$ — $\circ$  con células LPC-1 tardías,  $\bullet$ — $\bullet$  con células P815  $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$  y con membranas plasmáticas de células LPC-1 tardías  $\circ$ — $\circ$ .

gp160:H-2 era de 1:1: la inducción de LTC's anti-H-2<sup>a</sup> solo fue inhibida en un 19 %, comparada a la respuesta generada con los liposomas-H-2<sup>a</sup> (Tabla IV).

Los liposomas formados con un exceso de proteínas de membrana (libres de H-2 y de gp160) en combinación con antígenos H-2<sup>a</sup> fueron capaces de inducir una respuesta secundaria de LTC's *in vitro* tan eficiente como la obtenida con liposomas que tienen unicamente antígenos H-2<sup>a</sup> (Tabla V). Es interesante notar que si se añade gp160 junto con antígenos H-2<sup>a</sup> y un exceso de proteínas de membranas no se observa inhibición alguna en la capacidad inductora de LTC's anti-H-2<sup>a</sup> por parte de estos liposomas (Tabla V), aun cuando la relación molar de H-2:gp160 era de 1:2.

En resumen, en la Tabla IV, se muestra que gp160 produce una disminución en la capacidad inductora de los liposomas presentadores de H-2<sup>a</sup>. Se requieren dos moléculas de gp160 por cada molécula de H-2<sup>a</sup>, para que se produzca este efecto, a semejanza de lo reportado en células enteras (37). Cuando se utiliza otro tipo de proteína en lugar de gp160, o cuando se utiliza una combinación de gp160 y otras proteínas la capacidad inductora de los liposomas H-2<sup>a</sup> se mantiene (Tabla V).



TABLA. IV. RESPUESTA DE LTC's A LIPOSOMAS QUE TIENEN INCORPORADO H-2d Y/O gp160

Tipo de liposoma	Relación H-2d/gp160/	% de liberación específica 51Cr		
		25:1	5:1	2:1
H-2d	1:0	43	28	22
H-2d/gp160	1:1	35	25	22
H-2d/gp160	1:2	3	1	0
H-2d/gp160	1:4	4	2	0
H-2d + gp160	1:2	30	18	5

Con el fin de probar la especificidad de gp160 hacia los antígenos H-2<sup>d</sup>, se realizaron ensayos semejantes a aquellos descritos en la Tabla IV, pero usando liposomas formados con antígenos H-2<sup>k</sup>. Al igual que en el caso anterior, se probaron diferentes relaciones H-2<sup>k</sup>:gp160; 1:1, 1:2 y 1:0. Como se observa en la Tabla VI, tanto los liposomas que contienen únicamente antígenos H-2<sup>k</sup>, como los que contienen gp160 en una relación de 2 moléculas por cada molécula de H-2<sup>k</sup> son capaces de inducir una buena respuesta de LTC's (50 % de liberación específica respectivamente). Asimismo, los liposomas que presentan otro tipo de proteínas, son también capaces de inducir una respuesta específica de LTC's. Es interesante notar que en el sistema H-2<sup>k</sup> la adición de una gran cantidad de proteínas de membrana, libres de gp160 y H-2, induce una respuesta alogénica de menor grado (30 y 35 % de liberación específica de <sup>51</sup>Cr, o sea 40 y 30 % menor que la respuesta obtenida con liposomas-H-2<sup>k</sup>) que aquella obtenida en el sistema H-2<sup>d</sup>.

Evidencia adicional al respecto de la especificidad de gp160 por H-2<sup>d</sup> se obtuvo de experimentos en los que se usaron liposomas a los cuales se habían incorporado tanto antígenos H-2<sup>d</sup> como antígenos H-2<sup>k</sup>, junto con diferentes cantidades de gp160. Como se observa en la Tabla VII, los liposomas H-2<sup>d</sup>

TABLA V. RESPUESTA DE LTC's A LIPOSOMAS QUE TIENEN INCORPORADO H-2d, gp160 Y/O OTRAS PROTEINAS

Tipo de liposoma	Relación H-2d/gp160/ otras prot.	% de liberación específica 51Cr		
		25:1	5:1	2:1
H-2d/otras prot.	1:0:2	32	20	10
H-2d/gp160/otras prot.	1:1:1	35	22	8
H-2d/gp160/otras prot.	1:1:4	38	25	10
H-2d/gp160/otras prot.	1:2:4	32	18	8
gp160	0:1:0	9	5	2

inducen una respuesta específica anti-H-2<sup>d</sup>. La misma especificidad se observa en el caso de los liposomas H-2<sup>k</sup>. Como es de esperarse, los liposomas que contienen ambas moléculas inducen una respuesta con doble especificidad. En cambio, aquellos liposomas que contienen H-2<sup>d</sup>, H-2<sup>k</sup> y gp160 no son capaces de inducir una respuesta H-2<sup>d</sup> mientras que son capaces de inducir una respuesta anti-H-2<sup>k</sup> comparable a la de los liposomas mixtos que no contienen gp160, y sorprendentemente, a mayor cantidad de gp160, mayor intensidad de la respuesta anti-H-2<sup>k</sup>.

TABLA. VI. RESPUESTA DE LTC's A LIPOSOMAS QUE TIENEN INCORPORADO H-2k Y/O gp160.

Tipo de liposoma	Relación H-2k/gp160/ otras prot.	% de liberación específica 51Cr		
		25:1	5:1	2:1
H-2k	1:0:0	50	45	38
H-2k/gp160	1:1:0	54	40	30
H-2k/gp160	1:2:0	45	40	35
H-2k/otras prot.	1:0:2	30	25	20
H-2k/gp160/otras prot.	1:2:4	35	28	19
gp160	0:2:0	5	3	1

TABLA. VII. RESPUESTA DE LTC's A LIPOSOMAS QUE TIENEN INCORPORADO H-2d Y/O H-2k Y/O gp160.

