



UNIVERSIDAD LA SALLE  
ESCUELA DE QUÍMICA  
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

300627

36

“GENERACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL PARA EL  
ESTUDIO DEL PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN  
DE LISOZIMA A CÉLULAS  
INMUNOCOMPETENTES”

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA  
P R E S E N T A  
CATERINA RODRÍGUEZ VENTURELLI

ASESOR DE TESIS:  
Q.F.B. JOSÉ ANTONIO GARCÍA MACÍAS

MEXICO, D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Este trabajo fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Investigación en Inmunobiología Médica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, bajo la asesoría externa del Dr. José Moreno Rodríguez, Jefe del Departamento de Reumatología y de la Unidad de Investigación en Reumatología e Inmunobiología.**

A ti Dios, por estar a mi lado en todo momento,  
por esta vida que de intensos matices y tenues  
melodías es y será por siempre tuya.

A mis padres, por sus inmensos sacrificios e  
infinita paciencia, en especial a mami, la mejor mamá  
del mundo, por quien soy como soy y cuanto soy.

Patiti, por ser la única persona que siempre me  
ha amado **exactamente** tal como soy, por tu  
incondicional apoyo, paciencia y comprensión, sin el  
que muchas cosas ahora **no** serían como son (ya no  
te pongo más cosas, porque entonces no dejaría  
mucho espacio para la tesis...).

J. François, mon gosse, mon frangin, mon pote,  
mon copain... por tu gran amistad y porque tu y  
mettais du temps, du talent et du coeur... loin des  
beaux discours, de grandes théories... on pouvait dire  
de toi, tu changeais la vie.

A todos los que me brindaron su amistad en el (los) laboratorio(s), empezando por el Dr. Moreno, quien creyó en mi y me dió una valiosa oportunidad, y sobre todo a Alex por compartir todo lo bueno y todo lo malo, y demostrando que la verdadera amistad puede llegar más de una vez y el día menos esperado.

A todos los profesores que me enseñaron algo más que una materia, como el Prof. Ricardo Tenorio en la prepa y en la universidad al Dr. José Domingo y al Q.F.B. Enrique Calderón, por las gratas charlas, los sabios consejos y por su mano sincera. Y por supuesto al Q.F.B. José Antonio G. M. (Joe), que siempre estuvo ahí para escucharme y orientarme, que siempre transmitió sus conocimientos con la esperanza de que amáramos la ciencia tanto como él, que por esto y más, sin saberlo cambió mi vida.



Y en general a todos los que de una u otra forma han dado luz a mis días (incluyendo a Motita que ya esta en el cielo, y a Tito, que como hermano, es el mejor perro que ha existido)... De todo corazón, GRACIAS...



# ÍNDICE

	<b>pag.</b>
<b>I. Resumen.....</b>	<b>5</b>
<b>II. Introducción.....</b>	<b>6</b>
<b>III. Abreviaturas.....</b>	<b>8</b>
<b>IV. Generalidades.....</b>	<b>10</b>
4.1 Anatomía del Sistema Inmune.....	10
4.2 ¿Qué es un antígeno?.....	14
4.3 Presentación y Procesamiento de antígeno.....	18
4.4 Mecanismos de cooperación celular.....	25
4.5 “La clona prohibida” (Autoinmunidad y enfermedades autoinmunes).....	31
4.6 ¿Por qué un modelo experimental?.....	36

<b>V. Objetivo.....</b>	<b>41</b>
<b>VI. Hipótesis.....</b>	<b>41</b>
<b>VII. Materiales y Métodos.....</b>	<b>42</b>
7.1 El plásmido y su construcción genómica.....	42
7.2 Elaboración de bacterias competentes por el método del Cloruro de Calcio (CaCl <sub>2</sub> ).....	43
7.3 Transformación de <i>E.coli</i> DH5α.....	44
7.4 Purificación del plásmido (Midi-Preps).....	45
7.5 Linearización del DNA de plásmido.....	46
7.6 Transfección de fibroblastos murinos.....	47
7.7 Estudios de presentación de antígeno.....	49
<b>VIII. Resultados.....</b>	<b>50</b>
8.1 Generación de Bacterias competentes y Transformación por el método de CaCl <sub>2</sub> .....	50
8.2 Purificación del plásmido (Midi-preps).....	50
8.3 Linearización con enzimas de restricción.....	53



8.4 Transfección por electroporación de fibroblastos murinos LK <sup>k</sup> .....	54
8.5 Presentación de antígeno.....	60
<b>IX. Discusión de Resultados y Conclusiones.....</b>	<b>62</b>
<b>X. Apéndice I (Glosario de Términos) .....</b>	<b>66</b>
<b>XI. Apéndice II (Soluciones y Reactivos).....</b>	<b>70</b>
<b>XII. Bibliografía.....</b>	<b>74</b>

## **RESUMEN**

Los mecanismos que definen el tráfico de moléculas clase II por vía endocítica son en parte desconocidos. Es necesario contar con diferentes líneas celulares que produzcan y expresen de maneras diferentes un antígeno definido, por ello se transfectó una línea de fibroblastos (LK<sup>k</sup>) con un plásmido que contiene el DNA complementario (cDNA) de lisozima de gallina (LG), bajo el promotor de la  $\beta$ -actina. La línea obtenida estimuló eficientemente a un hibridoma de linfocito T. Estas células permitirán el estudio del procesamiento y presentación de antígeno, con mayor profundidad.

## **INTRODUCCIÓN**

Las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) son glucoproteínas presentes en la superficie celular de los vertebrados; existen dos clases de moléculas del MHC que participan en la presentación de antígenos, denominadas moléculas clase I y clase II. A diferencia de las moléculas clase I, que son expresadas por la mayoría de las células nucleadas, las clase II solo están presentes en algunas células que participan en la respuesta inmune y que comparten entre ellas la capacidad de funcionar como células presentadoras de antígeno (CPA). Las características fisicoquímicas de la unión de un péptido con las moléculas clases I y II del MHC parecen ser muy similares (Harding, Unanue ER); sin embargo ambas difieren tanto en el fenotipo de linfocitos T con el que interactúan (  $CD8^+$  y  $CD4^+$  respectivamente), como en el origen de las proteínas que después de ser procesadas, han de presentarse por ellas (péptidos derivados de proteínas endógenas y péptidos derivados de proteínas exógenas respectivamente) siendo  $CD4$  y  $CD8$  moléculas accesorias, las cuales funcionan como correceptores con afinidad selectiva por las moléculas del MHC correspondientes.

A pesar de la gran cantidad de información existente, aún no es posible precisar los mecanismos que hacen que las moléculas clase II tengan un comportamiento intracelular diferente al de las moléculas clase I. Para esclarecer más el procesamiento de antígenos se crean modelos experimentales utilizando antígenos proteínicos bien

caracterizados a nivel molecular, genético e inmunobiológico. La lisozima de gallina (LG) es una proteína globular de 14.9 kDa, su gen ha sido clonado y sus secuencias génica y proteínica son bien conocidas e inmunológicamente han sido ampliamente caracterizadas. Lo anterior la hace un antígeno adecuado para ser expresado en un modelo experimental para el análisis de los mecanismos intracelulares que participan en el procesamiento de un antígeno proteínico.

## **ABREVIATURAS**

<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina.
<b>CAM's</b>	Moléculas accesorias de adhesión.
<b>CD(n)</b>	Marcador antigénico en leucocitos.
<b>cDNA</b>	DNA complementario.
<b>CPA</b>	Célula presentadora de antígeno.
<b>CTL</b>	Linfocito T citotóxico.
<b>CTLL-2</b>	Línea clonada de linfocitos T citotóxicos de ratón.
<b>EC</b>	Eritrocitos de carnero.
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraacetato.
<b>Fab</b>	Fragmento captador de antígeno.
<b>FACS</b>	Citofluorómetro.
<b>Fc</b>	Fragmento cristalizable.
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos.
<b>IFN</b>	Interferón.
<b>Ii</b>	Cadena invariante.
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina.
<b>IL</b>	Interleucina.
<b>LB</b>	Linfocito B.

<b>LG</b>	Lisozima de huevo blanco de gallina.
<b>LR</b>	Lisozima de ratón.
<b>LT</b>	Linfocito T.
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido.
<b>MALT</b>	Tejido linfoide relacionado con mucosas.
<b>MHC</b>	Complejo Principal de Histocompatibilidad.
<b>MIs</b>	Antígenos menores estimuladores de linfocitos.
<b>NK</b>	Células asesinas naturales.
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico.
<b>RLT</b>	Receptor de antígeno del linfocito T.
<b>RML</b>	Respuesta o reacción mixta de linfocitos.
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino.
<b>TGF</b>	Factor de transformación y crecimiento.
<b>T<sub>h</sub></b>	Linfocitos T inductores.
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral.

## **GENERALIDADES**

### **Anatomía del Sistema Inmune.**

Las células que participan en la respuesta inmune se organizan en los tejidos linfoides y en los órganos linfáticos y se extienden a través del tejido conjuntivo de los órganos no linfoides. El tipo de célula responsable de la especificidad de la respuesta inmune, es el linfocito. Aproximadamente  $10^{12}$  linfocitos constituyen el sistema linfoide maduro. Junto con una variedad de células “accesorias” que incluyen a células epiteliales, monocitos/macrófagos y otras células presentadoras de antígeno (CPA). Las células accesorias se requieren tanto para la maduración como para las funciones efectoras de los linfocitos (Lydyard PM, Grossi CE). Los linfocitos se derivan de progenitores hematopoyéticos que maduran en la médula ósea (hígado fetal) dando lugar a los linfocitos B (LB) o bien, diseminados en el timo donde se diferencian a linfocitos T (LT). La médula ósea y el timo son entonces órganos linfoides primarios o centrales. Los linfocitos ya maduros dejan los órganos centrales por vía de los vasos sanguíneos y emigran a los tejidos secundarios o periféricos donde ejercen sus funciones en respuesta a un antígeno (Lydyard PM, Grossi CE). Los tejidos linfoides periféricos incluyen al bazo y a los nódulos linfáticos así como el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) el cual se asocia al sistema respiratorio, genitourinario y tracto gastrointestinal.

La médula ósea y el timo proveen el microambiente necesario para la diferenciación de los linfocitos B y T respectivamente, y para la producción de células maduras responsables de la respuesta inmune humoral o celular. Durante la maduración del LB y del LT, otros eventos similares ocurren en la médula y el timo, estos son los

llamados rearrreglos de los genes, que codifican los receptores del antígeno como son las inmunoglobulinas (Ig) o el receptor del LT (RLT) y la expresión de los mismos en la superficie celular. Una variedad de otros marcadores celulares aparece ordenadamente después, definiendo los estadios de maduración de ambos tipos de células (Springer TA).

El evento principal que toma lugar en el timo es la proliferación y la selección positiva o negativa de los linfocitos T, resultado de la interacción entre timocitos y células epiteliales, corticales y otras células MHC-positivas respectivamente.

La selección positiva permite la expansión de aquellas células equipadas con un RLT capaz de unirse (débilmente) a las moléculas propias del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), aún en ausencia del antígeno. Aquellas células T en desarrollo que presenten una mayor afinidad entre su RLT y las moléculas clase I y II del MHC expresadas por células tímicas no linfoides, tienen una ventaja de crecimiento. La selección negativa implica la eliminación de clonas autorreactivas a través de un encuentro con antígenos durante la maduración intratímica.

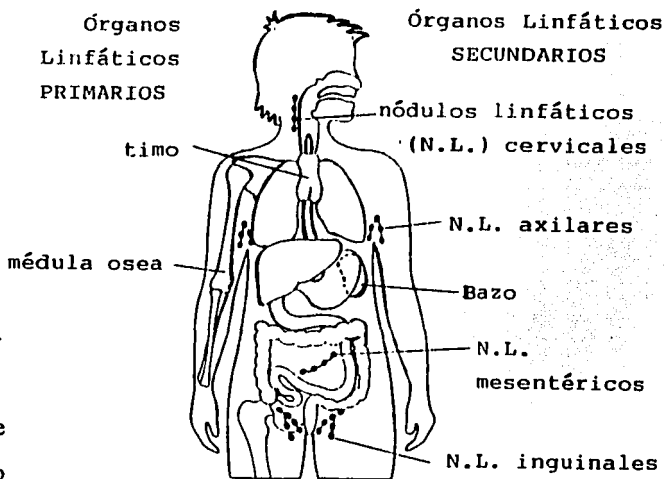
Generalmente, un organismo distingue entre el material propio y el no propio. El sistema inmune de un organismo reacciona en contra de cualquier compuesto extraño (antígeno) y es tolerante (incapaz de reaccionar) con la mayoría de los componentes propios del organismo, los cuales pueden ser a su vez muy buenos inmunógenos en otros organismos. La tolerancia a lo propio se adquiere durante el desarrollo fetal y neonatal y el sistema inmune puede hacerse tolerante aún a materiales o tejidos extraños introducidos durante este periodo.

Los materiales o compuestos que pueden inducir la tolerancia inmunológica se llaman tolerógenos.



Las células B y T maduras dejan los órganos centrales y migran hacia los tejidos periféricos linfoides. Las funciones efectoras del LB y del LT responsables de la respuesta inmune humoral o mediada por células se lleva a cabo en la periferia linfoides que consiste en discretos órganos y linfocitos dispersos en las áreas intersticiales de los órganos no linfoides como el hígado, los pulmones etc.

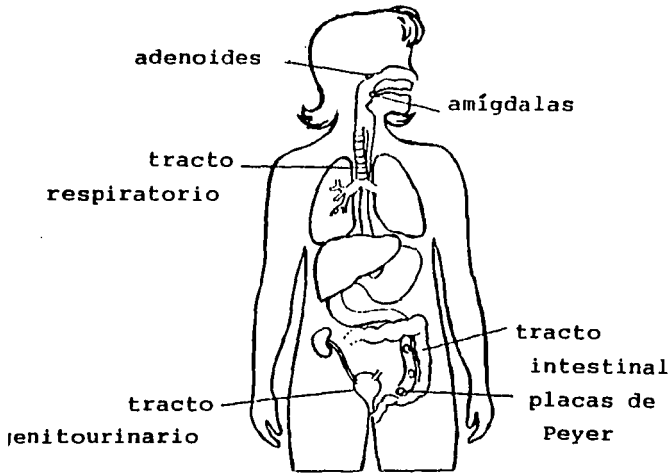
**FIG. 1 Órganos linfáticos.**



Los tejidos linfoides poseen una organización vascular y celular que favorece el encuentro con los antígenos y células presentadoras de antígeno con los linfocitos B y T.

Los linfocitos B y T maduros migran de los órganos centrales hacia áreas periféricas llamadas zonas B dependientes y T dependientes. Un encuentro con el antígeno inicia la proliferación, activación y diferenciación que lleva a la generación de células efectoras y células de memoria. Las células efectoras de la respuesta inmune humoral son las células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Los LT inductores y citotóxicos son por su parte células efectoras de la respuesta inmune mediada por células (Nossal GJV, Ada GL). Las células efectoras y de memoria se encuentran en distintas áreas entre los tejidos linfoides periféricos. Los antígenos pueden penetrar las barreras naturales que provee la piel y las superficies mucosas, o pueden entrar directamente a la sangre. Para asegurar una protección apropiada, los ganglios o nódulos linfáticos están

estratégicamente localizados a lo largo de los vasos linfáticos que parten de las áreas mucosas y otros tejidos del cuerpo, defendiendo las superficies externas e internas del mismo.



**FIG. 2 Inmunidad de mucosas.**

Los anticuerpos así producidos en el bazo y en los nódulos linfáticos son usualmente detectables en el suero. El tipo de protección que se provee por estos órganos generalmente se menciona como: inmunidad sistémica (FIG. 1). El tejido linfoide asociado a mucosas forma una línea distintiva y funcional de de-

fensa. El MALT consiste en agregados que se encuentran en la lámina propia y en la submucosa de muchas membranas del tracto digestivo, respiratorio, urinario y genital. Las células epiteliales juegan un papel activo en el transporte y secreción de anticuerpos producidos localmente, como la IgA provenientes de la luz. De hecho los anticuerpos producidos a nivel de mucosa son predominantemente del tipo secretor.

El MALT es un sistema bastante distinto al de inmunidad sistémica por lo que se le conoce como inmunidad de mucosas (FIG. 2).

## ¿Qué es un antígeno?

Antígeno es cualquier sustancia (molécula) potencialmente capaz de interactuar con el receptor del linfocito T o B, aunque en términos generales se le atribuye además el poder inducir la producción de anticuerpos específicos o inmunocitos (células inmunes), o de interactuar específicamente con los productos de la respuesta inmune al entrar al organismo de un vertebrado. La primera parte de la definición menciona la capacidad de provocar una respuesta inmune, a lo que también se conoce como inmunogenicidad y la sustancia capaz de provocar dicha respuesta en términos más estrictos, se llama inmunógeno. La segunda parte, referente a la interacción específica se conoce como especificidad antigénica (Sela M). Un cambio químico o físico en la molécula que resulte en el incremento de la respuesta inmune puede incrementar su inmunogenicidad, aún así puede no ocurrir ningún cambio en su especificidad antigénica. Su determinante antigénico (también llamado epitopo), es el responsable de dicha especificidad. La inmunogenicidad es operacionalmente dependiente de las condiciones experimentales del sistema, incluyendo parámetros tales como el antígeno, el modo de inmunización, el organismo que se inmuniza y sus antecedentes genéticos, así como su sensibilidad a los métodos usados para detectar la respuesta. Es difícil en algunas ocasiones comprender que la palabra antígeno se use de igual modo para una molécula, un virus, una bacteria y a veces para órganos o tejidos, pero los anticuerpos tienen un sitio de combinación (también llamado paratopo) con patrones distintivos con una mayor o menor similitud en la cavidad y el tamaño. Estos sitios de combinación no son complementarios a una bacteria completa o a un corazón entero, pero siempre son complementarios a un sólo y único determinante antigénico el cual está limitado en su tamaño molecular.

Los determinantes antigénicos pueden ser parte de proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos o glicolípidos y otras macromoléculas biológicas. Muy frecuentemente solo tienen una conformación estérica y son parte de la estructura nativa, así pues, debemos distinguir entre determinantes continuos y discontinuos (Berzofsky JA). Un epítipo, sitio antigénico o determinante antigénico ( estos términos se intercambian frecuentemente ) es aquella parte del antígeno la cual físicamente interactúa con el receptor específico para el antígeno. Estrictamente hablando, un epítipo o determinante antigénico se define por el receptor particular que lo une. Sin embargo hay regiones del antígeno que pueden inducir la respuesta del linfocito T o B y frecuentemente se describen como determinantes antigénicos pero sin hacer referencia de la especificidad precisa del receptor involucrado (Livingstone AM, Fathman CG).

No todos los determinantes antigénicos se expresan al mismo tiempo, el término inmunopotencia se puede definir como la región de la molécula antigénica que sirve como determinante antigénico y que induce la formación de una respuesta inmune específica (Margalit H), en algunos casos los determinantes antigénicos no se expresan bajo ciertas condiciones y el término aplicado es el de inmunosilenciosos (Kabat EA).

El término de hapteno, en un sentido estricto, designa a cualquier sustancia, la cual carece de la capacidad de generar una respuesta inmune por sí misma, pero es capaz de reaccionar con anticuerpos generados por la inmunización del inmunógeno completo, del cual el hapteno forma parte. En la práctica, muchos haptenos investigados son pequeñas sustancias químicas, en muchos casos de tamaños definitivamente menores a los de un determinante antigénico completo.

Los dos tipos de macromoléculas naturales, más estudiadas como antígenos, son las proteínas y los polisacáridos.

En las proteínas, se incluyen a las glicoproteínas, nucleoproteínas, lipoproteínas entre otras. Las proteínas desnaturalizadas generalmente son menos inmunogénicas que aquellas en estado nativo (Benjamin DC). Por parte de los polisacáridos se incluyen a los péptidoglicanos, glicolípidos y otros conjugados. Los antígenos de grupos sanguíneos son otra categoría importante de polisacáridos, siendo estructuras gen-dependientes que se expresan en la superficie celular. Los ácidos nucleicos también son antigénicos. Esta capacidad les fue reconocida mucho tiempo después que a las proteínas o que a los polisacáridos, generalmente los anticuerpos disponibles van dirigidos a una cadena sola de DNA desnaturalizado, o bien, en contra del RNA, histonas y nucleoproteínas. Los lípidos en cambio, son pobres inmunógenos pero se han podido obtener anticuerpos en su contra, por otra parte los liposomas juegan un papel importante pues pueden elevar la inmunogenicidad de varios antígenos. Entre otros lípidos importantes, inmunológicamente hablando, están los fosfolípidos, como la esfingomielina y la encefalina, así como los glicoesfingolípidos como los galactocerebrósidos, entre otros lípidos antigénicos esta el conocido "Antígeno de Forssman", causante de la hemólisis de eritrocitos ovinos en presencia de antisuero y complemento. Un impedimento para el avance en el campo inmunológico de los lípidos ha sido su notable insolubilidad en agua así como el resto de sus propiedades físicas y químicas. Finalmente, antígenos sintéticos, especialmente polipéptidos sintéticos han desempeñado un papel importante en el estudio de la inmunogenicidad (por ejemplo: la polivinilpirrolidona). La forma de la molécula no parece ser un factor crucial en la inmunogenicidad, sin embargo, el tamaño parece ser muy importante, pocas moléculas de menos de 2000 Da son inmunogénicas, además la inmunogenicidad aumenta con el tamaño molecular.

El doblamiento espacial de las proteínas juega un papel decisivo en determinar su especificidad antigénica (Geysen HM). Con modelos sintéticos ha sido posible construir los mismos péptidos inmunógenos que poseen tanto una secuencia exclusiva como determinantes antigénicos discontinuos. En las proteínas globulares muchos de sus determinantes antigénicos son del tipo conformacional y es evidente una pérdida de reacción después de la desnaturalización. Los anticuerpos son entonces, una buena prueba del estado conformacional de las proteínas, y hay muchos casos reportados en los cuales, los anticuerpos se han usado para detectar diferentes estados conformacionales de las mismas (Langone JJ). Trabajando con estas consideraciones, se ha demostrado que un péptido análogo a una secuencia de la lisozima de huevo de gallina (LG) puede sintetizarse (Nadimi F), encerrado en un "asa" por medio de un puente disulfuro y unido a un polímero sintético. La macromolécula resultante lleva a la producción de anticuerpos que reaccionan de modo cruzado eficientemente, con la única región conformacional de la proteína nativa (Schwartz RH). En términos conceptuales esto ha abierto el camino para el desarrollo de las vacunas sintéticas .

Las inmunoglobulinas se pueden mencionar aquí en términos de su antigenicidad. La disponibilidad de anticuerpos monoclonales permite hoy día un análisis antigénico detallado de las inmunoglobulinas de cada clase (IgG, IgM, IgA, IgE, IgD) y tipo (Alzari PM, Lascombe MB, Poljak RJ). Los epitopos en una molécula de inmunoglobulina varían mucho en sus inmunogenicidades relativas.

Los alérgenos son antígenos que causan reacciones alérgicas ya sea de tipo inmediato o tardío. Su origen puede ser muy diverso, como polvo, hongos, cabello, polen, proteínas de bacterias, comida o fármacos (Klaus GGB, Humphrey JH). También hay indicaciones que en pacientes de cáncer la respuesta inmune puede afectar el crecimiento del tumor, por lo que se han identificado antígenos en estos tejidos

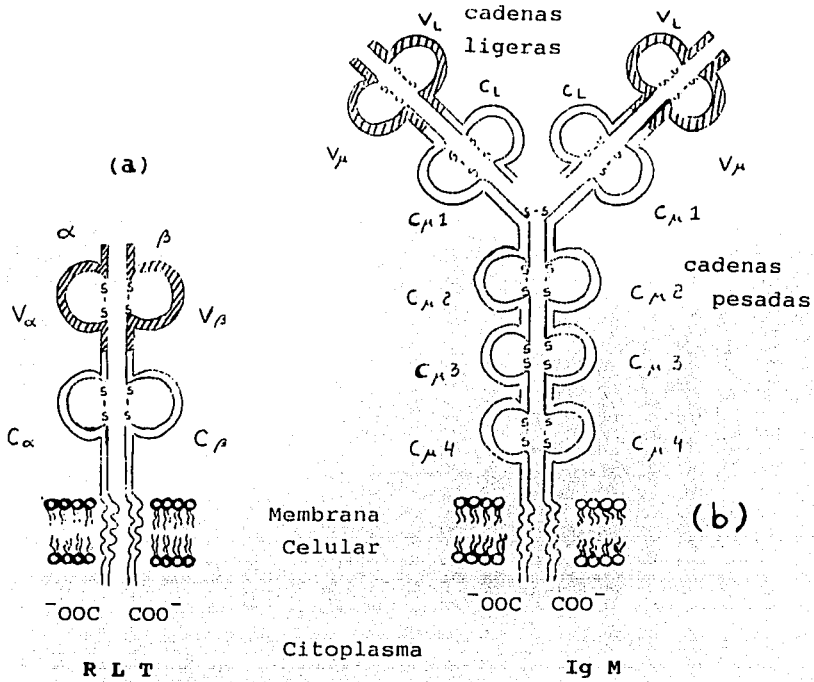
neoplásicos. Los tumores antigénicos son por lo general tumor-selectivos más que tumor-específicos (Dijkstra CD).

### **Presentación y Procesamiento de Antígeno.**

El término presentación de antígeno se refiere a la culminación de una serie de eventos celulares como son la toma del antígeno, su procesamiento intracelular por parte de células especializadas en su presentación (CPA) y finalmente su reconocimiento por parte de los linfocitos T (Unanue ER). Los patrones básicos del reconocimiento proteínico se aplican tanto a linfocitos  $CD4^+$  y  $CD8^+$ , ninguno de los dos reconoce antígenos proteínicos en estado nativo, sino únicamente posterior a su procesamiento por parte de las CPA. Este procesamiento consiste en generar, a partir de la proteína, fragmentos desnaturalizados o péptidos que puedan asociarse con moléculas clase I o II del complejo principal de histocompatibilidad (Berzofsky JA, Brett SJ, Streicher HZ, Takahashi H).

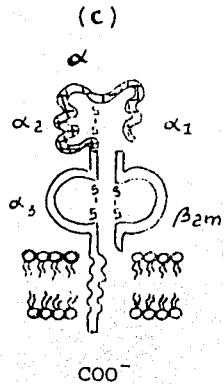
El complejo bimolecular, péptido-MHC representa el determinante antigénico reconocido por el receptor (RLT) del linfocito T (FIG. 3a) (tanto  $CD4^+$  como  $CD8^+$ ). Sin embargo existen diferencias notables en el reconocimiento por parte de las dos poblaciones de linfocitos T. El linfocito T  $CD4^+$  reconoce péptidos asociados a moléculas clase II del MHC (FIG. 3d), mientras que el linfocito T  $CD8^+$  reconoce péptidos asociados a moléculas clase I del MHC (FIG. 3c) (Falk K). Muchos inmunólogos se refieren a la presentación de antígeno en el contexto de células T  $CD4^+$ , dado que es este el evento crítico que da inicio a muchas reacciones celulares de inmunidad. Los linfocitos T  $CD4^+$  regulan en gran parte, por la secreción de interleucinas, el crecimiento y diferenciación (Vignali D).

**FIG. 3 Moléculas para el reconocimiento de antígeno.**

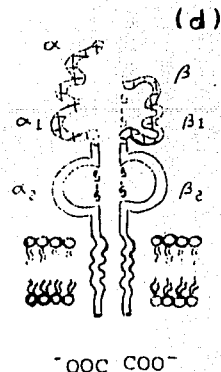


==== Regiones constantes

//// Regiones variables



M H C I



M H C II



de las células B, células CD8<sup>+</sup> y macrófagos (por ello en adelante se comentará sobre sus interacciones, con preferencia a las del LT CD8<sup>+</sup> y MHC I).

En cultivo, las CPA son estrictamente requeridas para la respuesta de linfocitos T a un antígeno o una lectina (proteína que tiene afinidad por carbohidratos, generalmente se trata de una molécula capaz de estimular células T). La depleción de CPA resulta en la falta de proliferación de células T y en la ausente secreción de interleucinas. Recientes hallazgos comprueban que los antígenos proteínicos son procesados por las CPA; que algunos pero no todos los péptidos procesados se unen a un alelo determinado de moléculas clase II del MHC y que el complejo péptido-MHC representa el determinante antigénico que se une al RLT, siendo las moléculas clase II del MHC elementos esenciales para la interacción CPA-LT (Moreno J, Lipsky P).

La presentación de antígeno toma lugar rápidamente después de su entrada al tejido linfóide. Los linfocitos B tienen en su superficie inmunoglobulinas (FIG. 3b) con especificidad por el antígeno, también participan uniéndose al antígeno, procesándolo y presentándolo a los linfocitos T. La interacción entre la CPA y el LT CD4<sup>+</sup> se manifiesta físicamente por un contacto cercano célula-célula. Este contacto íntimo se favorece por las moléculas de adhesión (CAMs). Los efectos funcionales de la interacción son recíprocos, los macrófagos se estimulan para liberar interleucinas, los linfocitos B proliferan y se diferencian; por su parte los LT CD4<sup>+</sup> también proliferan y liberan interleucinas .

Resulta conveniente enfatizar que si bien las células B y T reconocen y reaccionan en contra del mismo antígeno, su especificidad por éste, puede ser muy diferente. La mayoría de las clonas de LB reconocen a la proteína nativa, en su conformación terciaria

y consecuentemente el anticuerpo liberado de él solo se unirá a la molécula así plegada; en contraste el LT reconoce una secuencia lineal de aminoácidos derivados del procesamiento de una proteína en el LB o en otra célula presentadora de antígeno.

El procesamiento se refiere, bioquímicamente hablando, al desdoblamiento de la proteína y a la generación de péptidos como resultado de una proteólisis parcial. Estas secuencias resultantes de aminoácidos son capaces de interactuar y formar un complejo con las moléculas clase II del MHC. El procesamiento toma lugar en vesículas ácidas intracelulares de la CPA (si después de la internalización de la proteína se añade cloruro de amonio u otro tipo de base débil, el inmunógeno no se expresa, dada la elevación del pH en el interior de las vesículas). Seguido por la toma, internalización y procesamiento del antígeno proteínico, el complejo péptido-MHC aparece en la superficie membranal de la CPA para ser el complejo que anclará al RLT (Adorini L).

Aparentemente la unión de los péptidos ocurre en un compartimiento especial o sitio de unión de péptidos de las moléculas clase II del MHC. Este sitio de unión se ha deducido a partir de la estructura terciaria cristalina de las moléculas clase I (Strominger JL, Wiley DC, Jardetzky TS et al.). El sitio de unión parece estar ocupado por péptidos de 8 a 9 aminoácidos para moléculas de clase I y de 13 a 17 aminoácidos para moléculas clase II.

Algunos péptidos adoptan una conformación diferente al amoldarse al sitio de unión. Algunos péptidos como los residuos 52-61 de la lisozima de huevo de gallina (LG) (Asp-Tyr-Gly-Ile-Leu-Gln-Ile-Asn-Ser-Arg), cuenta con tres residuos (Tyr<sup>53</sup>, Leu<sup>56</sup> y Gln<sup>57</sup>) para contactar al RLT, mientras que otros tres (Asp<sup>52</sup>, Ile<sup>58</sup> y Arg<sup>61</sup>) contactan a las moléculas clase II del MHC (Amit AG).