Tipo de liposoma	Relación H-2d/ H-2k/gp160.	% de liberación específica 51Cr.					
		anti-H-2d 25:1 5:1 2:1			anti-H-2k 25:1 5:1 2:1		
H-2d	1:0:0	54	44	17	8	2	0
H-2k	0:1:0	12	10	6	62	60	48
H-2d/H-2k	1:1:0	41	39	25	63	50	44
H-2d/H-2k/gp160	1:1:1	34	20	15	51	42	20
H-2d/H-2k/gp160	1:1:2	11	8	5	90	85	70

## VI. DISCUSION.

### 1. PURIFICACION DE LOS ANTIGENOS H-2 Y DE gp160.

Para la purificación de antígenos H-2 (H-2<sup>d</sup> y H-2<sup>k</sup>) se escogieron las células tumorales P815 (H-2<sup>d</sup>) y RDM4 (H-2<sup>k</sup>) pues ambas expresan 5 a 10 veces mas antígenos H-2 clase I que otras líneas tumorales (78). Se obtuvieron 157 ug de antígenos H-2<sup>d</sup> por cada 10<sup>8</sup> ceq de membranas plasmáticas de células P815 y 140 ug de antígenos H-2<sup>k</sup> por el mismo número de células enteras RDM4 (Tabla III). La pureza de ambos antígenos es alta pues no se detectaron bandas contaminantes en los geles de poliacrilamida, aun tiñendolos con nitrato de plata que es una tinción que permite detectar cantidades de proteína del orden de nanogramos. Estos resultados son comparables con los reportados por Herrmann y Mescher (46), quienes obtuvieron 15 ug de antígenos H-2<sup>k</sup>, por cada 10<sup>8</sup> ceq de la misma línea celular.

Por otro lado, la cantidad de gp160 obtenida a partir de membranas plasmáticas de células LPC-1 tardías, por medio de cromatografía de afinidad en Agarosa-WGA, fue de 187.4 ug por cada 10<sup>8</sup> células (Tabla III). Datos anteriores obtenidos en el laboratorio para la purificación de gp160 por medio de una

extracción con urea, seguida de varios pasos de purificación (93), fueron los siguientes: 40 ug de gp160 a partir de 57 mg de proteína total presente en un extracto de urea al 1.5 M (equivalentes a  $10^8$  células). Parece claro que el procedimiento de purificación de gp160 utilizado en este trabajo de tesis es mas eficiente que el reportado anteriormente; además de proporcionar una proteína purificada en condiciones menos desnaturalizantes.

Cabe hacer notar que la WGA es una lectina con afinidad por residuos de ácido siálico y N-acetilglucosamina, azúcares que se encuentran abundantemente representados en la porción carbohidrato de gp160 [(20-40 moles de ácido siálico por molécula)(93)].

## 2. INCORPORACION DE LAS PROTEINAS A LOS LIPOSOMAS.

Las glicoproteínas H-2 son facilmente incorporadas a las membranas lipídicas por medio de dialisis del detergente (ver sección III.4), lo cual resulta en la formación de vésiculas unilamelares en las cuales la mayor parte del antígeno se encuentra en las membranas del liposoma (47). Experimentos de inmunofluorescencia indirecta, en los cuales los liposomas fueron puestos a reaccionar con anticuerpos anti-H-2<sup>a</sup>, mostraron que los antígenos se encontraban accesibles sobre la superficie externa de los liposomas (datos no mostrados).



Las relaciones estequiométricas de los antígenos (H-2:gp160) incorporados a los liposomas, fueron de 1:1, 1:2 y 1:4. Estas relaciones fueron seleccionadas considerando que una célula LPC-1 tardía presenta una relación de 1:2, calculada a partir de las cantidades de gp160 y de H-2 obtenidas de un número conocido de células LPC-1 tardías (93). El número de moléculas de antígenos H-2 y gp160 utilizada en la preparación de los liposomas fue calculado a partir del número de Avogadro ( $6.0233 \times 10^{23}$  moléculas/mol) y del peso molecular de las proteínas.

### 3. INDUCCIÓN DE UNA RESPUESTA DE LTC'S USANDO MEMBRANAS PLASMÁTICAS.

Es claro que se necesita un mayor número ( $1 \times 10^7$  ceq) de equivalentes celulares de membranas plasmáticas que de células P815 enteras ( $3 \times 10^6$ ), para inducir una respuesta. Por lo que se puede concluir que las membranas plasmáticas son menos inmunogénicas que las células enteras. Resultados similares son reportados por Burakoff (66). La disminución en la inmunogenicidad de las membranas plasmáticas podría ser el resultado de algún tipo de alteración de las proteínas durante su purificación (66). Es también posible que algunas membranas se encuentren en forma de vesículas invertidas (inside-out), por lo que la cantidad total de proteínas de superficie, accesibles al reconocimiento por las células efectoras, estaría también disminuida.

#### 4. INDUCCION DE UNA RESPUESTA DE LTC's USANDO LIPOSOMAS.

Para determinar la cantidad mínima de liposomas que producen una respuesta secundaria de LTC's, se llevo a cabo una titulación utilizando diferentes cantidades de liposomas con antígenos H-2<sup>d</sup> o H-2<sup>k</sup>. La cantidad mínima para los liposomas con H-2<sup>d</sup> fue de  $1 \times 10^6$  ceq y para los liposomas con H-2<sup>k</sup> fue de  $5 \times 10^6$  ceq. Esta diferencia se puede deberse a que, si bien se obtienen cantidades semejantes de proteína a partir de las células P815 y RDM4, el método de purificación y el grado de desnaturalización resultante es muy diferente: los antígenos H-2<sup>d</sup> se eluyen mediante pH ácido mientras que los antígenos H-2<sup>k</sup> se eluyen de la columna de afinidad utilizando un gradiente de sales (ver secciones III.2.B.ii e iii).

En todos los experimentos de inducción de LTC's se utilizaron liposomas formados en presencia de una matriz insoluble. Se ha propuesto que esta matriz insoluble promueve la formación de liposomas largos e irregulares que favorecen una mayor area de contacto entre el liposoma y la célula respondedora, lo que produce un aumento en su capacidad de

inducir una respuesta de LTC's (47). Además, se piensa que los antígenos H-2 al interaccionar con una o con varias proteínas de la matriz, adquieren una orientación más adecuada en la bicapa lipídica, parecida o igual a la que presentan en la superficie membranal de células intactas (47).

Los liposomas que contienen únicamente antígenos H-2<sup>d</sup> son buenos inductores de una respuesta de LTC's (43 % de liberación específica de <sup>51</sup>Cr), igual que los liposomas que contienen antígenos H-2<sup>d</sup> y gp160 a una relación de 1:1 (Tabla IV). Esta relación es la que prevalece en las células LPC-1 tempranas que son susceptibles al ataque por LTC's (sección II.3). En contraste, los liposomas que contienen H-2<sup>d</sup> y gp160 a una relación 1:2 o de 1:4, no son capaces de inducir una respuesta de LTC's. Esta relación es la que prevalece en las células tardías, que son resistentes a la lisis (II.3). Los liposomas que solo contienen la matriz insoluble o los liposomas con matriz insoluble y gp160 no son capaces de inducir una respuesta de LTC's (Tabla IV).

Estos resultados sugieren que la glicoproteína tumoral gp160 enmascara a los antígenos H-2<sup>d</sup>, proporcionando un mecanismo que permite a las células LPC-1 escapar de la respuesta inmune del huésped. La glicoproteína tumoral gp160 enmascara específicamente a los antígenos H-2<sup>d</sup>, como se observó en los experimentos en los que se usaron liposomas que

contienen antígenos H-2<sup>k</sup> y gp160. En este último caso, se observó que aún la relación de una molécula de antígenos H-2<sup>k</sup> por 2 moléculas de gp160, no impide que los liposomas induzcan una buena respuesta de LTC's anti-H-2<sup>k</sup>: 45 % de liberación específica de <sup>51</sup>Cr (Tabla VI), que es comparada a la liberación obtenida con liposomas que solo tienen H-2<sup>k</sup>. Aunque podría pensarse que por tener menor afinidad por H-2<sup>k</sup> se requeriría mayor número de moléculas de gp160 para proporcionar el mismo efecto de enmascaramiento. Estos experimentos habrán de realizarse posteriormente.

La especificidad del enmascaramiento de H-2<sup>d</sup> por gp160 se confirma con los experimentos realizados con aquellos liposomas que contienen ambos antígenos (H-2<sup>d</sup> y H-2<sup>k</sup>) y gp160. La capacidad de estos liposomas para inducir una respuesta anti-H-2<sup>d</sup> se ve disminuida en un 74 % cuando gp160 se encuentra en una relación 1:2. Sin embargo, la capacidad de los mismos liposomas para inducir una respuesta anti-H-2<sup>k</sup> no se ve afectada, aun cuando gp160 se encuentra en una relación de 1:2. Parece claro que gp160 no enmascara a los antígenos H-2<sup>k</sup>. En ambos experimentos se determinó la capacidad de los liposomas para generar una respuesta cruzada siendo esta menor del 11 % (Tabla VII).

Resultados obtenidos con liposomas que contienen otras

proteínas no relacionadas, además de H-2<sup>d</sup> y de gp160, hacen pensar que se requiere de una asociación muy cercana entre ambas proteínas (Tabla V). Cualquiera que sea la relación H-2<sup>d</sup>:gp160:otras proteínas presente en los liposomas, estos inducen una respuesta alogénica secundaria comparable con la que se obtiene cuando los liposomas contienen H-2<sup>d</sup>:gp160 a una relación 1:1 (35 % de liberación específica de <sup>51</sup>Cr, o sea 19 % de inhibición con respecto a la respuesta generada con los liposomas que solo contienen H-2<sup>d</sup>). Aun cuando la cantidad de gp160 presente en los liposomas es equiparable a la cantidad teórica de las células LPC-1 tardías (H-2<sup>d</sup>:gp160 = 1:2) no se observa una inhibición importante.

En este caso, cabe preguntarse cual es el grado de homogeneidad de la población de liposomas obtenida a través del proceso de diálisis de la mezcla [H-2<sup>d</sup>-gp160-otras proteínas de membrana]. La complejidad de la mezcla es tan grande que no es difícil pensar que hay un número muy grande de poblaciones de liposomas. La probabilidad de que la mayoría de los liposomas tengan incorporados en su bicapa lipídica los componentes de la mezcla [H-2<sup>d</sup>-gp160-otras proteínas de membrana] en las proporciones teóricas es muy baja, no siendo este el caso de los liposomas que contienen H-2<sup>d</sup> y gp160 únicamente. Si bien es cierto que es posible que exista una cierta heterogeneidad en esta población de liposomas, podemos

afirmar sin embargo, que la mayoría de los liposomas de la mezcla presentan ambas proteínas simultáneamente. De no ser necesaria una interacción directa de gp160 con H-2 para llevar a cabo su efecto de enmascaramiento, se podría pensar que si se induce una respuesta de LTC's anti-H-2<sup>d</sup> con dos poblaciones de liposomas (una conteniendo únicamente antígenos H-2<sup>d</sup> y la otra en la que solo se incorporó gp160) agregadas simultáneamente al cultivo, (conservando la relación H-2:gp160 1 a 2) se obtendría una inhibición de la respuesta anti-H-2.