Una observación importante, primero hecha con los péptidos de lisozima, es que el sitio de unión del MHC no discrimina entre los péptidos propios y los no propios. Por ejemplo, el péptido de lisozima murina (LR) en los residuos 52-61 descritos anteriormente, solo difiere del péptido de LG por una Phe en vez de una Leu en el residuo 56. Este péptido propio se une con la misma afinidad a las moléculas del MHC (Moreno J, Adorini L). Como resultado de esta unión se pueden dar hipotéticamente tres efectos: en las células estromales del timo puede ser el instrumento causante de la muerte (o selección negativa) de células T en proceso de maduración; en las CPA del tejido linfático periférico, el péptido propio puede competir con péptidos extraños por la unión a moléculas del MHC y finalmente, tales complejos péptido-MHC en la superficie de las CPA podrían potencializar a LT autorreactivos para causar una enfermedad autoinmune (Lorenz RG, Allen PM).

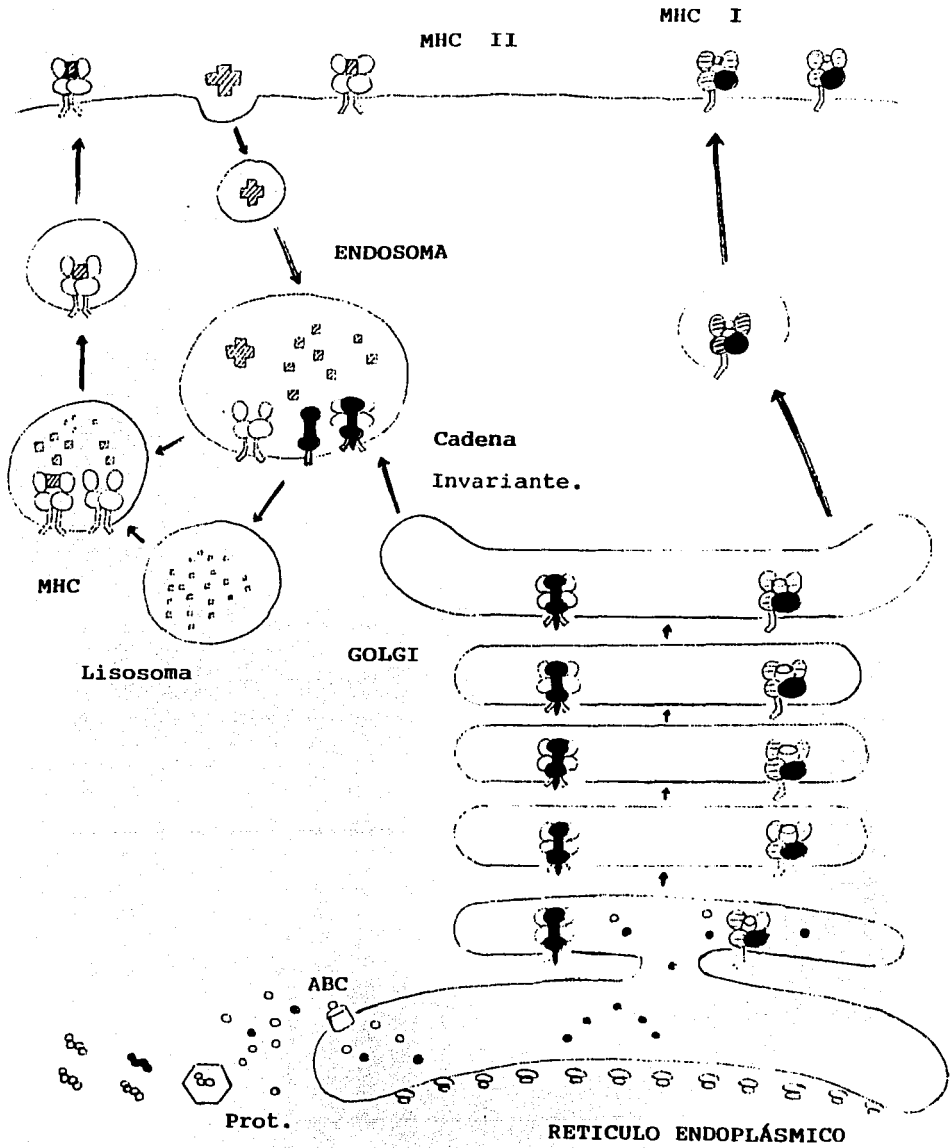
Por supuesto, la reactividad contra antígenos propios o extraños comprende múltiples pasos y factores de los cuales la generación del complejo péptido-MHC sólo es uno (Unanue ER, Cerottini JC)

Para entender las bases de la presentación de péptidos derivados de proteínas endógenas por las moléculas clase I (Morrison LA, Lukacher AE, Braciale VL et al.) y proteínas exógenas por clase II, así como para determinar el sitio intracelular en donde los péptidos inmunogénicos se unen a las moléculas clase I y II es necesario el análisis de la biosíntesis y vías subsecuentes de exportación de las moléculas del MHC hacia la superficie celular (FIG. 4). Al igual que ocurre con la mayoría de las proteínas de secreción y con aquellas expresadas en la superficie celular, la biosíntesis de las moléculas clase I y II ocurre en los polirribosomas localizados en el citosol (Hämmerling G, Moreno J). Inmediatamente después de la síntesis, las proteínas son

Antígeno

FIG. 4

Vías de procesamiento de antígeno.



FALLA DE ORIGEN

translocadas al retículo endoplásmico rugoso (RE). Una vez en éste, las cadenas polipeptídicas que forman a la molécula clase I del MHC ( $\beta$ 2-microglobulina y cadena  $\alpha$ ) son ensambladas para formar un heterodímero. Para su ensamblaje correcto y adquisición de una estructura terciaria estable, las moléculas clase I dependen de la presencia de un péptido capaz de unirse a ellas. El sitio de origen de la mayoría de los péptidos inmunogénicos que se unen a las moléculas clase I, es el citosol y la unión ocurre dentro del RE (Parham P, 1992). Existe un mecanismo, recientemente descrito, para la translocación de péptidos del citosol al RE por parte de ciertas moléculas especializadas para ello (miembros de la superfamilia "ABC" de transportadores transmembranales) (Parham P).

Las similitudes en el proceso biosintético de las moléculas clase I y II terminan después de su translocación al RE. Las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de las moléculas clase II se asocian con un tercer polipéptido denominado cadena invariante (Ii) (Cresswell et al, 1987).

El papel de la cadena invariante puede ser el de regular la unión del péptido, esto lo lograría cubriendo el sitio de unión de las moléculas clase II del MHC durante su paso por el retículo endoplasmático, asegurándose de que péptidos propios (destinados a moléculas clase I del MHC) no se unan y ocupen el lugar (Rötzsche O, Falk K). La cadena invariante puede también regular el transporte intracelular de las moléculas clase II del MHC.

Estudios ultraestructurales y bioquímicos indican que cerca de la tercera parte de las moléculas clase II del MHC se localizan en vesículas endosómicas intracelulares. En este compartimiento se encuentran las moléculas clase II recién sintetizadas así como moléculas recicladas de la membrana plasmática. La proporción de unas y otras depende

del grado de reciclamiento el cual varía entre linfocitos B y macrófagos (Unanue ER, Allen PM).

La presentación de antígeno comprende otros eventos además de los descritos anteriormente, además del contacto CPA-LT se requieren factores de crecimiento y diferenciación. Las moléculas que promueven primeramente el contacto físico son las ya mencionadas CAM's, mientras que las moléculas promotoras del crecimiento y la diferenciación son los coestimuladores (Springer TA).

Los coestimuladores pueden actuar induciendo la liberación temprana de factores de crecimiento como la IL-2 y/o regulando la expresión de receptores para los factores de crecimiento.

### **Mecanismos de cooperación celular.**

La respuesta inmune normal involucra los esfuerzos coordinados de diversos tipos de células. Esta percepción se hizo clara ya en los años 60's cuando se observó la existencia de linfocitos diferentes con funciones complementarias. Los LB derivados de la médula ósea producen anticuerpos y los LT derivados del timo proveen la "ayuda" requerida a los LB. La especialización celular en la respuesta inmune fue observada *in vitro* al descubrir en los LB la dependencia de LT para la producción de anticuerpos y a su vez la necesidad de otro tipo de células (CPA) para la proliferación del LT (Ashwell JD).

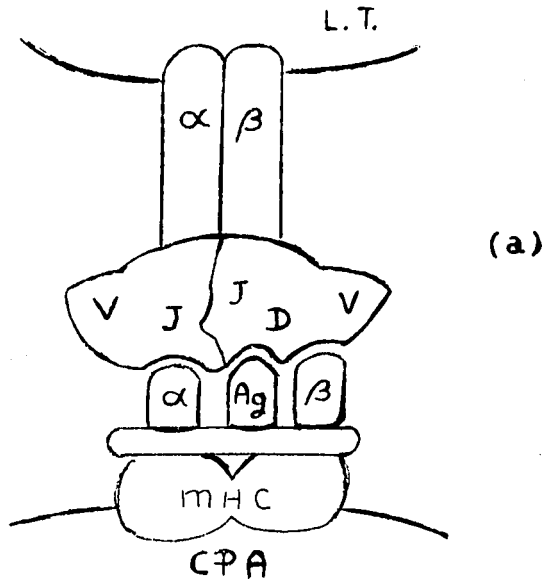
Es claro que para evitar un "caos" inmunológico existen mecanismos altamente regulados para la comunicación intracelular y su interacción. Macrófagos / monocitos,

linfocitos T y B, células dendríticas, NK (células asesinas naturales), granulocitos y mastocitos son algunas de las células que participan en la respuesta inmune y/o inflamatoria. Bajo ciertas circunstancias cada uno de estos tipos de células influencia el comportamiento de otras (Vitetta ES, Fernández-Botran R, Myers CD, Sanders VM). Así los tipos de cooperación intracelular se pueden dividir arbitrariamente en aquellos que requieren un contacto célula-célula íntimo (también llamadas interacciones cognatas (FIG. 5a)) y aquellas interacciones que no requieren de dicho contacto (interacciones no cognatas (FIG.5b)). Está implícito que las interacciones cognatas involucran un reconocimiento específico de ligando(s) en la membrana de una célula y de receptor(es) en la otra célula implicada. Las interacciones cognatas permiten un alto grado de selectividad y especificidad, dado que se generan a partir de señales biológicas de célula a célula. Las interacciones no cognatas no pueden ser tan finamente dirigidas pero permiten a una célula afectar a otras a distancia y encarar oportunamente a las implicaciones de dicha respuesta, dado que una célula iniciadora puede influenciar la respuesta de muchas células secundarias (Schwartz A).

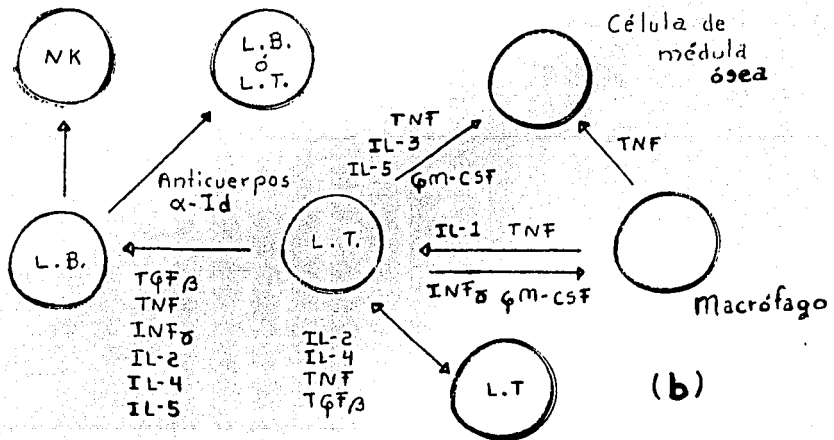
Las interacciones no cognatas entre las células del sistema inmune dependen de la secreción y la subsecuente unión de mediadores solubles. Los mediadores mejor caracterizados antigénico no específico son las citocinas (Mosmann TR, Coffman RL). Si bien los LT inductores (también conocidos como cooperadores, células T  $CD4^+$  o Th) se consideran como los productores clásicos de citocinas, todos los LT activados pueden producir moléculas solubles biológicamente activas.

Muchos de esos productos se han aislado y clonado incluyendo al factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos GM-CSF, interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), linfotoxinas, factor necrosante de tumores (TNF), factor de transformación y

**FIG. 5 Interacciones Cognatas**



**Interacciones No Cognatas**





crecimiento (TGF- $\beta$ ), interleucina 2 (IL-2), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (Tonegawa S).

Estas moléculas tienen numerosos efectos biológicos altamente interrelacionados. Dadas las consideraciones históricas, las interacciones no cognatas se piensan usualmente en términos de colaboración LT-LB. Ciertamente el IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-5 tienen efectos de importancia en el crecimiento de las células B y su diferenciación.

Las células Th murinas se han dividido en dos tipos, las Th1 y las Th2, la distinción se basa en el espectro de citocinas que estas células secretan (Mosmann TR, Coffman RL). La existencia de diversos tipos de células Th produciendo distintos tipos de citocinas provee un nivel de control y regulación de la respuesta inmune.

Por ejemplo, el IFN- $\gamma$  favorece el “switch” del LB de IgM a IgG2a e inhibe la secreción de IgG1 e IgE, mientras que la IL-4 causa un switch a IgG1 e IgE inhibiendo la secreción de IgG2a. Las células Th1 producen IFN- $\gamma$  que inhibe el crecimiento de células Th2 *in vitro* y las células Th2 producen otra interleucina (IL-10) que inhibe la proliferación de Th1. Además de estas subpoblaciones discretas de Th, hay otras Th que producen tanto IFN- $\gamma$  como IL-4, estas células pueden representar precursores de las Th1 y de las Th2 (por tanto Th0).

Otra categoría de inmunomoduladores consiste en factores biológicamente activos, secretados por las células T inductoras y citotóxicas (FIG. 6). Ya desde finales de los 70's, diversos grupos reportaron que la ayuda que da el LT para la producción de anticuerpos puede substituirse con los sobrenadantes de LT cultivados (MacDonald HR). Lo que claramente distinguía esos factores de las citocinas, era su actividad

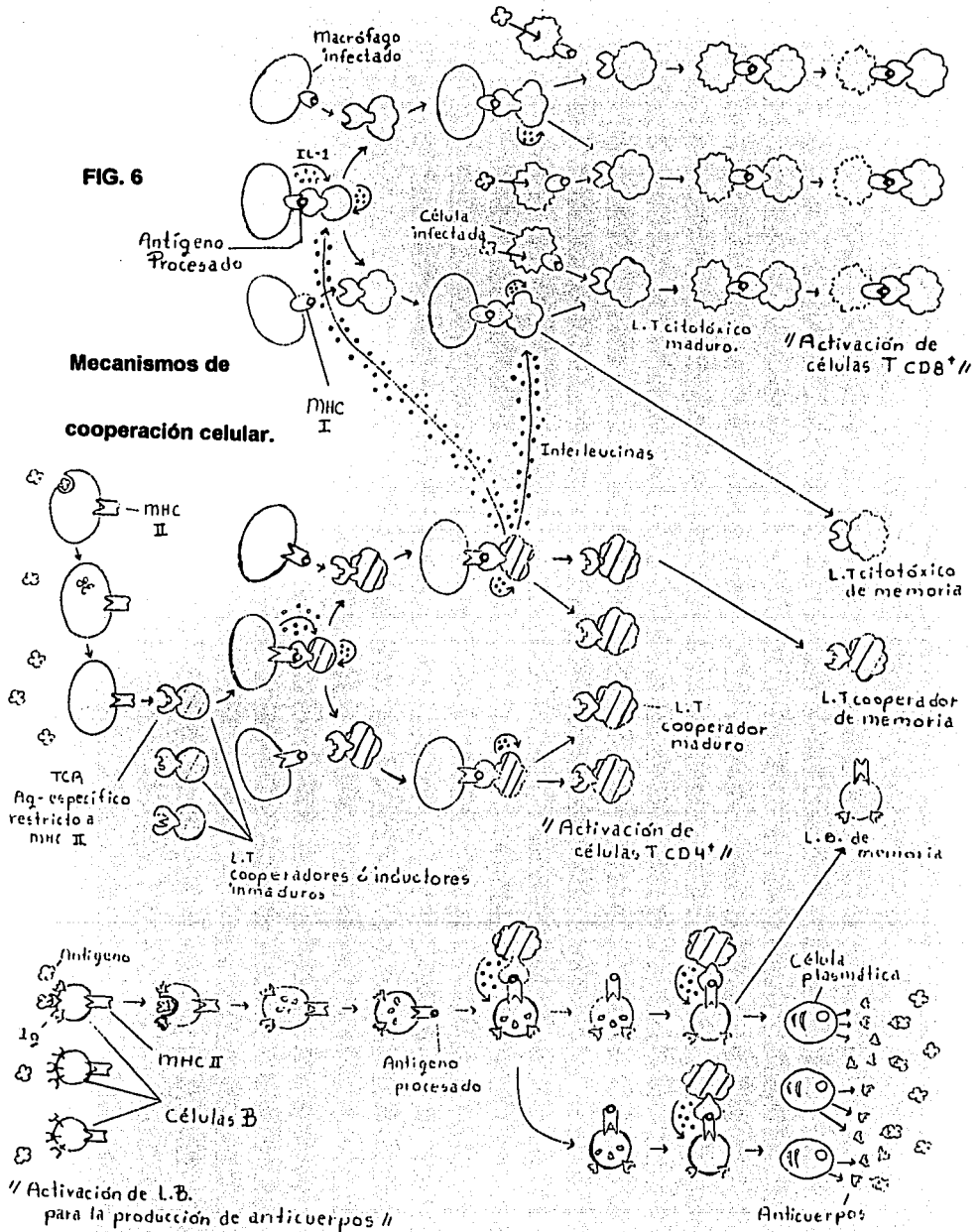
antígeno-específica y en algunos casos MHC-restricta. Sin embargo el estudio de dichos factores, ha progresado muy lentamente .