Para confirmar esta posibilidad se llevó a cabo una serie de experimentos cuyos resultados indican claramente que cuando H-2 y gp160 se encuentran en dos liposomas separados no se observa inhibición de la respuesta anti-H-2 (Tabla IV).

Con el fin de determinar si gp160 reconoce una secuencia de aminoácidos determinada en los antígenos H-2D<sup>d</sup> se llevó a cabo la purificación de otros antígenos H-2<sup>d</sup> (D<sup>d</sup>,K<sup>d</sup>) para determinar si gp160 es capaz de enmascarar a estos antígenos.

La purificación de estos antígenos se hizo con un anticuerpo policlonal (Tabla II) obtenido de un suero hiperinmune de ratones BALB.k anti BALB/c (H-2K anti-H-2D). Una vez obtenidos los antígenos H-2D (D<sup>d</sup>,K<sup>d</sup>) se incorporaron a liposomas junto con gp160 y se midió su capacidad de inducción de una respuesta secundaria de LTC's. Los resultados obtenidos

mostraron que los liposomas que tienen incorporado gp160 y antígenos H-2<sup>d</sup> a una relación 1:2, no son capaces de inducir una respuesta de LTC's específicos (10 % de liberación específica de <sup>51</sup>Cr), en comparación con los liposomas que tienen únicamente incorporado antígenos H-2<sup>d</sup>, (63 % de liberación específica de <sup>51</sup>Cr), es decir, gp160 enmascara a los antígenos H-2<sup>d</sup> (D<sup>d</sup> y K<sup>d</sup>).

Estos resultados son una evidencia indirecta de que gp160 probablemente reconoce una secuencia específica en los antígenos H-2<sup>d</sup> para poder llevar a cabo su efecto.

Por otro lado, para determinar si el residuo de carbohidratos de la molécula de gp160 esta involucrado en el enmascaramiento de H-2<sup>d</sup>, se realizaron ensayos de inducción similares a los anteriores, pero utilizando una gp160 tratada con neuraminidasa. Al respecto, se han reportado líneas celulares inmunoresistentes como las LC1, LC2 y el carcinoma mamario Ta3-Ha, en las que los antígenos del CMH son enmascarados por glicoproteínas de alto peso molecular (16). Estas glicoproteínas ricas en ácido siálico, al ser tratadas con neuraminidasa pierden su capacidad de enmascaramiento y por lo tanto las líneas celulares se vuelven susceptibles al ataque por LTC's (16,18,19).

Cabe mencionar que se les ha atribuido a las glicoproteínas de la superficie celular una gran variedad de funciones, como receptores, antígenos, así como para enmascarar o suprimir la actividad antigénica. Recientemente se ha reportado el papel de glicoproteínas con ácido siálico en la regulación de la vía alterna del complemento así como en la activación de la fagocitosis (20,29). Algunas células tumorales tienen la capacidad de modular la expresión de sus antígenos de superficie al entrar en contacto con anticuerpos específicos (58). Los antígenos pueden ser desprendidos en forma de complejos inmunes o simplemente internalizados (16,27). De esta manera, al disminuir o desaparecer los antígenos tumorales de la superficie, las células neoplásicas evaden el ataque inmune del huésped (16). También se han descrito ciertos fibrosarcomas (MC-3 y MG-1) que desprenden cantidades considerables de antígenos tumorales sin requerir interaccionar con anticuerpos (16,23). Estos antígenos reaccionan con los LTC's y con los anticuerpos inhibiendo su actividad lítica (17), así como tumores que tienen la capacidad de perturbar la producción de interleucinas (IL-2, IL-1) por macrófagos o intervenir en la disponibilidad de éstas, impidiendo la amplificación de la respuesta de las células T (92). Otros tipo de tumores tienen la capacidad de expresar



cantidades muy pequeñas de antígenos tumorales que no son detectadas por el sistema inmune (16,58) o de producir un factor denominado factor angiogénico, que inhibe la migración de células del exudado peritoneal y que impide la adherencia del LTC (16,64), o anticuerpos no citotóxicos denominados "bloqueadores" o "facilitadores" (38). Ciertos tumores inducen estados de inmunosupresión en sus huéspedes (2,16), mediante la secreción de moléculas farmacológicamente activas. Uno de los mecanismos posibles es la estimulación de células T supresoras que abaten la respuesta inmune (57).

Con estos antecedentes, no es difícil imaginar que la glicoproteína tumoral gp160 pueda tener otras funciones, aparte de enmascarar a los antígenos H-2<sup>d</sup>. Todas ellas encaminadas a proporcionar un mecanismo de escape a la célula tumoral, permitiéndole crecer y desarrollarse en presencia de una respuesta inmune.

Los resultados experimentales obtenidos a lo largo de este trabajo demuestran que gp160 enmascara específicamente a los antígenos H-2<sup>d</sup> en la superficie de la célula LPC-1. Esto constituye un paso importante en el estudio del comportamiento de las células LPC-1 y de los mecanismos de escape a la respuesta inmune en general, pero aun quedan otras preguntas

por contestar con respecto a este sistema como son :¿Cuales son los factores que inducen a la célula LPC-1 a sintetizar y acumular grandes cantidades de gp160 en su superficie celular?. ¿Cual es el estado inmunológico del ratón portador del tumor LPC-1, a lo largo del ciclo de transplatación?.

No se puede excluir la posibilidad de que gp160 tenga algún efecto sobre las células de la respuesta inmune que a su vez respondan a este "estimulo" mediante la secreción de algun factor soluble. Este último podría ser el responsable de inducir en las células LPC-1 la producción y acumulación de gp160 en su superficie celular para defenderse de la respuesta inmune enmascarando sus antígenos clase I.

Si bien es cierto que gp160 parece enmascarar específicamente a los antígenos H-2<sup>d</sup> en la superficie celular, proporcionando a las células tumorales LPC-1 un mecanismo de escape de la respuesta inmune, datos recientes obtenidos en el laboratorio, han demostrado que gp160 pudiera tener otras funciones biológicas (Gustavo Pedraza, 1986, tesis de licenciatura en Biología. Fac. Ciencias, U.N.A.M.).El disponer de un anticuerpo específico policlonal anti-gp160 permitió identificar la presencia de gp160 no solo en otros mielomas H-2<sup>d</sup> sino que también en células normales de ratones de diferentes haplotipos (H-2<sup>d</sup> y H-2<sup>k</sup>). La glicoproteína tumoral gp160 se encuentra presente en la superficie de células de

bazo estimuladas con LPS (linfocitos B) más no en células de bazo estimuladas con Con A (linfocitos T) o timocitos. En médula osea, fue posible contar un porcentaje alto (aproximadamente 30 %) de células positivas para gp160. Más interesante aún fueron los resultados obtenidos al examinar cortes de embriones de ratón BALB/c de 17 días para identificar la presencia de gp160 ya que se observó una fuerte positividad en muchos tejidos, principalmente en aquellos derivados del ectodermo. Estos datos son preliminares pero demuestran claramente que gp160 no es una glicoproteína únicamente presente en la superficie de las células tumorales y que podría intervenir en diferentes funciones biológicas a lo largo de la ontogenesis y diferenciación celular.

## VII. REFERENCIAS.

1. Adams, D. O. y Marino, P. A. 1981. Evidence for a multistep mechanism of cytolysis by BCG-activated macrophages. The interrelation ship between the capacity for cytolysis, target binding and secretion of cytolysis factor. J. Immunol. 126:981
2. Alder, W., Takigudin, T. and Smith, P. T. 1971. Phytohemagglutinin irresponsiveness in mouse methylcholathrene sarcoma. Cancer Res. 31:864.
3. Apbar, J. P., Herrmann, S. H., Robinson, J. M. and Mescher, M.F. 1985. Triton X-100 extraction of P815 tumor cell: Evidence for a plasma membrane skeleton structure. J. Cell Biol. 100 : 1369.
4. Ashman, R. F. 1984. Lymphocyte activation, En: "Fundamental Immunology", (Paul. E., ed.), Raven Press, New York. p. 267.
5. Awdeh, Z. L., Williamson, A. R., Askonas, A. B. 1968. Isoelectric focusing polyacrilamide gel out its application to immunoglobulins. Nature 219 : 66.
6. Benacerraf, B. and Unanue, E. R. 1979. Tumor immunity. Textbook of Immunology. Ed: Benacerraf, B., Unanue, E.R., Williams, Baltimore, Lond. p.196.
7. Ben de Kruijff. 1987. Polymorphic regulation of membrane lipid composition. Nature. 329 : 587.
8. Biberfeld, P. and Johansson, A. 1975. Contact areas of cytotoxic lymphocytes and target cell: An electron microscopic study. Exp. Cell. Res. 94:79.
9. Bierer, B. E., Mentzer, S. J., Greenstein, L. J. and Burakoff, S. J. 1986. The role of functional cell surface antigens in T cell activation. The year in Immunology 2: 39.
10. Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Strominger, J. L. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. Nature. 329:506.

11. Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Strominger, J. L. 1987. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*. 329:512.
12. Burnet, M. F. 1976. Immunology, aging, and cancer. Medical aspects of mutation and selection. Ed. Freeman. p.129
13. Celis, E., Chang, T. W. and Eisen, H. N. 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.
14. Celis, E., Hale, A. H., Russell, J. H., and Eisen, H. 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<sup>d</sup> sera. *J. Immunol.* 122: 954.
15. Celis, E. and Eisen, H. N. 1980. Interactions between a novel cell glycoprotein and the H-2K and H-2D antigens on a myeloma tumor cell. *Eur.J.Immunol.* 10:455.
16. Codrington, F. J. 1981. The masking of cancer cell surface antigens. En: *The Handbook of Cancer Immunology*. Harold Waters Ed. Vol.8 p. 172.
17. Currie, G. A. 1973. The role of circulating antigen as an inhibitor of tumor immunity in man. *Br.J.Cancer.* 28:153.
18. Currie, G. A. and Bagshawe, K. D. 1968. The role of sialic acid in antigens expression. Further studies of the Landschutz ascites tumour. *Br.J.Cancer.* 22:843
19. Currie, G. A. and Bagshawe, K. D. 1968. The effect of neuraminidase on the immunogenicity of the Landschutz ascites tumour. *Br.J.Cancer.* 22:588.
20. Czop, J. K., Fearon, D. T. and Austen, K. F. 1978. Membrane sialic acid on target particles modulates their phagocytosis by a trypsin-sensitive mechanism on human monocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 75:1971.