Uno de los ejemplos más claros de los requerimientos para la cooperación celular en interacciones cognatas ocurre en el caso del reconocimiento por parte de LT y su activación por un antígeno. Los LT solo reconocen al antígeno en el contexto de las moléculas clase I o clase II del MHC (Brodsky F). Un refinamiento de este principio se encuentra cuando encontramos al LB como célula presentadora de antígeno. Es claro que las células B pueden tomar y presentar antígenos solubles de una manera cualitativamente indistinguible a la de los macrófagos y células dendríticas, sin embargo, los LB son generalmente menos potentes en causar la proliferación de LT (inducida por antígeno) (FIG. 6) (Hodes RJ). Sin embargo, debido a la expresión de receptores de antígeno en su superficie (inmunoglobulinas), existe el caso especial en el que la CPA (en este caso el LB) y la célula T se unan a determinantes en la misma molécula antigénica, en esta situación el antígeno unido por el anticuerpo se toma y se internaliza muy eficientemente y los complejos, en la superficie celular, MHC clase II-péptido reconocidos por el LT se generan a concentraciones excepcionalmente bajas del antígeno nativo (Kronenberg M).

Células B antígeno específicas generalmente requieren de 1000 a 10,000 veces menos cantidad de antígeno para estimular a células T, por consiguiente limitando las concentraciones del antígeno se favorecerá el contacto de las células T  $CD4^{+}$  y B antígeno específicas, y esto resultará en interacciones cognatas.

Como ya se mencionó, es importante recordar el destacado desempeño de las moléculas de adhesión en esta interacción. Existen anticuerpos para moléculas de

FIG. 6



adhesión como las CD4, CD8, LFA-1 y CD2 y con su empleo experimental se ha reportado la modificación o inhibición de la activación del LT.

Otro aspecto de la cooperación entre CPAs y células T, es que además del ligando, se provee de señales coestimuladoras que pueden alterar la respuesta de la célula T, cualitativa o cuantitativamente. Entre dichas señales están las clásicas citocinas como la IL-1 y el TNF- $\alpha$ .

La pregunta que posiblemente surja sea ¿Por qué el sistema inmune ha desarrollado métodos tan elaborados para asegurar que muchas de las respuestas del LT y sus efectos sólo puedan ocurrir bajo un contacto íntimo celular? Un gran número de ventajas obvias se derivan de tal requisito. En el caso de LT citotóxicos específicos contra un virus, es esencial que el antígeno viral se reconozca solo en la célula infectada, si la respuesta a antígenos virales se permitiera en ausencia de una unión específica a glicoproteínas del MHC, las células T citotóxicas serían capaces de matar cualquier célula que uniera proteínas virales o al virus mismo, aún si la célula no estuviera activamente infectada (Harding CV, Unanue ER).

### **“La clona prohibida”**

**(Autoinmunidad y enfermedades autoinmunes).**

Al principio de este siglo, Paul Ehrlich uso la expresión “Horror autotoxicus” para designar la serie de mecanismos responsables de evitar la respuesta del cuerpo en contra de antígenos propios dadas las devastadoras consecuencias de atacarse a sí mismo, y sugirió entonces que la no reactividad puede estar mediada por el sistema linfoide. La evidencia de que estos mecanismos de control pueden fallar algunas veces fue sustentada

tiempo después por las observaciones de Donath y de Landsteiner al observar que pacientes con hemoglobulinemia paroxismal fría poseen anticuerpos en contra de sus propios eritrocitos (Rose N, Mackay I).

Los experimentos de Rivers, Sprunt y Berry en los inicios de los 30's mostraban que la inyección de antígenos de cerebro de mono inoculados a monos, provocaba una enfermedad autoinmune conocida como encefalomiélitis, siendo éste, el primer modelo experimental de enfermedades autoinmunes; siendo además el primer indicio de que el sistema inmune podría ser experimentalmente provocado para sufrir una peligrosa autorreactividad.

En 1953 Billingham, Brent y Medawar demostraron que la inyección neonatal de células de la cepa de ratón CBA a ratones de la cepa A, permitía posteriormente al ratón adulto aceptar transplantes de piel de CBA..

Rose y Witebsky por medio de una serie de estudios clásicos demostraron que tanto anticuerpos contra constituyentes de la tiroides como la tiroiditis misma puede ser inducida con la inmunización de conejos con extractos de tiroides en adyuvante completo de Freund. Desde entonces muchos modelos experimentales se han desarrollado con muchas especies animales, confirmando la importancia no sólo de la respuesta mediada por anticuerpos sino también de aquella mediada por células para el desarrollo de enfermedades autoinmunes. La sola transferencia de clonas de células T específicas para un autoantígeno es suficiente la mayoría de las veces, para inducir enfermedades autoinmunes en organismos normales. Muchas enfermedades autoinmunes probablemente tienen tanto componentes de células T como B. En otras situaciones otros mecanismos involucrando a células asesinas naturales o citotoxicidad celular mediada por anticuerpos puede jugar un papel importante en el proceso patogénico (Schwartz RS, Rose NR).

La autoinmunidad puede definirse como la expresión serológica o celular de un estado auto-reactivo sin ninguna manifestación clínica de enfermedad. Las enfermedades autoinmunes por otra parte, son estados claramente patológicos en los cuales los complejos inmunes se depositan como esferas vasculares o como infiltración de linfocitos que destruyen órganos específicos. Las enfermedades autoinmunes son potencialmente fatales mientras que muchos ejemplos de autoinmunidad son reversibles o bien, son solo una consecuencia de una condición fisiológica (Evered D, Whelan J). Un ejemplo de esto último es el fenómeno del envejecimiento. Aproximadamente el 50% de los individuos que rebasan la edad de 80 años, tienen en su suero el factor reumatoide y otro porcentaje tiene en su suero anticuerpos antinucleares sin ninguna manifestación de enfermedad relacionada con estos marcadores serológicos, por tanto, la autoinmunidad puede considerarse como una consecuencia casi normal del envejecimiento (Kumar V, Sercarz EE).

Un ejemplo de autoinmunidad reversible se asocia con la administración de varios fármacos capaces de inducir anticuerpos antinucleares, anti-células rojas u otras manifestaciones de auto-reactividad.

Debido a que la autoinmunidad que resulta en una enfermedad autoinmune es la excepción, más que la regla, deben existir mecanismos que normalmente previenen el desarrollo de las enfermedades autoinmunes. A este respecto, el sistema inmune es capaz de distinguir lo propio de lo no propio y finalmente convertirse en tolerante frente a muchos autoantígenos.

La teoría de “La clona prohibida” propuesta por Burnet en los años 50’s sugería que durante el desarrollo fetal, aquellas clonas autorreactivas al contactar con antígenos propios, son deletadas, llevando a una tolerancia a lo propio.

Una de las evidencias recientes que ejemplifican lo anterior es el caso de algunos ratones con antígenos peculiares (antígenos menores estimuladores de linfocitos o MIs) que eliminan durante su desarrollo fetal a células T que expresen el receptor  $\beta$  de la región variable de su RLT asociado al reconocimiento de esos antígenos, por lo que en edad adulta, no se encuentran linfocitos T maduros con tales características autorreactivas (Marrack P, Kappler J.).

En aquellas situaciones en las que la clona no se aborta, las clonas potencialmente autorreactivas pueden entrar en un estado reversible de anergia o bien estar activamente suprimidas por mecanismos reguladores .

Cuando todos los sistemas de regulación fallan, se presenta la enfermedad autoinmune (Rose NR). En algunos casos la presencia de autoanticuerpos acompaña a la enfermedad autoinmune.

A todo lo anterior hay que aclarar que la aparición de autoanticuerpos puede ser secundaria y tener solo un papel modulador en la enfermedad, se han visto personas sanas con cierto porcentaje de autoanticuerpos, mientras que hay enfermedades autoinmunes en las cuales casi no se detectan autoanticuerpos (Cohen IR).

La enfermedad autoinmune parece ser multifactorial (Talal N). La primera evidencia de que ciertos genes están involucrados en el desarrollo de la enfermedad

autoinmune, proviene de experiencias clínicas en humanos, sugiriendo la incidencia familiar de ciertas enfermedades autoinmunes.

También se ha observado la susceptibilidad a la inducción de autoinmunidad experimental determinada por la genética. Varios genes se han encontrado relacionados con las enfermedades autoinmunes; algunos de ellos están asociados con el complejo principal de histocompatibilidad, existen marcadas asociaciones entre ciertos desórdenes autoinmunes y ciertos alelos de componentes del MHC, tanto en humanos como en animales que espontáneamente desarrollan la enfermedad.

La creciente ocurrencia del fenómeno de autoinmunidad paralela a la creciente edad del organismo esta bien caracterizada. Por otra parte, muchas de las enfermedades autoinmunes severas usualmente inician a edad temprana. También se ha observado que la respuesta inmune no solo se regula por mecanismos intrínsecos del mismo sistema, sino también por señales endocrinas y neuroendocrinas. Se sabe que muchas enfermedades autoinmunes se presentan preferencialmente en mujeres, mientras que los hombres parecen estar protegidos probablemente debido a las propiedades inmunosupresoras de los andrógenos. Las hormonas involucradas en la respuesta al estrés como los glicocorticoides, catecolaminas y opiáceos endógenos, tienen fuertes efectos en las funciones específicas y naturales del sistema inmune, es bien sabido que el estrés agudo o crónico puede llevar a la exacerbación de enfermedades autoinmunes en el hombre.

Poco se sabe acerca de los efectos ambientales sobre la incidencia o curso de la enfermedad autoinmune. En general cualquier agente exógeno o condición que afecte tanto las propiedades inmunogénicas de los autoantígenos y/o su regulación puede modificar al sistema inmune como sucede con las infecciones virales o bacterianas que funcionan en ocasiones como gatillo para varias enfermedades autoinmunes.



## ¿Por qué un modelo experimental?

Ha sido de gran importancia la habilidad de los investigadores en las últimas décadas de “modelar” aspectos de la respuesta inmune *in vitro* (Brooks KH). El curso del desarrollo de la teoría inmunológica después de las descripciones iniciales de Pasteur, acerca de la inmunidad inducida contra el cólera de gallina, procedió a partir de la identificación de la molécula del anticuerpo como mediador primario de la inmunidad hasta la identificación de las células blancas (linfocitos) requeridas en la producción de anticuerpos. Una vez que los linfocitos se identificaron como la fuente idónea de anticuerpos, se hizo posible iniciar con los estudios *in vitro* de la respuesta inmune, por lo que ha sido un adelanto significativo a partir de la cuantificación *in vitro* de los niveles de inmunoglobulinas en suero. Estos primeros cultivos utilizaron la población total de células del bazo o sangre periférica (Bloom BR).

Inicialmente, sólo las células de animales previamente inmunizados *in vivo* podían inducirse a secretar inmunoglobulinas cuando se les estimulaba *in vitro* con antígenos como los eritrocitos de carnero (EC). Subsecuentemente se demostró que con la estimulación de mitógenos como el lipopolisacárido (LPS) no se requería de una inmunización previa *in vivo*.

Los estudios iniciales de proliferación, se enfocaron a observar la habilidad variable de las distintas células de incorporar timidina tritiada a su DNA, haciéndose aparente que la respuesta a distintos antígenos tiene requerimientos de activación diferentes y que la respuesta a antígenos proteínicos solubles requiere un contacto célula-célula (Dutton RW).

Este descubrimiento inició una serie de adelantos tecnológicos que permitían la disección de los eventos ocurridos durante la interacción célula-célula. La primer área de desarrollo técnico fue la separación de células, ésta permitió una caracterización extensiva del fenotipo y de los papeles funcionales de los distintos tipos de linfocitos. Muchos de los estudios más significativos e informativos *in vitro*, separaban células en base a sus moléculas de superficie, muchas de estas moléculas son glicoproteínas y se han identificado usando anticuerpos monoclonales o heterólogos. Estos anticuerpos se usaron para fraccionar la población de linfocitos ya sea: por lisis celular mediada por anticuerpos y complemento (la cual deja libre a la población celular carente del marcador de superficie), inmovilizando el anticuerpo en una matriz soluble la cual adhiere a la población con la molécula marcadora, dejando libre a la población no adherible por la carencia del marcador de superficie; o bien, uniendo un conjugado de partícula fluorescente-anticuerpo a la superficie celular de la célula y luego caracterizando a la población como poblaciones marcadas positiva o negativamente separándolas con un citofluorómetro (FACS).

El segundo grupo de adelantos tecnológicos pretendió observar por distintos puntos de vista, si las dos células precisaban realmente de un contacto membrana-membrana para hacer posible la transducción de señal.

Recientemente la microscopía electrónica, el marcado inmunológico con oro y la transferencia de partículas de célula a célula, ha dado la oportunidad de observar en la perimembrana los eventos que ocurren durante estas interacciones celulares. Ha sido muy importante también el verificar que el contacto directo célula-célula no es requerido en muchas interacciones reguladoras entre los distintos tipos de linfocitos; en particular la ayuda de células T, mediada por citocinas para la producción de anticuerpos y células

citotóxicas. Lo anterior se demostró al separar dos clases de linfocitos usando una membrana permeable.

Con las técnicas de separación de células se hicieron mezclas de varias poblaciones, encontrando la “segunda arma” de la respuesta inmune mediada por células, se notó que células de animales genéticamente divergentes al entrar en contacto, resultaban en proliferación sin la adición de un antígeno específico o de un mitógeno al cultivo *in vitro*, lo que fue llamado reacción a linfocitos mezclados, encontrando con ello interacciones críticas entre célula y célula involucrando tanto la combinación de células T y macrófagos o de células T-células B.

De modo concurrente al descubrimiento y caracterización de la reacción a linfocitos mezclados, se identificó una de las células efectoras de la inmunidad mediada por células, la célula T citotóxica (también llamada CTL) (Dupont B, Hansen JA, Yunis EJ).

De forma análoga a los primeros estudios de producción de anticuerpos, los primeros modelos de lisis mediada por células requería de la generación *in vivo* de CTL's, subsecuentemente se notó, que las CTL's pueden generarse *in vitro* con la ayuda de un cultivo mixto de linfocitos, seguido varios días después, de un ensayo con células blanco, marcadas.