21. Darszon, A., Vandenderb, C. A., Schonfeld, M., Ellisman, M.H., Spitzerand, N.C., Montal, M. 1980. Reassembly of protein-lipid-complexes into large bilayer vesicles: Perspectives for membrane reconstitution. Proc.Natl.Acad.Sci. 77(1):239.
22. Davidsohn, I. y Nelson, M. D. 1978. Sangre. En diagnostico clinico por el laboratorio. Davidsohn, I., Henry, J.B. Ed. Salvat. 2a. Edicion. p. 103.
23. Doljanski, F. and Kapeder, M. 1976. Cell surface shedding: the phenomenon and its possible significance. J.Theor. Biol. 62:253.
24. Doyle, C. and Strominger, J. I. 1987. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediated cell adhesion. Nature 330:256.
25. Eisen, H. 1980. Cell surface antigens transfusion, transplation and tumor immunity. 2nd. Ed. Eisen, H. Harper Row. Publishers, Philadelphia.
26. Esko, J. D., Glimore, R. G., Glaser, M. 1977. Use of a fluorescent probe to determine the viscosity of LM cell membrane, with altered phospholipid compositions. Biochemistry 16(9):1881.
27. Esmon, N. C. and Little, J. R. 1976. Different mechanism for the modulation of TL antigens on murine lymphoid cell. J. Immunol. 117:919.
28. Fathman, G. C. 1979. Preparation of mouse antisera against histocompatibility antigens. En: Immunological Methods. Lefkovits, I., Pernis, B. Ed. Academic Press. New York. p.207
29. Fearon, D. T. 1978. Regulation of membrane sialic acid of B1H-dependent decay-dissiciation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. Prc.Natl. Acad. Sci. 75:1971.
30. Fink y Bevan, M. J. 1978. H-2 antigens of the thymus determine lymphocyte specificity. Exp.Med. 138:766.
31. Forman, J. 1975. On the role of H-2 histocompatibility complex in determining the specificity of cytotoxic effector cells sensitized against syngeneic TNP-modified-targets. J.Exp.Med. 142:403.
32. Frye, L. D. and Friov, G. J. 1975. Inhibition of mammalian cytotoxic cells by phosphatidylcoline acid its analogue.

Nature 258:333.

33. Gilmer, P. J., Mc Connell, M. H. and Mc Devitt, V. H. 1978. Insertion of a Ia and H-2 alloantigens into model membranes. Proc.Natl. Acad. Sci. 76:902.

34. 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.

35. Gomrad, E. V., Duprez, T., Reme, T. and Colomban, M. J. 1977.Exclusive involvement of H-2<sup>b</sup> or H-2<sup>d</sup> in viral lymphomas. J.Exp.Med. 146:909.

36. Granger, A. G. and Kolb, W. P. 1968. Lymphocyte in vitro cytotoxicity. Mechanism of immune and nonimmune small lymphocyte mediated target cell destruction. J.Immunol. 101:111

37. Hale, A. H., Celis, E., Rusell, J. H. and Eisen, N. H. 1979. Cyclic immune destruction. III. Periodic production of a cell surface glycoprotein and changes in reactivity with cytotoxic T cell and anti-H-2<sup>d</sup> sera. J.Immunol. 122:2245.

38. Hellstrom, K. E. and Hellstrom, I. 1974. Lymphocyte mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumor antigens. Adv. Immun. 18:209.

39. Henkart, P. A. 1985. Mechanism of lymphocyte mediated cytotoxicity . Ann.Rev. Immunol. 3:31.

40. Henney, C. S. and Lichtenstein, L. M. 1971. The role of cyclic AMP in the cytolytic activity to tumor antigens. Adv. Immun. 18:209.

41. Henney, C. S. and Gaffney, J. and Bloom, B. R. 1974. On the relation of soluble mediators to cell mediated cytotoxicity. J. Exp. Med. 140: 837.

42. Henney, C. S. 1980. The mechanism of T cell-mediated lysis. Immunol. Today. 2:36.

43. Henney, C. S. and Gillis, S. 1984 Cell-mediated cytotoxicity. En: Fundamental Immunology, William, E., Paul,M.D. Editor. Raven Press, New York. p.669

44. Herberman, R. B. and Aoki, H. T. 1979a. Natural killer cells as antitumor effector cells. J.Natl.Cancer. Inst. 62:441.
45. Herberman, R. B., Sjeu Kay, D. H., Ortaldo, J. R., Riccardi, C., Bonnard, G. D. Holden, H. T., Fagnani, R., Santoli, A. and Ducetti, P. 1979b. Natural killer cells: Characteristic and regulation of activity. Immunol.Rev. 44:4370.
46. Herrmann, S. H. and Mescher, F. M. 1981. Lymphocyte recognition of H-2 antigen in liposomes. J.Supramol. Struct.Cell.Biochem. 16:121.
47. Herrmann, S. H., and Mescher, M. F. 1981. Secondary cytolytic T lymphocyte stimulation by purified H-2K<sup>b</sup> in liposomes. Proc. Natl.Acad. Sci. 78 (4):2488
48. Herrmann, S. H., Weinberger, O., Burakoff, S. J. and Mescher, M. 1982. Analysis of two-signal requirement for precursor cytolytic T lymphocyte activation using H-2K<sup>b</sup> in liposomes. J. Immunol. 128:1968.
49. Herrmann, S. and Mescher, M. F. 1986. The requirements for antigen multivalency in class I antigen recognition and triggering of primed precursor cytolytic T lymphocytes. J.Immunol.136:2816.
50. Hood, L., Steinmetz, M. and Malissen, B.1983. Genes of the mayor histocompatibility complex of the mouse. Ann. Rev. Immunol. 1:579.
51. Howard, F. D., Ledbetter, J. A., Mehdi, S. O. and Hersenberg, L. A. 1980. A rapid method for the detection of antibodies to cell surface antigens: A solid phase radioimmunoassay using cell membranes. J.Immunol. Methodos. 38:75.
52. Hubbard, A. L. and Cohn, Z. A. 1976. Specific labels for cells surfaces En: Biochemical analysis of membranes Maddy,A.H. Ed. Chapman and Hall, London. p. 427.
53. Jaton, J., Brandt, D. Ch., Vassalli, P.1979. The isolation and characterization of immunoglobulins, antibodies and their constituent polypeptide chains. En: Immunological methods, Lefkovits,I., Pernis,B. Ed. Academic Press. New York. p.44
54. Johnson, W. J., Whisnant, C. C. and Adams, D. O. 1981. The binding of BCG- activated macrophages to tumor targets stimulates secretion of cytolytic factor. J. Immunol. 127:1787.



55. Katz, D. H. and Benacerraf, B. (Editores) 1974. The role of the products of the histocompatibility gene complex in immune responses. Academic Press. New York. p.780.
56. Kappler, J., et al. 1983. The mayor histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells in mouse and man: Identification of constant and variable peptides. Cell 35:295
57. Kirkwood, J. M. and Gershon, R. K. 1974. A role for supressor T cells in immunological enhancement of tumor growth. Prog.Exp.Tumor. Res. 19:71
58. Klein, J. 1973. Immunological surveillance against neoplasia. Hatvey Lect. 69:71.
59. Klein, J. 1975. Biology of the mouse histocompatibility H-2 complex, Springer-Verlang. New York p.600.
60. Klein, J. 1979. The major histocompatibility complex of the mouse. Science 203:516.
61. Klein, J. Juretic, A., Baxevanis, C. N., Nagy, Z. A. 1981. The traditional and a new version of the mouse H-2 complex. Nature 291:455.
62. Koch, G. L. E., and Smiyh, M. J. 1978. An association between actin and the mayor hitocompatibility antigen H-2. Nature 273:275.
63. Kuppers, R. and Henney, C. S. 1977. IX. Relationships between antigen recognition and lytic expression in killer T-cells. J. Immunol. 118:71.
64. Law, L. W. and Appella, E. 1975. Studies of soluble transplatation and tumor antigens. En: Cancer:A comprehensive treatise. Vol.IV. Editado por F.F. Becker. Plenum Press, New York. p. 135.
65. Lehninger, L. A. 1975. Biochemistry . Worth publishers. Inc. 2a. Ed. p.157.

66. Lemonnier, F., Mescher, M., Sherman, L., Burakoff, S. 1978. The induction of cytolytic T lymphocyte with purified plasma membranes.  
J.Immunol.120:1114.
67. Lowry, H., Rosenbrough, J., Farr, L. and Raandall, J. 1951. Protein measurement with folin-phenol reagent.  
J.Biol. Chem. 143:265.
68. Marchalonis, J. J., Cone, R. E. and Sauter, V. 1971. Enzymatic iodination: a probe for accessible surface proteins of normal and neoplastic lymphocytes.  
Biochem.J. 124:921.
69. Marlin, S. D. and Springer, T. A. 1987. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1).  
Cell 51:813.
70. Martz, E. 1975. Early steps inespecific tumor cell lysis by sensitized mouse T lymphocyte. II. Electrolyte permeability increase in the target cell membrane concomitant with programming for lysis.  
J.Immunol. 117:1023.
71. Martz, E. 1977. Mechanism of specific tumor cell lysis by alloimmune T lymphocyte. Resolution and characterization of discrete steps in the cellular interaction.  
Contemp.Top. Immunobiol. 7:301.
72. Masson, D. and Tschopp, J. 1987. A family of serine estearases in lytic granules in granules of cytolytic T lymphocyte.  
Cell 49:679.
- 72a. Matthieu, J. and Hudson, R. 1973. Quantitative scanning og glycoproteins on polyacrylamide gels stained with periodic acid-Schiff reagent (PAS).  
Anal. Biochem. 55:313.
73. Merrill, C. R., Goldman, D., Sedman, H. S. Eberl, M. H. 1981. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebro-spinal fluid proteins.  
Science 211:1437.
74. Mescher, M. F., Stallcup, K. C., Sullivan, C. P. Turkewitz, A. P. and Herrmann, S. H. 1979. Purification of murine MHC antigens by monoclonal antibody affinity chromatography.  
Methodos in Enzymology 92:86.

75. Mescher, M. F., Jose. M. J. L. and Balk, S. P. 1981. Actin containing matrix associated with the plasma membrane of murine tumor and lymphoid cells. Nature 289:139.
76. Mever, S., Haver, M. 1986. Definition of discrete signals involved in human cell activation. Mol. Immunol. 23(11):1157.
77. Millard, B. R., Henkart, P. J. et al. 1984. Lipoosomes as targets for granule cytolysis from cytotoxic LGL tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 5551.
78. Muramatsu, T. and Natheson, S. G. 1970. Studies on the carbohydrate portion of membrane-located mouse H-2 alloantigens. Biochem 9 (25):4875.
79. Nabholz, M. and MacDonald, H. R. 1983. Cytolytic T lymphocyte. Ann. Rev. Immunol. 1:273.
80. Natheson, S. G. and Cullen, S. E. 1974. Biochemical properties and immunochemical genetic relations of mouse H-2 alloantigenetic relations. Biochem. Biophys. Acta. 344:1.
81. Oettgen, H. F. 1987. Host defense against cancer. Memoria Sloan-Kettering cancer center, New York, N.Y. p 309.
82. Oettgen, H. C., Terhorst, C. 1987. The T-cell receptor-T3 complex and T-lymphocyte activation. Human Immunology 18: 187.
83. Ostergaard, H. L., Kane, P. K., Mescher, M. F. and Clark, R. W. 1987. Cytotoxic T lymphocyte mediated lysis without release of serine esterase. Nature 330: 71.
84. Palladino, M. A., Old, L. J. and Oettgen, H. F. 1982. In vivo inhibition of mouse leukemia by cytotoxic T-cell clones and exogenous I1-2. Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol. 41:406.
85. Paul, W. E. and Ohara, J. 1987. B-cell stimulatory factor-1/Interleukin 4. Ann. Rev. Immunol. 5:429.
86. Perkins, A. H. 1980. El complejo mayor de histocompatibilidad del humano. En: Fudenberg, H.H., Stites, P.D., Caldwell, J.L., Wells, V.J. Inmunologia Clinica. 2a edicion. Ed. Manual Moderno. p.181-192.