Con el “boom” de la información concerniente a la regulación de mediadores solubles de la activación de linfocitos acaecida en la última década, muchos de los modelos actuales *in vitro* están encaminados a resolver preguntas básicas sobre los mecanismos de activación intracelular. Las primeras preguntas se relacionan con la habilidad de varias señales de llevar al linfocito en reposo al ciclo celular culminando en la división celular y

en la expansión de la clona reactiva. Por lo tanto los estudios iniciales de activación de linfocitos se substituyeron con ensayos que involucran la cuantificación de RNA y DNA.

Los estudios *in vitro* sobre la expresión de receptores celulares también se ha realizado durante los últimos 10 o 15 años.

Los primeros estudios emplearon anticuerpos marcados biosintéticamente o químicamente modificados para detectar cambios en la expresión del receptor siendo estas técnicas aún básicas para la detección y caracterización bioquímica de los receptores. Una vez que se ha identificado al ligando del receptor, se emplean ligandos radiomarcados para determinar el número de receptores y su afinidad. En muchos casos las consecuencias de la unión ligando-receptor están siendo ya delimitadas. Los sistemas intracelulares de segundos mensajeros pueden involucrar una vasta variedad de cambios incluyendo la despolarización de la membrana, cambios en el transporte iónico (por ejemplo:  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ), la fosforilación y desfosforilación de proteínas citoplasmáticas o de membrana, la relocalización del receptor (por ejemplo: en el núcleo), la unión de proteínas al DNA y cambios en la expresión de genes, seguida de la síntesis de una nueva proteína. Muy pocos de estos eventos de activación intracelular pueden ser detectados *in vivo* y por lo tanto los estudios *in vitro* son de primera importancia.

Otra ventaja obvia de los modelos *in vitro* de la respuesta inmune es la habilidad de disectar la respuesta en los requerimientos para una célula en particular o una interacción molecular específica. Intentos similares *in vivo* son actualmente imposibles o requieren de técnicas quirúrgicas muy complejas además de una gran fuente de recursos como son animales y reactivos químicos y biológicos. En el caso de los estudios en humanos las alternativas *in vivo* serían no éticas.

Hay sin embargo varias desventajas y circunstancias aleatorias en los modelos de inmunidad *in vitro*. Primero, no evalúan en su totalidad los eventos reguladores que controlan la respuesta inmune (Lefkovits I, Waldman H). Se aísla y se estudia una pequeña pieza del sistema inmune total y esa pieza puede funcionar de modo muy diferente aislada que *in vivo*, por tanto las predicciones *in vivo* de todos los modelos conceptuales desarrollados a partir de estudios *in vitro*, deben ser probadas. Hay también numerosas fallas en la interpretación de datos. Se requiere por ello del uso de controles extensivos para determinar que de hecho se está midiendo lo que se cree que se está midiendo y que los datos no son un efecto secundario de alguna interacción intracelular no conocida. El hecho de aislar una pieza del sistema inmune a partir de la regulación *in vivo* puede inducir respuestas “espontáneas” que tengan muy poco o nada que ver con la estimulación *in vitro*. La viabilidad de las células que no responden, frecuentemente decrece rápidamente *in vitro* y la liberación de enzimas intracelulares puede alterar la respuesta inmune. Esta pérdida de viabilidad en los cultivos al paso del tiempo resulta en un cambio constante de la relación numérica entre los distintos tipos de células. Frecuentemente es justamente la variable incontrolable y desconocida, la falla del modelo *in vitro*.

Sin embargo y a pesar de lo anterior, el uso de modelos *in vitro* sigue siendo indispensable e imposible de substituir para proseguir con el entendimiento del funcionamiento del sistema inmune y todas las reacciones e interacciones que en él se ven implicadas.

## **OBJETIVO**

Generar un modelo experimental para el estudio del procesamiento y presentación de antígeno, en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).

## **HIPÓTESIS**

Si la transfección de fibroblastos murinos LK<sup>k</sup> con una secuencia de lisozima de gallina (para ser secretada al medio) es eficiente, entonces, el hibridoma de linfocito T específico en contra de dicha secuencia, se estimulará al cultivarse con los fibroblastos transfectados (produciendo IL-2).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### El plásmido y su construcción genómica.

El plásmido utilizado para la transformación de bacterias fue el p $\beta$ APr1-neo-HELs pFM 120.1, que codifica para la proteína quimérica LG(1-80)-K<sup>k</sup>, el cual fue generado a partir del plásmido pSP72 (obtenido de Promega Biotec) (FIG.13), gracias a que el sitio de clonación múltiple de dicho plásmido contiene un número suficiente de sitios de restricción para permitir la clonación de diversos fragmentos utilizando hasta 16 nucleasas de restricción.

p $\beta$ APr1-neo-HELs contiene los dos primeros exones del gen de HEL, en los cuales están incluidos el codón de iniciación (ATG), la secuencia que codifica para los primeros 80 a.a. de la lisozima madura, esta secuencia de p $\beta$ APr1-neo-HELs se secreta al medio (Moreno J, Vignali D).

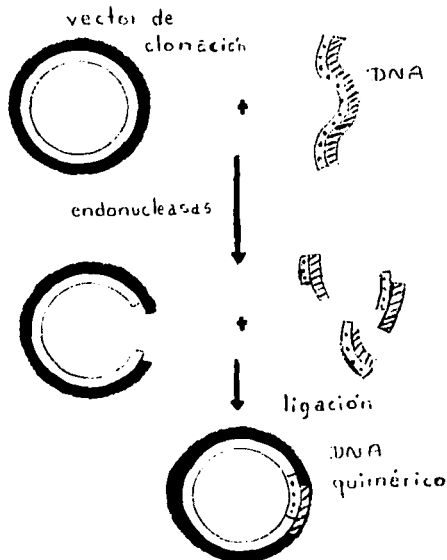


FIG. 7 Construcción del Plásmido.

Para finalizar, el inserto completo de pHBAPr1-neo-HELs (3200pb) fue cortado con **Sall** y **EcoRI** y ligado en sitios similares del vector pHBAPr-1-neo, que contiene el promotor de  $\beta$  actina humana, además este vector contiene el gen de resistencia a neomicina lo cual hace posible la selección con el antibiótico aminoglucósido G418 después de transfectar la construcción completa en las células deseadas (FIG. 7).

### **Elaboración de bacterias competentes por el método de Cloruro de Calcio (CaCl<sub>2</sub>).**

Este procedimiento es una variación de aquel descrito por Cohen et al. en 1972, se usa frecuentemente para preparar una provisión de bacterias competentes que llevarán a la producción de  $5 \times 10^6$  a  $2 \times 10^7$  colonias transformadas por microgramo de DNA superenrollado de plásmido. Esta eficiencia es lo suficientemente alta para permitir una clonación de plásmidos de manera rutinaria. Este procedimiento funciona bien con la mayoría de los tipos de *E.coli*, es rápido y muy reproducible. Se tomó una colonia de un crecimiento fresco en medio LB agar, (la cepa de *E.coli* empleada es la DH5 $\alpha$ , la cual es resistente al ac.nalidíxico, tiene complementación  $\alpha$ , selección Blanco<sup>+</sup>/Azul<sup>-</sup> Lac-z F-, Puc-), se incubó el cultivo por 3 horas a 37°C en 100 ml de LB con agitación vigorosa, el crecimiento de las bacterias se monitoreo con la determinación de la densidad óptica a 600 nm cada 30 min para evitar que el cultivo excediera de  $10^8$  células por mililitro (0.5 - 0.6 DO). Se transfirieron de manera aséptica las células a tubos Falcon de 50 ml previamente enfriados en hielo y se enfrió el cultivo a 0°C manteniéndolo en hielo. Se centrifugó a



4000 rpm por 10 min a 4°C y se decantó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla (o pellet) en 10 ml de  $\text{CaCl}_2$  frío 0.1 M y se mantuvo en hielo, las células después de 1 hora se centrifugaron nuevamente a 400 rpm por 10 min más.

Se decantó el sobrenadante, y se resuspendió la pastilla en 1/10 del volumen inicial de medio de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M estéril. En este momento las bacterias estaban listas para la transformación.

### **Transformación de *E.coli* DHS $\alpha$**

Se tomaron 200  $\mu\text{l}$  del paso anterior y se añadió 1  $\mu\text{l}$  de DNA en un volumen total de 10  $\mu\text{l}$  (Con  $\text{CaCl}_2$ ), se incubó en tubo de vidrio estéril durante 1 hora y se transfirió súbitamente a un Termo Block a 42°C dejando el tubo exactamente 90 segundos, procurando no agitar los tubos, al cabo de este tiempo se transfirieron los tubos nuevamente al baño de hielo dejándolos ahí por 5 min antes de agregar 1 ml de medio **LB** y dejarlo incubando una hora a 37°C.

Después de esto se plaquearon varias cajas de **LB agar** con ampicilina, con un volumen de 20  $\mu\text{l}$  y 100 ó 200  $\mu\text{l}$ . Se incubó toda la noche a 37°C.

## **Purificación del plásmido.**

### **(Midipreps)**

Se cultivaron bacterias portadoras del plásmido deseado, a partir de una colonia, en 100 ó 200 ml de medio **DYT** o **LB-ampicilina**, a 37°C con agitación constante durante 18-20 hrs. Al finalizar la incubación, los cultivos fueron centrifugados en tubos de 50 ml a 6000 rpm. Se decantó el sobrenadante y el botón bacteriano fue resuspendido en 1.5 ml de **solución A**. A esta suspensión se agregaron 6 ml de **solución B** y se mezcló suavemente, después de lo cual se dejó 10 min en hielo. A esta mezcla se agregaron 15 ml de **solución C**, dejando la mezcla nuevamente en hielo por 10 min. A la mezcla anterior se agregaron 11.25 ml de **3M K/5M acetato** frío y se dejó otros 10 min en hielo. Esta mezcla fue centrifugada en frío a 6000 rpm. El sobrenadante fue filtrado en una gasa estéril de nylon y se desechó el precipitado (proteínas). Al sobrenadante se le agregaron 15 ml de isopropanol y se incubó 5 min en hielo, después de lo cual se centrifugó nuevamente a 6000 rpm y se desechó el sobrenadante. El botón fue redisolto en 2 ml de **TE pH 8** y después se agregaron 2 ml de **LiCl 5M** y se dejó en hielo durante 30 min. La mezcla anterior se centrifugó nuevamente a 6000 rpm en frío durante 10 min. El sobrenadante fue transferido a otro tubo al cual se añadieron 2.5 volúmenes de **etanol** 100% a -20°C. Esta mezcla se incubó a esa temperatura durante una hora, se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min y el sobrenadante fue desechado. El botón fue redisolto en 500 µl de **TE pH 8** y transferido a un tubo Eppendorf (1.5 ml). A éste se agregaron 25

$\mu\text{l}$  de RNAsa (10 mg/ml) por cada 50 ml de cultivo inicial, se incubó 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Después de esto se realizaron tres extracciones con **fenol/cloroformo** consecutivas, seguidas de una extracción con **cloroformo**. La fase acuosa fue recuperada y llevada a un volumen de 500 $\mu\text{l}$ . A esta solución se agregaron 50 $\mu\text{l}$  de **acetato de sodio 3M pH 7**, se mezcló y se agregaron 2.5 vol. de **etanol 100%**. Los tubos fueron incubados a  $-70^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron en cuarto frío, el botón fué lavado una vez con etanol 100% y una más con **etanol** al 70%, se secó en centrifuga de vacío (Speed vac de Heto, VR-1 Lab. Equipment) y se redisolvió en 200 $\mu\text{l}$  de **TE pH 7.4**. Se determinó la concentración de DNA en un espectrofotómetro Beckman DU640, de acuerdo a la densidad óptica a 260 y 280 nm. Finalmente se ajustó la concentración de DNA a 2.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  con **TE pH 7.4**.

### **Linearización del DNA de plásmido.**

Se prepararon tubos Eppendorf con 10  $\mu\text{l}$  de Buffer K 10x (para la enzima **Pvu I**), 42  $\mu\text{l}$  de agua estéril, 10  $\mu\text{l}$  de **BSA** (Albúmina sérica bovina), 30  $\mu\text{l}$  de plásmido pH $\beta$ APr-1-neo-HEL5 a una concentración de 2.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y finalmente 6  $\mu\text{l}$  de la enzima **Pvu I**, equivalente a 60 unidades para un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  por Eppendorf (como se sugiere por Amersham International Life Science, proveedora de la enzima). Esto se incubó durante 4hrs. a  $37^{\circ}\text{C}$ , al término de este tiempo se hizo un corrimiento en gel de agarosa (en una cámara Bio-Rad Mini Sub<sup>TM</sup> DNA Cell) con el plásmido antes y después de la digestión.

Una vez linearizado el DNA con la enzima de restricción Pvu I, se procedió a su purificación por el método del Fenol. Se añadió a cada tubo Eppendorf 500 µl de Fenol, se agitó 20 min y se centrifugó 15 min a máxima velocidad, se separó la fase acuosa y se le añadieron 500 µl de Fenol/cloroformo procediendo del mismo modo que en el paso anterior (agitación y centrifugación), nuevamente se tomó la fase acuosa y se añadió un volumen de 500 µl de cloroformo repitiendo el procedimiento. A esta última fase acuosa se añadió Etanol al 100% frío (-20°C) hasta una concentración final del 70%. Se dejó toda la noche a -70°C se centrifugó al día siguiente y se lavó con etanol al 70% frío y se secó con Speed Vac, resuspendiendo la pastilla con TE. Se determinó nuevamente su concentración por D.O., siendo esta de 1µg/µl.

#### **Transfección de Fibroblastos murinos.**

El uso de impulsos eléctricos para introducir DNA a células en cultivo se ha llamado electroporación, método que fue descrito por Neumann. El método se ha usado para introducir DNA en una gran variedad de células animales, de plantas y recientemente en bacterias, este método se ha utilizado ya sea para una expresión transitoria como para una transformación estable. Es esencial realizar experimentos preliminares para determinar las condiciones que llevarán a niveles aceptables de transformación para una línea celular en particular, ya que ésta se ve influenciada por un gran número de factores (Presse F, Quillet A, Mir L et al.) Para determinar el voltaje inicial, fue necesario emplear

la técnica del Amarillo Lucifer CH (ab. 450-490 nm; em. mayor a 525nm) la cual por medio de la incorporación de este compuesto fluorescente permite estimar la incorporación de DNA por parte de las células electroporadas, lo cual en conjunto con la tinción con Azul Tripán, que permite estimar la viabilidad después de la electroporación, es posible establecer el voltaje óptimo para una viabilidad e incorporación de DNA adecuada (Sczakiel G, Doffinger R, Pawlita M). Los fibroblastos murinos LK<sup>x</sup> fueron transfectados por este método, mediante un electroporador Cell-Porator BRL (Life Technologies, Inc.), equipado con un extensor de capacitancia y amplificador de voltaje. Antes de la transfección las células que se encontraban en fase logarítmica de crecimiento fueron lavadas 3 veces y resuspendidas en PBS pH 7.4 sin suero a una densidad de  $10 \times 10^6$ /ml. Para la transfección se utilizaron 500  $\mu$ l de suspensión celular ( $5 \times 10^6$  células), los cuales fueron colocados en cámaras (cuvettes de Gibco BRL) para electroporación de células eucariotes. Se utilizaron 20  $\mu$ g del DNA correspondiente al plásmido pH $\beta$ APr-1-neo-HELs previamente linearizado y purificado. Las celdas fueron sometidas a corriente eléctrica con una intensidad de 120 mV y con capacitancia de 800  $\mu$ F. Después de electroporar, las células se diluyeron y cultivaron en pozo de 3 ml en medio RPMI suplementado al 20% con SFB, durante 24 hrs, después se cultivaron en medio con 300  $\mu$ g/ml del aminoglucósido G-418 (geneticina), concentración previamente determinada mediante el cultivo en pozos de 2 ml con  $1 \times 10^5$  células en cada uno y concentraciones crecientes de G-418, para determinar así, la concentración letal para las células no transfectadas. Las células que sobrevivieron, se mantuvieron en cultivo con 250  $\mu$ g/ml de geneticina y se dejaron crecer para ensayo final de presentación de antígeno.

## **Estudios de presentación de antígeno**

Los cultivos se realizaron en microplacas de cultivo con 96 pozos. Habitualmente se cultivaron  $5 \times 10^4$  células del hibridoma de T con número variables de CPA, que fueron los fibroblastos con o sin transfectar. Los cultivos se incubaron durante 24 hrs a  $37^\circ\text{C}$  en un volumen final de 200  $\mu\text{l}$ , después de lo cual se obtuvieron 100  $\mu\text{l}$  de sobrenadante, los cuales fueron transferidos a pozos de cultivo con  $1 \times 10^4$  células CTLL-2 en un volumen de 100  $\mu\text{l}$ . A las 18 hrs se agregó un equivalente de 1  $\mu\text{Ci}$  de Timidina marcada, dejando el cultivo por 10 hrs, al final de dicho periodo se determinó su proliferación con base en su capacidad de incorporar timidina marcada con  $^3\text{H}$  ( $^3\text{H-TdR}$ ) de Amersham Int., lo que se determinó en un contador de líquido de centelleo Beckman LS 6000SE. Las células denominadas CTLL-2 son una línea de linfocitos T citotóxicos murinos que tienen la característica de depender de la presencia de interleucina-2 para proliferar y sobrevivir en cultivo.

## **RESULTADOS**

### **Generación de Bacterias Competentes y Transformación con CaCl<sub>2</sub>**

Se siguió la metodología en ambos casos, después de plaquear y de incubar a 37°C, por 24 horas, se encontró en ambas cajas petri (plaqueadas con 20 y 200 µl de suspensión celular) con LB-agar-ampicilina, la formación de colonias características de la cepa de *E.coli*, la cual por el hecho de haber sobrevivido (eficiencia del 60%) a tal concentración de ampicilina, demuestra el éxito de la transformación.

Para probar la eficacia del medio con ampicilina, se llevó de manera simultánea un control de bacterias sin transformar inoculadas a los medios sólido y líquido, siendo el resultado, la ausencia de crecimiento bacteriano.

### **Purificación del Plásmido (Midi-Preps).**

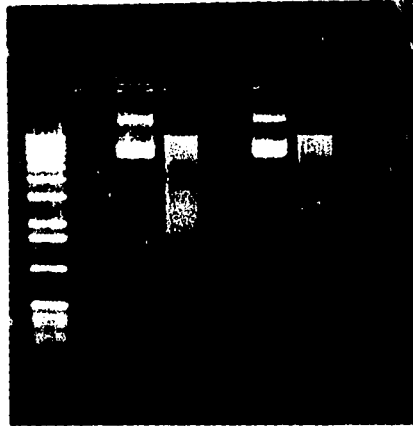
Se siguió con la metodología correspondiente, después de ajustar el volumen a 500 µl, se determinó el contenido de DNA y su pureza a 260 y 280 nm, encontrando que la

concentración era de 2.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y que la muestra estaba pura, ya que no hubo absorbencia en la longitud de onda para proteínas (280nm).

Para comprobar que el plásmido purificado era aquel correspondiente a la construcción pHBAPr1-neo-HEL5, se hizo un corrimiento electroforético del DNA purificado en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, comparado con el plásmido original del que se partió para la transformación de la cepa de *E.coli*. El gel se corrió por 2.5 hrs a 60V, el corrimiento de las muestras se reveló con luz UV, de esta manera se observó que efectivamente el plásmido purificado corresponde al plásmido original (FIG 8).



**FIG. 8 Electroforesis en Gel de Agarosa.**



1 2 3 4 5 6 7 8

**Carril No.:**

- 1 Pesos Moleculares ( Fago  $\lambda$  + Hind III )**
- 3 y 4 Plásmido obtenido sin y con digerir respectivamente.**
- 6 y 7 Plásmido original sin y con digerir respectivamente.**

**FALLA DE ORIGEN**

## **Linearización del plásmido con enzimas de restricción.**

El plásmido purificado fué linearizado con la enzima Pvu I, el cual tiene un sitio de restricción. Para comprobar la digestión del plásmido por parte de la enzima, se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, con el plásmido antes de linearizar y después de linearizar, de igual forma, con el control del plásmido original con y sin digerir. Se observó la linearización del plásmido, dada la banda característica del fragmento obtenido, la cual coincide con la del plásmido original.

Después de esto, dada la enzima empleada en la linearización, fue necesario purificar nuevamente el DNA obtenido, ésto se hizo por el método del Fenol/Cloroformo, haciendo extracciones sucesivas, separando siempre la fase acuosa y finalmente precipitando con etanol frío. Fue necesario estimar nuevamente la concentración de DNA resuspendido en T.E., la concentración final resultó ser de 1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

## **Transfección por electroporación de los fibroblastos murinos LK<sup>k</sup>**

Primero se determinó la concentración de geneticina (G418) como antibiótico seleccionador de las clonas transfectadas, la concentración a la que los fibroblastos fueron sensibles resultó ser de 300  $\mu\text{g/ml}$  de G418.

Después se estandarizó el voltaje al cual se debía electroporar, habiendo un equilibrio entre la mayor viabilidad y la mayor incorporación de DNA (FIG. 9 y 10), ésto fue posible determinarlo con ayuda del reactivo Amarillo Lucifer CH, el voltaje empleado finalmente fue de 120V con capacitancia de 800  $\mu\text{F}$  (FIG. 12-15), donde la viabilidad era del 30% y la incorporación de DNA del 90 % (FIG. 11).

Posterior a la electroporación bajo las condiciones establecidas, las células se cultivaron en medio RPMI suplementado al 20% con SFB durante 24 hrs al cabo de las cuales, se cultivaron en medio RPMI suplementado al 10% de SFB con geneticina a la concentración de 250  $\mu\text{g/ml}$ , durante 7 días, en este tiempo sólo algunas células lograron sobrevivir, estas células se siguieron cultivando en medio con geneticina pero a una concentración de 250  $\mu\text{g/ml}$  y se prepararon para el ensayo de presentación de antígeno.

# Viabilidad respecto al Voltaje

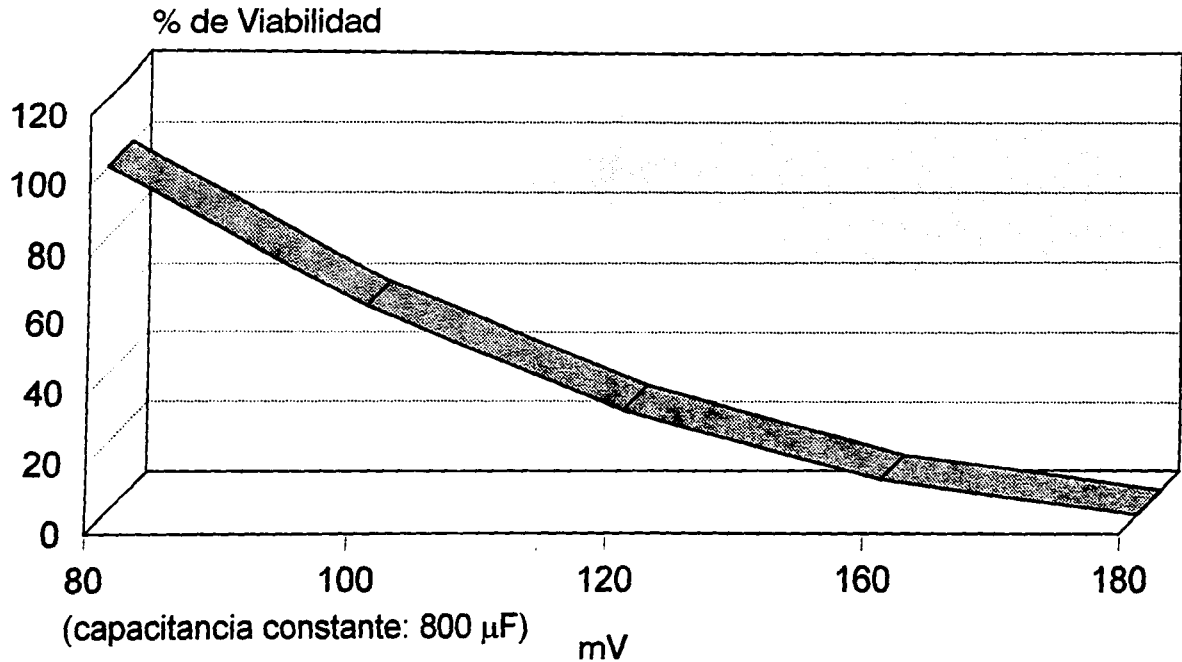


FIG. 9 Viabilidad respecto al voltaje.

# Incorporación de Am. L. CH respecto a la Viabilidad

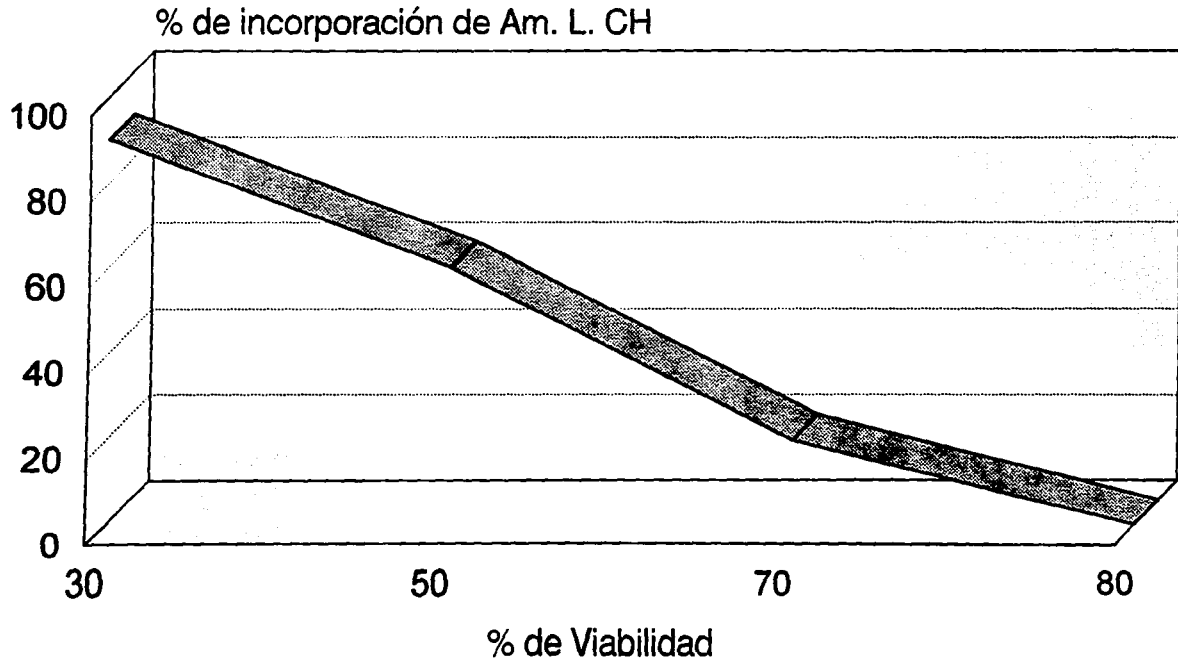
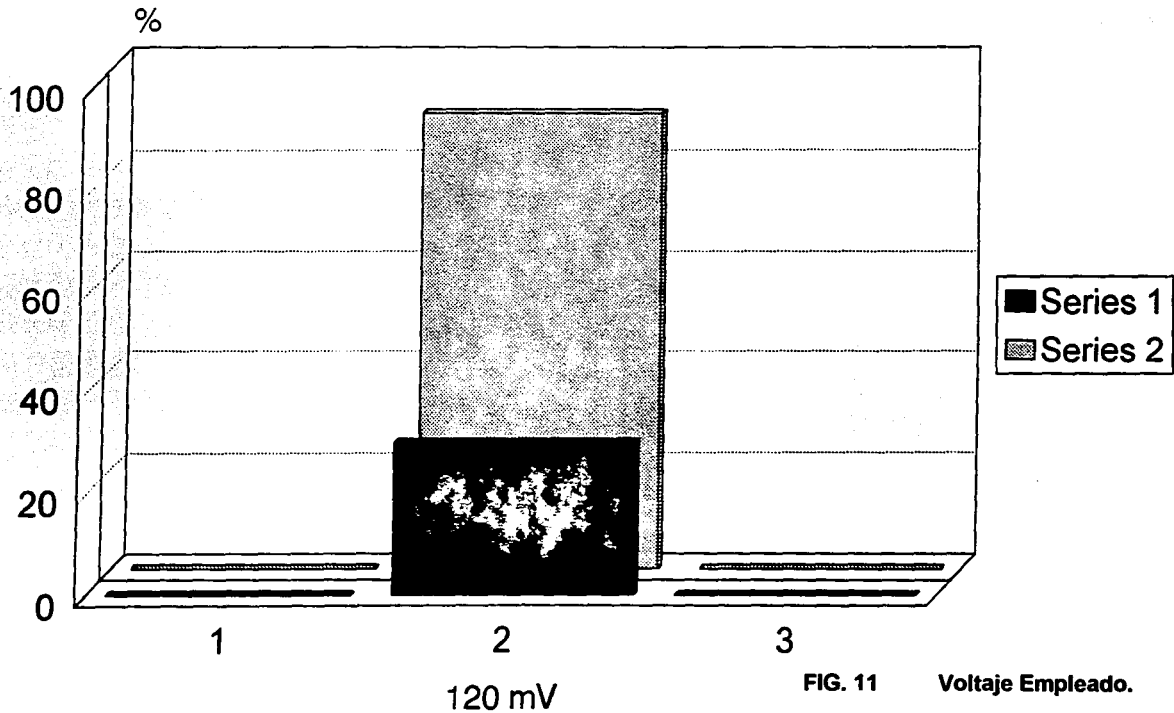


FIG. 10 Incorporación de Am. L. CH.

La viabilidad corresponde al voltaje de la gráfica anterior.

# Voltaje empleado

Para la Electroporación de Fibroblastos.



FALLA DE ORIGEN

57

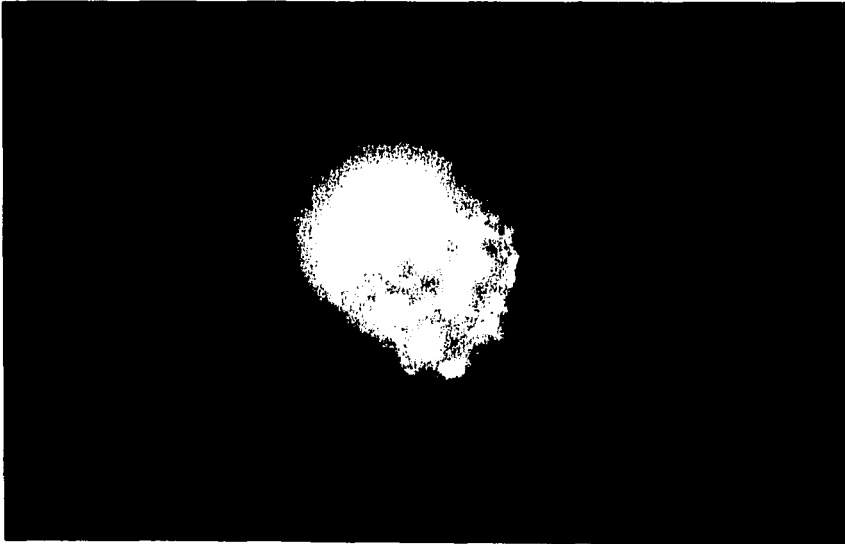
FIG. 11

Voltaje Empleado.