87. Perlam, P., Perlam, H., and Wigzel, H. 1972. Lymphocyte mediated cytotoxicity in vitro: induction and inhibition by humoral antibody and nature of effector cells. Transpl.Rev. 13:91.
88. Plaut, M., Bubbers, J. E., Henney, C. S. 1976. Studies on the mechanism of lymphocytes-mediated cytotoxicity. VII. Two stages in the T-cell mediated lytic cycle with distinct requirements. J. Immunol.116:150.
89. Ploegh, L. H., Orr, H. T. and Strominger, J. L. 1981. Major histocompatibility antigens. The human (HLA-A,-B,-C) and murine (H-2K,H-2D) class I molecules. Cell 24:287.
90. Price, M. R. and Baedwin, R. W. 1975. Immunobiology of chemically induced tumors. En: Cancer:Comprehensive Treatise. Vol. IV. Edited por F. F. Becker. Plenum Press.New York. p.259.
91. Reiser, R. and Wardale, J. 1981. Immunological detection of specific proteins in total cell extracts by fractionation in gels and transfer to diazo-phenylthioether paper. Eur.J.Biochem. 114:569.
92. Roitt, Y., Brostoff, J., Male, D. K. 1985. Immunology. Ed: Gower Medical Publishing, London, New York. p. 11.1- 11.11, 18.1- 18.15.
93. Rosenstein, Y., Theelen, M., Sanchez, I., and Celis, E. 1985. Isolation, purification and characterization of a mouse plasmacytoma cell surface glycoprotein involved in the resistance of the tumor cells to immune destruction. J.N.C.I. 74 (3):609.
94. Rosentein, Y., Ratnotsky, S., Burakoff, S.J. and Herrmann, S.H. 1988. Purified CD8 will bind to purified HLA class I antigens. Direct evidence for a receptor-ligand interaction involved in cell-cell adhesion using artificial membranes.  
Sometido para su publicacion
95. Selin, D., Wallach, D. F. H. and Fischer, H. 1971. Intercellular communication in cell-mediated cytotoxicity. Fluorescein transfer between H-2<sup>d</sup> target cells and H-2<sup>b</sup> lymphocytes in vitro. Eur.J. Immunol. 1:453.
96. Shreffler, D. C. and David, S. C. 1974. The H-2 major histocompatibility and the I immune response region: genetic variation, function and organization. Adv. Immun. 20:125.

97. Silver, J. and Hood, L. 1974. Detergent solubilized H-2 antigens is associated with a small molecular weight polypeptide.  
Nature 249:764.
98. Soloski, M. J., Uhr, J. W., Flaherty, L. V., Vitetta, E. S. 1981. Ga-2, H-2K and H-2D alloantigens evolved from a common ancestral gene.  
J.Exp.Med. 153:1080.
99. Springer, T. A., Dustin, M. L. Kishimoto, T. K. and Marlin, S. D. 1987. The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: Cell adhesion receptors of the immune system.  
Ann. Rev. Immunol. 5:223
100. Sura, S. N., Khordkaya, Y. V., Kadashidze, A. G., Foks, B. B. 1967. Cytochemical study of interaction between lymphocytes and targets cells in tissue culture.  
Exp. Cell. Res. 48:656.
101. Szoka, F. and Papahadjopoulos, D. 1978. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase evaporation.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 75:4198.
102. Takai, Y., Reed, L. M., Burakoff, S. J. and Herrmann, S. H. 1987. Direct evidence a receptor-ligand interaction between the T-cell surface antigen CD2 and lymphocyte-function-associated antigen 3.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 6864.
103. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 76:4350.
104. Wagner, H., Pfizenmaier, K. and Rollinghoff, M. 1980. The role of the major histocompatibility gene complex in murine cytotoxic T cell responses.  
Adv. Can. Res. 31: 77.
105. Walker, L. E. and Reisfeld, R. A. 1982. Human histocompatibility antigens: Isolation and chemical characterization.  
J.Immunol. Meth. 49:R25.
106. Weber, K., and Osborn, M. 1979. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis.  
J.Biol. Chem. 244:4406.

107. Wei-Zen, W. and Lindquist, R. R. 1981. Alloimmune cytolytic T lymphocyte activity. Triggering and expression of killing mechanism in cytolytic T lymphocytes. J. Immunol. 126:513.

108. Yasuda, T., Dancey, F. G. and Kinsky, S. C. 1977. Immunogenicity of liposomal model membranes in mice. Dependence on phospholipid composition. Proc. Natl. Acad. Sci, 74 (3) 1234.

109. Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C. 1975. H-2 compatibility requirement for T-cell mediated lysis of target cells infected with lymphocyte choriomeningitis virus. J. Exp. Med. 141:1427.