Serie 1: % Viabilidad Serie 2: % Incorporación de DNA



**FIG. 12** Tinción Bromuro de Etidio/Amarillo Lucifer: Células muertas con o sin incorporación de Amarillo Lucifer.



**FIG. 13** Tinción Bromuro de Etidio/Amarillo Lucifer: Célula viva con incorporación de Amarillo Lucifer.

FALLA DE ORIGEN

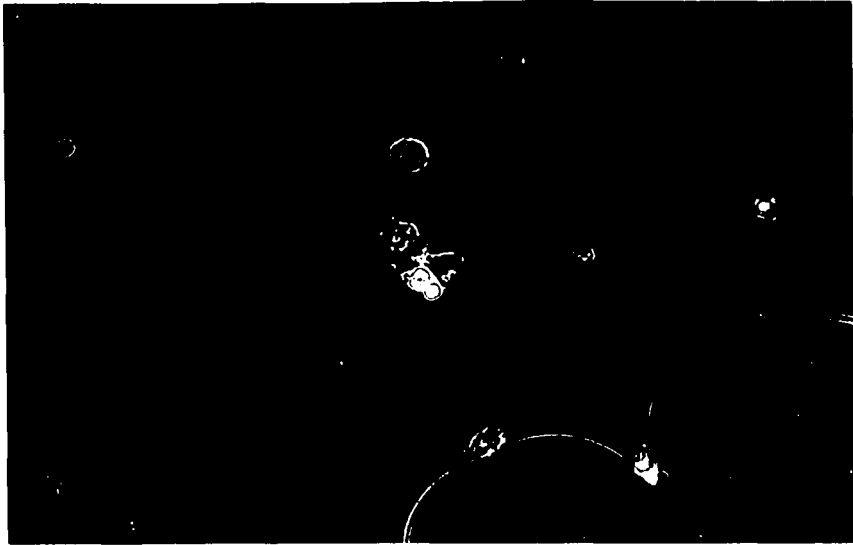


FIG. 14

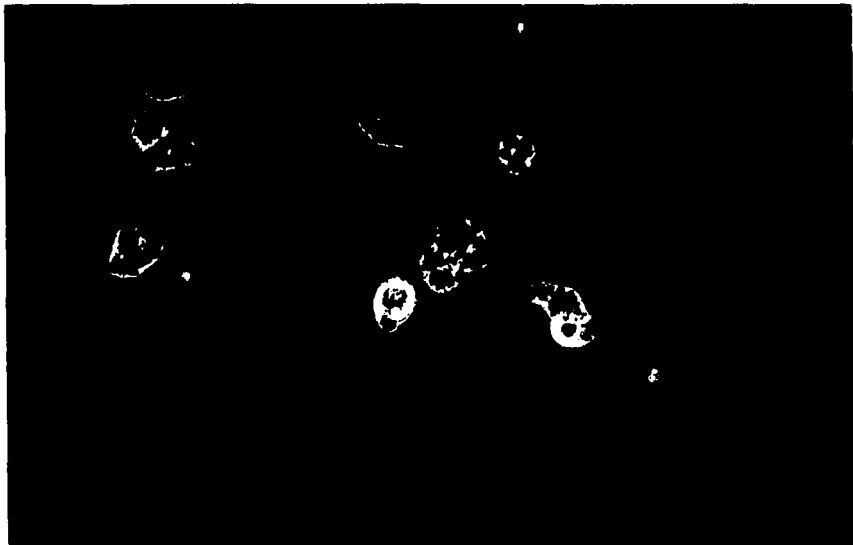


FIG. 15 Tinción Bromuro de Etidio/Amarillo Lucifer: Células muertas (anaranjadas) y vivas que incorporaron Amarillo Lucifer.

59

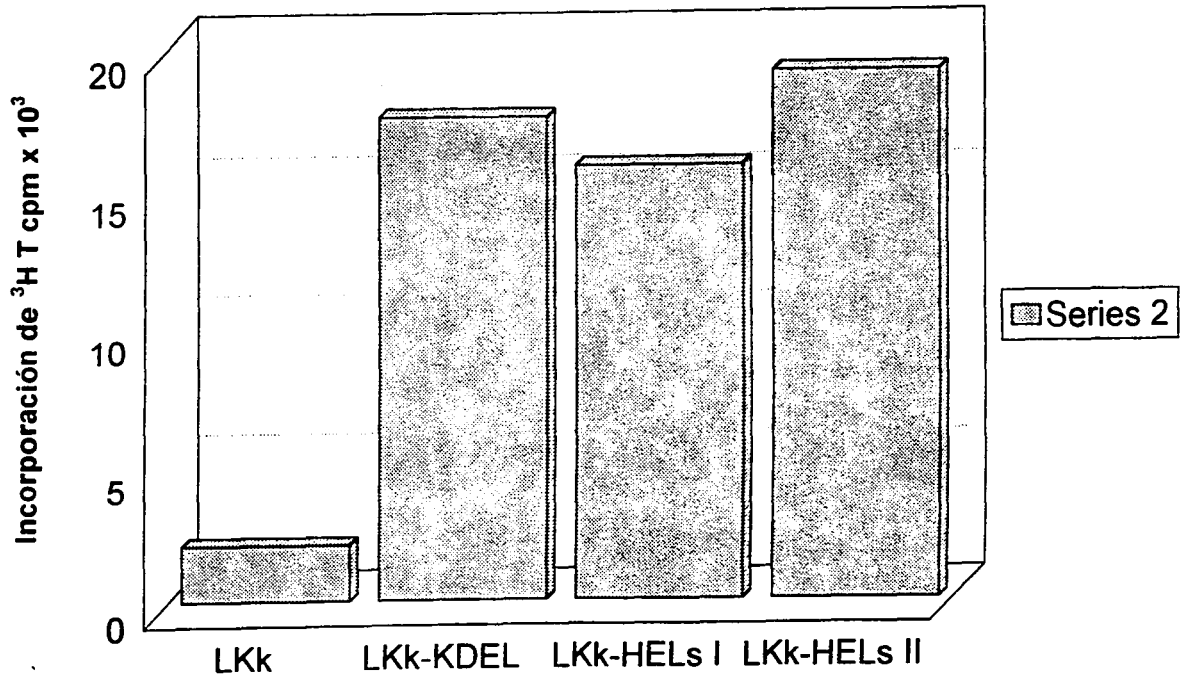
FALLA DE ORIGEN



## **Presentación de Antígeno**

Se siguió la metodología correspondiente. Se utilizó el hibridoma de T: A6B3 (con restricción a moléculas I-A<sup>k</sup> y que reconoce el residuo 34-45 del péptido de LG), y dos grupos de células presentadoras de antígeno LK<sup>k</sup> HELs, que fueron probadas por duplicado. También se utilizó LK<sup>k</sup> como control negativo y LK<sup>k</sup> KDEL como control positivo. Al cabo de 24 hrs se tomaron 100 µl de sobrenadante y se transfirió a pozos con CTL's, a las 18 hrs se añadió Timidina tritiada y a las 28 hrs se midió proliferación por incorporación de Timidina marcada. En los pozos donde se encontraban los CTLL-2 con los sobrenadantes de LK<sup>k</sup> HELs se podía apreciar al microscopio la proliferación de células, al igual que en los pozos control (con sobrenadante de LK<sup>k</sup> KDEL), mientras que en los pozos con sobrenadante de LK<sup>k</sup> o en los pozos de control negativo para CTL's (células citotóxicas con medio RPMI) no se observó ninguna proliferación. Los resultados obtenidos después de cosechar y realizar la lectura en el contador de líquido de centelleo, se muestran en la FIG. 16.

# Presentación de Antígeno



Serie 2: Hibridoma A6B3

CPA's

FIG. 16

Presentación de Antígeno.

## **DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

### **Y CONCLUSIONES**

Los fibroblastos murinos LK<sup>k</sup> electroporados bajo condiciones ideales previamente determinadas, incorporaron y expresaron la construcción genómica para la producción y secreción de lisozima de huevo de gallina (1-80a.a.), esta línea de células adherentes ahora llamada LK<sup>k</sup> - HELs, genera el péptido endógenamente y lo presenta por moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad clase II, por lo que el hibridoma específico (A6B3) restringido a moléculas clase II (I-A<sup>k</sup>) se estimuló produciendo IL-2.

Para la estimulación del hibridoma se emplearon células de cultivo total, por lo que será necesario clonar aquellas células funcionalmente más eficientes en la estimulación siguiendo la metodología de dilución limitante.

Existen dos posibilidades que pueden estar presentes de forma independiente o de manera simultánea, para el procesamiento de la lisozima y su presentación: la secreción de lisozima al medio para su posterior endocitosis y unión a moléculas clase II, en un compartimiento de la vía endocítica (Allen PM). Se ha encontrado un sitio en esta vía que está muy relacionado con los endosomas y lisosomas clásicos aunque difiere de ellos, donde las moléculas clase II son más abundantes (Peters PJ), este compartimiento

endocítico tardío denominado MIIC es un candidato para el sitio de unión de péptidos exógenos. Harding, Collins y colaboradores (1991) demostraron que el procesamiento y generación de péptidos inmunogénicos de LG ocurre en los lisosomas o en un compartimiento similar y no en los endosomas tempranos como había sido sugerido inicialmente por Guagliardi LE, (1990).

La otra posibilidad es la degradación interna del péptido generado y su unión a moléculas clase II para su presentación en superficie, como un ejemplo más de la presentación de péptidos derivados de proteínas endógenas por moléculas clase II (Jin Y, Nuchtern JG). En ocasiones, dicha presentación es independiente de la acidificación de la vía endocítica (Chen BP), lo cual mantiene vigente la posibilidad de que algunos péptidos endógenos pudieran unirse al heterodímero clase II antes de llegar a un compartimiento de la vía endocítica.

En base a lo anterior queda por aclarar: ¿existe más de un compartimiento de la vía endocítica en donde se procesen los antígenos exógenos? y ¿en qué compartimientos pueden ser procesados los antígenos endógenos para su presentación por moléculas clase II?

Se cuenta con transfectantes que producen formas distintas de lisozima, la HEL-KDEL (HEL: abreviatura en inglés de LG) que con esta señal de 4 a.a. resulta en la retención en Retículo Endoplásmico, de manera que la lisozima no se secreta ni avanza

mas allá de la vía biosintética, la forma truncada del gen de LG que codifica para el péptido señal más los primeros 80 a.a. de la proteína madura, esta secuencia está unida a una región transmembranal y otra pequeña intracitoplásmica, esta forma de LG no se secreta y su comportamiento intracelular debería ser diferente al de otras formas. Y la recién generada LK<sup>k</sup>-HELS que secreta la lisozima al medio.

Con todas estas formas se podrán hacer inmunolocalizaciones intracelulares de las diferentes formas de LG, inmunoprecipitaciones de células transfectantes marcadas biosintéticamente con <sup>35</sup>S-Met y por medio de inhibidores de vías de procesamiento se podrán seguir con mayor claridad las distintas rutas y posibilidades de procesamiento, unión a moléculas del MHC y presentación de antígenos endógenos y exógenos, de lo que puede resultar la generación de diversos determinantes según el origen del antígeno. Siendo lo anterior de considerable relevancia en la patogenia de algunas enfermedades autoinmunes.

Sólo el 5% de los linfocitos T inmaduros generados en el timo se desarrollan para formar parte del repertorio de linfocitos T periféricos. Las células se seleccionan por interacciones entre el RLT y las moléculas clase I o II del MHC en la corteza tímica. La unión de péptidos propios unidos a moléculas del MHC propias media tanto la selección positiva como la negativa. Esta última implica la eliminación de clonas autorreactivas durante la maduración intratímica llevando a una tolerancia frente a muchos autoantígenos.

En estudios recientes se ha encontrado que no se requiere de un péptido especial para discriminar entre una selección positiva o negativa. Un sólo péptido puede inducir sea una u otra dependiendo de la concentración o de la afinidad de la unión, esto va en contra de la noción de que diferentes tipos de péptidos propios pueden ser producidos por diferentes células diferenciadoras que cuando se reconocen por el RLT de los timocitos conducen a una selección positiva o negativa y que el rol de las moléculas de adhesión es importante pero puede estar limitado (Sebzda E).

La avidez de la interacción entre timocitos y elementos estromales, se refleja en el número de RLT's comprometidos con moléculas del MHC a un mismo tiempo, por lo que un parámetro importante en el control del destino de los timocitos parece ser justamente éste (Allen P). Cuando el número es bajo (baja concentración del péptido o péptidos ligeramente diferentes al del RLT específico) ocurre una selección positiva (Ashton-R) y cuando es un número alto se da lugar a la selección negativa.

La evidencia de que mecanismos de control inmune pueden fallar algunas veces hace pensar en los diferentes problemas de procesamiento y presentación de antígeno en momentos tan cruciales como la maduración intratímica y la importancia de conocer mejor los mecanismos normales y patológicos del proceso.

## **APÉNDICE I**

### **Glosario de Términos.**

**Adyuvante:** Compuesto capaz de potenciar una respuesta inmunitaria.

**Adyuvante completo de Freund:** Emulsión de aceite y agua que contiene micobacterias muertas, e incrementa las respuestas inmunitarias cuando se mezcla con antígeno en una emulsión.

**Alergenos:** Antígenos que dan lugar a la alergia.

**Alergia (hipersensibilidad):** Enfermedad o reacción provocada por una respuesta inmunitaria a uno o más antígenos ambientales que provoca inflamación tisular y disfunción de un órgano.

**Anergia:** Estado de disminución o ausencia de la inmunidad celular, según se demuestra por la incapacidad para reaccionar a una batería de antígenos acostumbrados.

**Anergia clonal:** Teoría de que la tolerancia de células B está inducida por contacto entre antígeno y célula B durante la fase paralizante obligatoria o fase de tolerancia y sensibilidad de la diferenciación de células B.

**Anticuerpo:** Proteína producida a causa de la introducción de un antígeno, y que tiene la capacidad de combinarse con el antígeno que estimuló su producción.

**Anticuerpos Monoclonales:** También llamados moléculas monoclonales de inmunoglobulina, son copias idénticas de un anticuerpo que consisten de una clase de cadena H y un tipo de cadena L.

**Autoanticuerpo:** Anticuerpo contra antígenos propios.

**Célula presentadora de antígeno:** Célula que procesa un antígeno proteínico al fragmentarlo en péptidos que se presentan en la superficie celular unidos a moléculas del MHC para su interacción apropiada con los receptores de la célula T. Pueden llevar a cabo esta función las células B, T y dendríticas.

**Células accesorias:** Células linfoides predominantemente del linaje monocito y macrófago, que colaboran con linfocitos T y B en la formación de anticuerpo y otras reacciones inmunitarias.

**Células dendríticas:** Células mononucleares que presentan antígenos en el tejido linfoide, pero son diferentes del linaje de monocitos y macrófagos.

**Células efectoras:** Término que generalmente se refiere a células T capaces de mediar citotoxicidad, supresión o función colaboradora.

**Citocinas:** También llamados mediadores de la inmunidad celular, son productos solubles de los linfocitos, causantes de los múltiples efectos de una reacción inmunitaria celular.

**Clases de inmunoglobulinas:** Subdivisión de moléculas de inmunoglobulinas basada en determinantes antigénicos únicos en la región Fc de las cadenas H. En humanos hay cinco clases de inmunoglobulinas denominadas IgG, IgA, IgM, IgD e IgE.



**Clona:** Grupo de células en el cual todas son progenie de una sola célula.

**Complemento:** Sistema de proteínas séricas que es el mediador humoral primario de las reacciones antígeno-anticuerpo.

◀

**F(ab)'<sub>2</sub>:** Fragmentos obtenidos por digestión con papaina, de moléculas de inmunoglobulina que contiene dos cadenas H y dos L, unidas por puentes disulfuro. Poseen actividad captadora de antígeno. Dos fragmentos Fab y uno Fc constituyen una molécula entera monomérica de inmunoglobulina.

**Hibridoma:** Línea celular transformada que crece *in vivo* o *in vitro* y que es un híbrido somático de dos líneas celulares paternas, y contiene material genético de ambas.

**Idiotipo:** Determinante antigénico único presente en anticuerpo homogéneo o proteína de mieloma. El idiotipo parece representar la antigenicidad del sitio captador de antígeno en un anticuerpo y por lo tanto, se localiza en la región V.

**Inmunógeno:** Sustancia que al introducirse al organismo, estimula la respuesta inmunitaria. El término inmunógeno también puede denotar a una sustancia capaz de estimular una respuesta inmunitaria en contraste con una sustancia que solo se puede combinar con anticuerpos, por ejemplo: un antígeno.

**Interleucina:** Factor químicamente definido producido por leucocitos u otras células, y que tiene efectos biológicos definidos.

**Linfocitos activados:** Linfocitos que se han estimulado por antígeno específico o mitógeno inespecífico.

**Receptor de Fc:** Receptor presente en varias subclases de linfocitos, para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas.

**Sistema fagocítico mononuclear:** Células mononucleares que se encuentran primeramente en el tejido conectivo reticular de órganos linfoides y otro tipo de tejidos, y que son importantes en los estados inflamatorios crónicos.

**Tolerancia:** Generalmente se refiere a una condición en la cual las clonas de células respondedoras han sido eliminadas o inactivadas por contacto previo con el antígeno, con el resultado de que no hay respuesta inmunitaria a la administración de ese antígeno.

## **APÉNDICE II**

### **Soluciones y Reactivos.**

#### **Amortiguador salino fosfatos (PBS) pH 7.7 0.15 M:**

NaCl 8 g; KCl 200 mg; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mg, llevados a un volumen final de 1 litro con agua bidestilada y desionizada.

#### **Amortiguador Tris/acetatos/EDTA (TAE).**

Se prepara una solución concentrada 50 veces (50x) con Tris 2 M pH 8 (242 g); ácido acético glacial 57.1 ml; EDTA 0.5 M pH 8 100 ml (50 mM). Se ajusta a pH 11 con agua bidestilada y desionizada.

#### **Amortiguador Tris/EDTA (TE).**

Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4 y pH 8 (1:1:1).

#### **Cloroformo.**

Mezcla que contiene 24 partes de cloroformo y una parte de alcohol isoamílico.

**Fenol.**

Fenol sólido (licuar en baño de 37°C), se agrega Tris 1 M pH 8 (cualquier volumen), se mezcla y se aspira el Tris, la operación se repite con Tris 0.1 M a pH 8. La operación se repite hasta que el pH del Tris sea de 8 (después de mezclar). Se cubre con suficiente TE y se mezcla con 8-hidroxiquinoleína(antioxidante). Se guarda congelado.

**Fenol/Cloroformo.**

Mezcla de 25 ml de fenol preparado, 24 ml de cloroformo y 1 ml de alcohol isoamílico.

**Gel de agarosa (para DNA).**

Agarosa ultrapura 1 g, amortiguador TAE 50x 2ml, se lleva a 100 ml con agua bidestilada y desionizada, se calienta en un horno de microondas hasta disolverse, se agregan 7.5 µl de bromuro de etidio, se deja enfriar a 50°C y se vierte en la charola para permitir su gelificación.

**Medio de cultivo bacteriano DYT (2xYT).**

Bacto-triptona 16 g, Bactolevadura 10 g, NaCl 5 g, llevar a un litro con agua bidestilada y desionizada. Para cajas de cultivo se agregan 15 g de agar. Se esteriliza en ambos casos.

**Medio de cultivo bacteriano LB.**

Bacto-triptona 100 g; Bacto-levadura 50 g; NaCl 50 g y ajustar a pH 7.4. Se lleva a un volumen de 10 litros con agua bidestilada y desionizada. Para caja de cultivo se agregan 15 g de agar por cada litro. Se esteriliza en todos los casos.

**Medio de cultivo para células RPMI 1640**

(GIBCO) suplementado con suero fetal bovino (HyClone Laboratories, Inc.) al 10%, 2-beta mercapto etanol  $5 \times 10^{-5}$  M, HEPES 25 mM, glutamina 2 mM, penicilina 100U/ml, estreptomicina 100  $\mu$ /ml.

**Potasio 3 M/Acetato 5 M.**

Acetato de potasio 5 M 60 ml, ácido acético glacial 11.5 ml y 28.5 ml de agua bidestilada y desionizada.

**Solución "A" (amortiguador de glucosa)**

Glucosa 50 mM, Tris pH 7.6 25 mM, EDTA 10 mM, en 10 ml de agua bidestilada desionizada.

**Solución "B".**

10 mg/ml de lisozima en amortiguador TE.

**Solución "C".**

SDS 1%, NaOH para una concentración final de 0.2 M.

**Solución de bromuro de etidio.**

10 mg de bromuro de etidio en 1 ml de agua bidestilada y desionizada.

## BIBLIOGRAFIA

- Adorini L, Moreno J, Momburg F, Hämmerling G, Valli A, Fuchs S, Guéry JC: Exogenous peptides compete for the presentation of endogenous antigens to MHC class II-restricted T cells. *J.Exp. Med.* **174**: 945-948, 1991.
- Allen PM: Peptides in Positive and Negative Selection: A delicate Balance. *Cell* **76**: 593-596, 1994.
- Allen PM, Babbitt BP, Unanue ER: T cell recognition of lysozyme: the biochemical basis of presentation. *Immunol. Rev.* **98**: 171-186, 1987.
- Alzari PM, Lascombe M-B, Poljak RJ: Three-dimensional structure of antibodies. *Ann Rev Immunol* **6**: 555-580, 1988.
- Amit AG, Mariuzza RA, Phillips SEV, Poljak RJ: Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution. *Science* **233**: 747-753, 1986.
- Ashton-R, Philip G, Bandeira A, Joseph RD, Kaer LV, Pircher H, Tonegawa S, Zinkernagel RM: Evidence for a differential avidity model of T cell Selection in the thymus. *Cell*, **76**: 651-663, 1994.
- Ashwell JD: Cooperation, Mechanisms of Cellular. In: *Encyclopedia of Immunology* 2nd edn (eds Roitt IM, Delves PJ), London: Academic Press, 1992.
- Benjamin DC, Berzofsky JA, East IJ *et al.*: The antigenic structure of proteins: a reappraisal. *Ann Rev Immunol* **2**:67-101, 1984.
- Berzofsky JA: Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure. *Science* **229**: 932-940,1985.
- Berzofsky JA, Brett SJ, Streicher HZ, Takahashi H: Antigen processing for presentation to lymphocytes. *Immunol Rev* **106**: 5-31, 1988.
- Bloom BR: *In vitro* approaches to the mechanism of cell-mediated immune reactions. *Adv Immunol* **13**: 101-208, 1971.
- Brodsky F: Cell biology of antigen processing and presentation. *Ann Rev Immunol* **9**:707-744, 1991.

Brooks KH: Immune Response *in vitro*. In: *Encyclopedia of Immunology* 2nd edn (eds. Roitt IM, Delves PJ), London: Academic Press, 1992.

Chen BP, Madrigal A, Parham P: Cytotoxic T cell recognition of an endogenous class I HLA peptide presented by a class II HLA molecule. *J. Exp. Med.* **172**: 779-788, 1990.

Cohen IR: The self, the world and autoimmunity. *Sci. Am.* **258**(4): 52-60, 1988.

Cresswell P: Intracellular class II antigens are accessible to transferrin-neuraminidase conjugates internalized by receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 8188-8192, 1985.

Delves PJ: Autoimmunity. In: *Encyclopedia of Immunology* 2nd edn (eds. Roitt IM, Delves PJ), London: Academic Press, 1992.

Dijkstra CD: Antigen, localization of. In: *Encyclopedia of Immunology* 2nd edn (eds. Roitt IM, Delves PJ), London: Academic Press, 1992.

Dupont B, Hansen JA, Yunis EJ: Human mixed-lymphocyte culture reaction: Genetics, specificity, and biological implications. *Adv Immunol* **23**:107-202, 1976.

Dutton RW: *In vitro* studies of immunological responses of lymphoid cells. *Adv Immunol* **6**:253-336, 1967.

Evered D, Whelan J (eds.): *Autoimmunity and Autoimmune Disease*. Ciba Foundation Symposium 129. New York: Wiley, 1987.

Falk K, Rötzschke O, Stevanovic, Jung G, Rammensee H-G: Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351**:290-296, 1991.

Geysen HM, Fainer JA, Rodda SJ, et al.: Chemistry of antibody binding to a protein. *Science* **235**:1184-1190, 1987.

Guagliardi LE, Koppelman B, Blum JS, Marks MS, Cresswell P, Brodsky FM: Co-localization of molecules involved in antigen processing and presentation in an early endocytic compartment. *Nature* **343**:133-139, 1990.

Hämmerling G, Moreno J: The function of the invariant chain in antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunology Today*, **11**: 337-340, 1990.

Harding CV, Collins DS, Slot JW, Geuze HJ, Unanue ER: Liposome-encapsulated antigens are processed in lysosomes, recycled, and presented to T cells. *Cell* **64**: 393-401, 1991.



Harding CV, Unanue ER: Cellular mechanisms of antigen processing and the function of class I and II MHC molecules. *Cell Regulat* 1:499-509, 1990.

Hodes RJ: T-cell mediated regulation: help and suppression. In: *Fundamental Immunology* 2nd edn (ed. Paul WE), pp.587-620. New York: Raven Press, 1989.

Jardecky TS, Lane WS, Robinson RA, Madden DR, Wiley DC: Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 353: 326-329, 1991.

Jin Y, Shih J, Berkower I: Human T cell response to the surface antigen of hepatitis B virus (HBsAg). Endosomal and nonendosomal processing pathways are accessible to both endogenous and exogenous antigen. *J.Exp.Med.* 168: 293-306, 1988.

Kabat EA: *Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry*. New York: Holt, Rinehart and Winston, 1976.

Klaus GGB, Humphrey JH: The fate of antigens. In: *Clinical Aspects of Immunology* 5th edn.(eds. Lachman PJ, Peters DK). Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1989.

Kronenberg M, Sciu G, Hood LE, Shastri N: The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition. *Ann Rev. Immunol.* 4: 529-591, 1986.

Kumar V, Sercarz EE: Regulation of autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 3:888-895, 1991.

Langone JJ (ed.): Antibodies, antigens and molecular mimicry. *Meth Enzymol* 178: 1-835, 1989.

Lefkovits I, Waldman H: *Limiting Dilution Analysis of Cells in the Immune System*. Cambridge University Press, 1979.

Livingstone AM, Fathman CG: The structure of T-cell epitopes. *Ann Rev Immunol* 5:477-501, 1987.

Lorenz RG, Allen PM: Processing and presentation of self proteins. *Immunol Rev* 106:115-127,1988.

Lydyard PM, Grossi CE: Immune system, anatomy of. In: *Encyclopedia of Immunology* 2nd edn.(eds. Roitt IM, Delves PJ), London: Academic Press, 1992.

Lydyard PM, Grossi CE: The lymphoid system. In: *Immunology* 2nd edn. (eds. Roitt IM, Brostoff J, Male D). London: Gower Medical, 1989.

MacDonald HR, Nabholz M: T-cell activation. *Annu. Rev. Cell Biol.* 2: 231-253, 1986.

Margalit H, Spouge JL, Cornette JL *et al.*: Prediction of immunodominant helper T antigenic sites from the primary sequence. *J Immunol* **138**:2213-2229, 1987.

Marrack P, Kappler J: The Staphylococcal Enterotoxins and their Relatives. *Science* **248**: 705-711, 1990.

Moreno J, Adorini L, Hämmerling G: Co-dominant restriction by a mixed haplotype I-A molecule ( $\alpha^k\beta^b$ ) for the lysozyme peptide 52-61 in H-2<sup>k</sup> x H-2<sup>b</sup> F1 Mice. *J. of Immunol.* **144**: 3296-3304, 1990.

Moreno J, Lipsky P: Functional heterogeneity of human Antigen-presenting cells: Presentation of soluble antigen but not self-Ia by monocytes. *J. Clin. Immunol.* **6**: 9-20, 1986.

Moreno J, Vignali D, Nadimi F, Fuchs S, Adorini L: Processing of an endogenous protein can generate MHC class II-restricted T cell determinants distinct from those derived from exogenous antigen. *J.Immunol.* **147**: 3306-3313, 1991.

Morrison LA, Lukacher AE, Braciale VL *et al.*: Differences in antigen presentation to MHC class I- and class II- restricted influenza virus specific cytolytic T lymphocyte clones. *J.Exp. Med.* **163**: 903-921, 1986.

Mosmann TR, Coffman RL: Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol* **46**: 111-147, 1989.

Nadimi F, Moreno J, Momburg F, Heuser A, Fuchs S, Adorini L, Hämmerling G: Antigen presentation of hen egg-white lysozyme but not of ribonuclease A is augmented by the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain. *Eur. J. Immunol.* **21**: 1255-1263, 1991.

Nossal GJV, Ada GL: *Antigens, lymphoid Cells and the Immune Response* New York: Academic Press, 1971.

Nuchtern JG, Biddison WE, Klausner RD: Class II MHC molecules can use the exogenous pathway of antigen presentation. *Nature* **343**: 74-76, 1990.

Parham P: Transporters of delight. *Nature* **348**: 674-675, 1990.

Parham P: Flying the first class flag. *Nature* **357**: 193-194, 1992.

Penhale WJ: Autoimmune disease, induced experimental models. In: *Encyclopedia of Immunology* 2nd edn. (eds. Roitt IM, Delves PJ), London: Academic Press, 1992.

Peters PJ, Neeffes JJ, Ooschot V, Ploegh HL, Geuze HJ: Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* **349**: 669-676, 1991.

Presse F, Quillet A, Mir L, Marchiol FC, Feunteun J, Fradelizi D: An improved electrotransfection method using square shaped electric impulses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151(3)**: 982-990, 1988.

Rose NR: Pathogenic mechanisms in autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol* **53**:S7-S16, 1989.

Rose N, Mackay I (eds.): *Autoimmune Diseases*. London: Academic Press. 1985

Rötzschke O, Falk K: Naturally-occurring peptide antigens derived from the MHC class-I-restricted processing pathway. *Immunol Tod* **12**: 447-455, 1991.

Sebzda E, Wallace Va, Mayer J, Yeung SM, Mak T, Ohashi PS: Positive and Negative Thymocyte Selection induced by different concentrations of a single peptide. *Science* **263**: 320-325.

Sela Michael: Antigens. In: *Encyclopedia of Immunology* 2nd edn. (eds. Roitt IM, Delves PJ), London: Academic Press, 1992.

Schwartz A: Cell biology of intracellular protein trafficking. *Ann Rev Immunol* **8**:195-229, 1990.

Schwartz RH: T lymphocyte recognition of antigen in association with products of the Major Histocompatibility Complex. *Ann Rev Immunol* **3**:237-261, 1985.

Schwartz RS, Rose NR(eds.): Autoimmunity: Experimental and Clinical Aspects. *Ann NY Acad Sci* **475**, 1986.

Sczakiel G, Doffinger R, Pawlita M: Testing for electrotransfection parameters by use of the fluorescent dye lucifer yellow CH. *Anal. Biochem.* **181(2)**: 309-314, 1989.

Springer TA: Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**: 425-434, 1990.

Strominger JL, Wiley DC, Jardetzky TS et al.: Cristal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* **368**: 215-221, 1994.

Talal N: Autoimmune diseases. In: *Encyclopedia of Immunology* 2nd edn. (eds. Roitt IM, Delves PJ), London: Academic Press, 1992.

Talal N(ed.): *Autoimmunity: Genetic, Immunologic, Virologic and Clinical Aspects*. London: Academic Press, 1977.

Tonegawa S: The molecules of the immune system. *Sci. Am.* **253(4)**: 122-131, 1985.

Unanue ER: Antigen Presentation. In: *Encyclopedia of Immunology* 2nd edn. (eds. Roitt IM, Delves PJ), London: Academic Press, 1992.

Unanue ER, Allen PM: Antigen Processing. In: *Encyclopedia of Immunology* 2nd edn. (eds. Roitt IM, Delves PJ), London: Academic Press, 1992.

Unanue ER, Cerottini J-C: Antigen presentation. *FASEB J* **3**:2496-2505, 1989.

Vignali D, Moreno J, Shiller D, Hämmerling G: Species-specific binding of CD4 to de  $\beta$ 2 Domain of Major Histocompatibility complex class II molecules. *J. Exp. Med.* **175**: 925-932, 1992.

Vitetta ES, Fernandez-Botran R, Myers CD, Sanders VM: Cellular interactions in the humoral immune response. *Adv Immunol* **45**:1-105, 1989.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA