



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

LOCALIZACION CITOQUIMICA DE ENZIMAS
PROTEOLITICAS EN CELULAS MALIGNAS

TESIS PROFESIONAL DE LICENCIATURA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A

GUADALUPE CERVANTES VAZQUEZ

MEXICO, D. F.

1986



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.

LOCALIZACIÓN CITOQUÍMICA DE ENZIMAS
PROTEOLÍTICAS EN CÉLULAS MALIGNAS

I N D I C E :

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MATERIAL Y MÉTODO.....	3
RESULTADOS.....	10
DISCUSIÓN.....	14
FOTOGRAFÍAS.....	16
REFERENCIAS.....	21

R E S U M E N :

LA PEROXIDASA (P) SE ACOPLÓ A LOS INHIBIDORES DE LA TRIPSINA TRAYSOL (T) Y FRIJOL SOYA (IFS). CON CADA UNO DE ESTOS ACOPLADOS (T-P, IFS-P) SE LOCALIZÓ LA DISTRIBUCIÓN CELULAR DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS (EP) DE LAS CÉLULAS ASCÍTICAS DEL LINFOMA MURINO L5178Y. LAS REACCIONES SE REVELARON POR LA REACCIÓN DE KARNOVSKY CON DIAMINOBENCIDINA Y H_2O_2 . LAS PREPARACIONES SE OBSERVARON EN MICROSCOPIO DE LUZ Y ELECTRÓNICO. SE ENCONTRÓ QUE LAS CÉLULAS L5178Y CONTIENEN EP INTRACELULARES EN GRÁNULOS DE 0.1 A 0.8 MICRAS DE DIÁMETRO Y EP SUPERFICIALES FORMANDO UNA CAPA CONTINUA DE 80 A 120 NM SOBRE LA SUPERFICIE CELULAR. LAS EP SUPERFICIALES NO SE IDENTIFICARON EN UN 20% DE LAS CÉLULAS L5178Y, MIENTRAS QUE LOS GRÁNULOS INTRACELULARES SIEMPRE ESTUVIERON PRESENTES. LOS MACRÓFAGOS Y LOS POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS PRESENTES EN EL LÍQUIDO ASCÍTICO CONTUVIERON GRÁNULOS DE EP INTRACELULARES DE 0.05 A 0.4 MICRAS DE DIÁMETRO Y NO PRESENTARON EP SUPERFICIALES.

I N T R O D U C C I Ó N

LOS CAMBIOS OBSERVADOS EN TEJIDO DE ORIGEN MESEQUIMATOSO NORMAL EN LA PERIFERIA DE TUMORES MALIGNOS, SUGIERE QUE ALGUNAS PROTEÍNAS DE RIVADAS DE LAS CÉLULAS TUMORALES ESTÁN DIGIRIENDO LA ESTRUCTURA -- PROTEÍCA NORMAL DE ÉSTE TEJIDO, LLEGANDO A TRANSFORMARLO EN UNA -- "MATRIZ GELATINOSA" ADECUADA PARA LA INVASIÓN POR EL CRECIMIENTO -- DE CÉLULAS TUMORALES. SYLVÉN DETERMINÓ LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE TUMORES DE SARCOMAS DE CARCINOMA MAMARIO Y TUMOR ASCITIS. ENCONTRANDO QUE LAS ÁREAS CENTRALES Y ZONAS NECRÓTICAS DEL TUMOR PRESENTABAN BAJA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SIMILAR A PIEL NORMAL, MÚSCULO Y GLOBULOS ROJOS Y EN LAS ZONAS PERIFÉRICAS DEL TUMOR HABÍA UNA CAVIDAD PROTEOLÍTICA ELEVADA. MÁS TARDE MALMGREN CUANTIFICÓ LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE 3 DIFERENTES TUMORES DE ASCITIS, COMPARANDO LAS DIFERENTES ETAPAS DE CRECIMIENTO TUMORAL CON LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA. (1-6).

NO OBSTANTE TODOS LOS ESTUDIOS REALIZADOS A LA FECHA, NO INDICAN -- NINGUNA LOCALIZACIÓN TOPOGRÁFICA DE LA DISTRIBUCIÓN CELULAR DE LAS EP.

EL PROPÓSITO DE ÉSTA COMUNICACIÓN ES INFORMAR ACERCA DE UN PROCEDIMIENTO PARA LA LOCALIZACIÓN DE LAS EP Y DESCRIBIR SU DISTRIBUCIÓN EN LAS CÉLULAS DE LINFOMA MURINO L5178Y.

MATERIAL Y MÉTODOS:

LINFOMA L5178Y.- SE MANTUVO POR TRANSPLANTE SERIADO EN RATONES RECEPTORES DE LA CEPA BALB/C, MACHOS, DE 30 ± 0.3 G DE PESO. CADA RECEPTOR FUE INOCULADO POR VÍA INTRAPERITONEAL CON 8×10^7 CÉLULAS L5178Y. ELLO CAUSÓ LA MUERTE DE LOS RECEPTORES A LOS 10 ± 0.2 DÍAS POSTTRANSPLANTE, CON FORMACIÓN DE 10 A 12 ML DE LÍQUIDO DE ASCÍTIS CONTENIENDO ALREDEDOR DE 2.4×10^9 CÉLULAS L5178Y POR ML. LOS PORTADORES DEL LINFOMA TAMBIÉN DESARROLLARON UN IMPLANTE TUMORAL SÓLIDO DE 1 A 2 G DE PESO SOBRE EL EPIPLÓN.

CÉLULAS L5178Y.- SE OBTUVIERON POR PUNCIÓN ASÉPTICA DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE CINCO RATONES DISTINTOS PORTADORES DEL LINFOMA, AL OCTAVO DÍA POSTTRANSPLANTE. EL LÍQUIDO SE CENTRIFUGÓ A 500 G CINCO MINUTOS Y LAS CÉLULAS SE RESUSPENDIERON EN 150 VOLÚMENES DE MEDIO DE CULTIVO-Mc Coy 5A SIN SUERO (GIBCO NEW YORK). EL LAVADO DE LAS CÉLULAS SE REPITIÓ TRES VECES. SE CONTARON LAS CÉLULAS EN CÁMARA CUENTAGLOBULOS Y MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES A 500 X. LA VIABILIDAD CELULAR SE EVALUÓ POR TINCIÓN CON AZUL TRIPÁN A CONCENTRACIÓN FINAL DE 0.05% (P/V). LAS CÉLULAS ASCÍTICAS SE REPARTIERON EN ALÍCUOTAS DE 3×10^7 CÉLULAS EN TUBOS DE ENSAYE DE 15×100 MM LUEGO SE FIJARON EN SUSPENSIÓN EN DOS ML DE GLUTARALDEHÍDO AL 1.5% (V/V) EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE CACODILATO DE SODIO 0.1 M A PH 7.4 POR 2 HORAS, SE LAVARON TRES VECES EN 100 VOLÚMENES DEL MISMO AMORTIGUADOR Y ENSEGUIDA SE EMPLEARON PARA EL MARCAJE DE LAS EP.

INHIBIDORES.- PARA EL MARCAJE DE LAS EP SE EMPLEARON EL INHIBIDOR DE LA TRIPSINA DE FRIJOL DE SOYA (IFS) DE SIGMA CHEM. CO. Y EL INHIBIDOR PANCRÉÁTICO BOVINO DE LA TRIPSINA T DE BAYER. ESTOS COMPUESTOS SE ELIGIERON POR HABERSE INFORMADO QUE SE COMBINAN EFICAZMENTE CON LOS SITIOS ACTIVOS DE UNA VARIEDAD DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DE DIFERENTES ESPECIFICIDADES (7). ESTOS INHIBIDORES SE ACOPLARON A LA PEROXIDASA-(P) (GRADO VI, SIGMA) POR EL MÉTODO DE MAKANE Y KAWAOI (8) PARA PERMITIR LA LOCALIZACIÓN EN MICROSCOPIA DE LUZ Y ELECTRÓNICA POR EL MÉTODO DE KARNOVSKY (9). ADEMÁS SE EMPLEÓ COMO INHIBIDOR DE LAS EP AL ÁCIDO

ÉPSILON-AMINO-CAPROICO (EAC, LEDERLE), EN ALGUNAS REACCIONES QUE SE DESCRIBEN MÁS ADELANTE.

ACOPLAMIENTO DE P IFS Y T.- SE SIGUIÓ EL MÉTODO DE NAKANE Y KAWAOI (8). PARA ELLO, LA PORCIÓN DE CARBOHIDRATO DE LAS MOLÉCULAS DE P - FUERON OXIDADAS CON PERIDATO DE SODIO (Na IO_4) PARA FORMAR GRUPOS - ALDEHÍDOS CAPACES DE COMBINARSE CON LOS GRUPOS ALFA Y ÉPSILON-AMINO DEL IFS Y DEL T.

PARA LA OXIDACIÓN DE LA P SE EFECTUÓ POR SEXTUPLICADO EL SIGUIENTE PROCEDIMIENTO: SE DISOLVIERON 10 MG. DE P EN 2 ML. DE UNA SOLUCIÓN DE Na HCO_3 0,3 M A PH 8,1 A LA QUE SE AGREGARON 0.2 ML. DE DINITROFLUOROBENCENO (SIGMA) AL 1% (P/V) EN ETANOL ABSOLUTO. LA MEZCLA SE AGITÓ SUAVEMENTE POR UNA HORA PARA BLOQUEAR LOS GRUPOS ALFA Y ÉPSILON-AMINO DE LA P; LUEGO SE AÑADIÓ 1 ML. DE Na IO_4 0.08 M Y SE CONTINUÓ AGITANDO SUAVEMENTE LA MEZCLA MEDIA HORA. DESPUÉS SE AGREGARON 2.0 ML. DE ETILÉN-GICOL 0.16 M Y SE AGITÓ POR UNA HORA. ENSEGUIDA, LA MEZCLA SE DIALIZÓ A 4° C CON TRES CAMBIOS DE UN LITRO DE SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ 0,5 M A PH 10. A TRES DIALIZADOS SE LES ADICIONÓ UNA AMPOLLETA DE 10 ML. DE 100,000 UNIDADES INTERNACIONALES DE T Y EL PH SE AJUSTO A 10 CON EL MISMO AMORTIGUADOR, Y A LOS OTROS 3 TUBOS SE LES ADICIONÓ IFS. LAS MEZCLAS DE LOS SEIS TUBOS SE AGITARON SUAVEMENTE DURANTE 3 HORAS PARA DAR LUGAR A QUE OCURRIERA EL ACOPLAMIENTO ENTRE LA P Y LOS INHIBIDORES.

LOS ACOPLADOS TP Y IFS-P SE REDUJERON POR ADICIÓN DE 5 MG. DE BORO-HÍDRURO DE SODIO (NaBH_4) CON AGITACIÓN SUAVE POR 3 HORAS A 4° C. - LOS ACOPLADOS SE LAVARON POR ULTRAFILTRACIÓN A TRAVÉS DE MEMBRANAS-DIAFLO PM-30 CON TRES VOLÚMENES SUSCESIVOS DE 50 ML. DE SOLUCIÓN SALINA-FOSFATOS DE DULBECO (GIBCO NEW YORK) PARA ELIMINAR EL EXCESO DE REACTIVOS. LOS ACOPLADOS SE PASARON POR UNA COLUMNA DE SEPHADEX G-50 (20 X 2 CM.) QUE SE LAVO CON EL MISMO AMORTIGUADOR; LOS ACOPLADOS APARECIERON EN EL PRIMER PICO Y A LA ELECTROFESIS EN AGAROSA-MOSTRARON UNA SOLA BARDA. LOS CONJUGADOS DE T-P Y IFS-P SE DISOLVIERON EN 10 ML. DE LA ÚLTIMA SOLUCIÓN Y SE REPARTIERON EN ALÍCUOTAS DE 1 ML. CADA UNA Y SE CONGELARON A -70° C HASTA EL MOMENTO DE USARSE PARA EL MARCAJE DE LAS EP.

TODOS LOS PASOS ANTERIORES SE EFECTUARON A 20° C, SALVO AQUELLOS-
EN QUE SE ESPECIFICÓ 4° C.

MARCAJE DE LAS EP.- PARA QUE LAS REACCIONES TUVIERAN VALIDEZ, ERA NECESARIO QUE LAS CÉLULAS CARECIERAN DE PEROXIDASA ENDÓGENA O ÉSTA FUERA INHIBIDA SATISFACTORIAMENTE, POR LO QUE, SE REQUIRIÓ EFEC-
TUAR UNA SERIE DE REACCIONES TESTIGO PARA ASEGURAR LA ESPECIFICI-
DAD Y CONFIABILIDAD DE LAS REACCIONES (TABLA 2). PARA ELLO, SE --
EMPLEARON ALÍCUOTAS DE 3×10^7 CÉLULAS DE DIFERENTES ANIMALES, FI-
JADAS COMO SE DESCRIBIÓ. LAS REACCIONES SE HICIERON POR TRIPLICA-
DO EN CADA UNO DE LOS SIGUIENTES GRUPOS EXPERIMENTALES Y TESTIGOS:

REACCIÓN 1. SE EFECTUÓ PARA INVESTIGAR SI EL REACTIVO DE KARNOVSKY NO ERA OXIDADO INESPECÍFICAMENTE POR LAS CÉLULAS L5178Y. ESTAS SE INCUBARON 10 MINUTOS A 20° C CON DOS ML DE UNA SOLUCIÓN RECÍEN-
PREPARADA DE 5 MG DE 3'3'-DIAMINOBENCIDINA (SIGMA) EN 10 ML DE UNA
SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE CITRATO DE SODIO-HCl 0.05 M A pH 7,6 SIN
H₂O₂. EL H₂O₂, SUBSTRATO DE LA PEROXIDASA, SE OMITIÓ A FIN DE COM-
PROBAR SI LAS CÉLULAS L5178Y NO LO PRODUCÍAN, LO QUE HUBIERA CAUSA-
DO UNA OXIDACIÓN INESPECÍFICA DE LA DIAMINOBENCIDINA.

REACCIÓN 2. TUVO POR OBJETO INVESTIGAR LA PRESENCIA DE PEROXIDA-
SA ENDÓGENA EN LAS CÉLULAS L5178Y. ESTAS SE INCUBARON CON EL REAC-
TIVO DE KARNOVSKY COMO EN LA REACCIÓN 1, ADICIONADO DE H₂O₂ A CON-
CENTRACIÓN FINAL DE 0.01% (v/v).

REACCIÓN 3. SE INHIBIÓ LA PEROXIDASA ENDÓGENA POR SUSPENSIÓN DE -
LAS CÉLULAS POR 10 MINUTOS EN UNA SOLUCIÓN DE NITROPRUSIATO DE SO-
DIO AL 1% (P/V) EN METANOL ABSOLUTO Y LUEGO SE INCUBARON EN REACTI-
VO DE KARNOVSKY COMO EN LA REACCIÓN 1, SIN H₂O₂, PARA COMPROBAR SI
EN ÉSTAS CONDICIONES LA DIAMINOBENCIDINA NO ERA OXIDADA INESPECÍFI-
CAMENTE.

REACCIÓN 4. SE INHIBIÓ LA PEROXIDASA ENDÓGENA CON NITROPRUSIATO -
EN METANOL COMO EN LA REACCIÓN 3 Y LUEGO LAS CÉLULAS SE INCUBARON-
CON EL REACTIVO DE KARNOVSKY CON H₂O₂ COMO EN LA REACCIÓN 2.

REACCIÓN 5. SE EFECTUÓ PARA INVESTIGAR SI LA INCUBACIÓN DE LAS CÉLULAS CON EL T NO CAUSARÍA REACCIONES FALSAS POSITIVAS PARA ELLO.- LAS CÉLULAS SE TRATARON CON NITROPRUSIATO EN METANOL COMO EN LA REACCIÓN 3 Y DESPUÉS SE INCUBARON CON UNA SOLUCIÓN DE T AL 0.5% (P/V) EN SOLUCIÓN DE HANK'S DURANTE UNA HORA A 20° C Y LUEGO SE AÑADIÓ EL REACTIVO DE KARNOVSKY CON H_2O_2 .

REACCIÓN 6. FUE SIMILAR A LA REACCIÓN 5; PERO EL T SE SUBSTITUYÓ POR EL IFS PARA INVESTIGAR SI ESTE NO CAUSARÍA REACCIONES FALSAS POSITIVAS. EL IFS SE EMPLEO AL 0.5 G % (P/V) EN LA MISMA SOLUCIÓN.

REACCIÓN 7. ESTA SE EFECTUÓ PARA INVESTIGAR SI EL ACOPLADO T-P SE RÍA CAPAZ DE COMBINARSE CON LOS SITIOS ACTIVOS DE LAS EP DE LAS CÉLULAS. PARA ELLO, PRIMERO SE INHIBIÓ LA PEROXIDASA ENDÓGENA CON EL INHIBIDOR DE NITROPRUSIATO EN METANOL, LUEGO SE INCUBARON LAS CÉLULAS CON EL ACOPLADO T-P AL 0.5 G% (P/V) EN SOLUCIÓN DE HANK'S DURANTE UNA HORA A 20° C Y LA REACCIÓN SE REVELÓ CON EL REACTIVO DE KARNOVSKY Y H_2O_2 .

REACCIÓN 8. FUE SIMILAR A LA REACCIÓN 7; PERO EL T-P SE SUBSTITUYÓ POR EL ACOPLADO DEL IFS-P, PARA INVESTIGAR SI ESTE SE COMBINARÍA CON SITIOS ACTIVOS DE LAS EP DE LAS CÉLULAS.

REACCIÓN 9. EL OBJETO DE ESTA REACCIÓN FUE INVESTIGAR SI EL T SOLO PODRÍA INHIBIR POR COMPETENCIA LA COMBINACIÓN DEL ACOPLADO T-P CON LOS SITIOS ACTIVOS DE LAS EP. PARA ESTO, SE INCUBARON LAS CÉLULAS CON EL INHIBIDOR DE NITROPRUSIATO EN METANOL, LUEGO CON EL T, ENSEGUIDA CON EL ACOPLADO T-P Y LUEGO CON EL REACTIVO DE KARNOVSKY Y H_2O_2 .

REACCIÓN 10. FUE SIMILAR A LA REACCIÓN 9; PERO EL T SE SUBSTITUYÓ POR EL IFS Y EL ACOPLADO T-P POR EL IFS-P, PARA VER SI EL IFS PODRÍA COMPETIR EN LA COMBINACIÓN DE ACOPLADO IFS-P CON LOS SITIOS ACTIVOS DE LAS EP.

REACCIÓN 11. SE EFECTUÓ PARA INVESTIGAR LA POSIBILIDAD DE QUE EL T SE COMBINARA CON LOS SITIOS ACTIVOS DE LAS EP E INHIBIERA POR

COMPETENCIA LA COMBINACIÓN DE ESTOS CON EL ACOPLADO IFS-P. PARA ELLO, LAS CÉLULAS SE TRATARON CON NITROPRUSIATO EN METANOL, SE INCUBARON CON EL T Y DESPUÉS CON EL ACOPLADO IFS-P, REACTIVO DE KARNOVSKY Y H_2O_2 .

REACCIÓN 12. FUE SIMILAR A LA REACCIÓN 11, SALVO QUE EN ESTA SE INVESTIGÓ RECÍPROCAMENTE SI EL IFS COMPETIRÍA CON EL ACOPLADO T-P EN SU COMBINACIÓN CON LOS SITIOS ACTIVOS DE LAS EP.

REACCIÓN 13. CONSISTIÓ EN PREINCUBAR LAS CÉLULAS TUMORALES CON EAC PARA PROBAR SI ESTE PODRÍA COMPETIR CON EL ACOPLADO T-P EN SU COMBINACIÓN CON EL SITIO ACTIVO DE LAS EP. PARA ELLO, SE INCUBARON LAS CÉLULAS CON EL NITROPRUSIATO EN METANOL, LUEGO CON UNA SOLUCIÓN 0.1 M DE EAC EN SOLUCIÓN DE HANK'S Y DESPUÉS CON EL T-P, REACTIVO DE KARNOVSKY Y H_2O_2 .

REACCIÓN 14. FUE PARA INVESTIGAR SI EL EAC SERÍA CAPAZ DE COMPETIR CON EL IFS-P EN SU COMBINACIÓN CON EL SITIO ACTIVO DE LAS EP. LA REACCIÓN SE EFECTUÓ COMO LA 13, SALVO QUE EL T-P SE SUBSTITUYÓ POR EL IFS-P.

EN CADA REACCIÓN, LAS CÉLULAS SE LAVARON 3 VECES ENTRE CADA REACTIVO CON 100 VOLÚMENES DE SOLUCIÓN DE HANK'S POR CENTRIFUGACIÓN A 500 G CINCO MINUTOS.

LOS RESULTADOS DE LAS REACCIONES ANTERIORES SE OBSERVARON EN UN FOTOMICROSCOPIO A 200, 500 Y 1250 DIMETROS DE AMPLIFICACIÓN. DESPUÉS DE COMPROBAR LA POSITIVIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LOS RESULTADOS, LOS BOTONES CELULARES FUERON PROCESADOS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.- LAS CÉLULAS FUERON POSTFIJADAS EN TETRAÓXIDO DE OSMIO (OsO_4) AL 1% (v/v) EN AMORTIGUADOR DE CACODILATO DE SODIO DE 0.1 M A PH 7.4 POR UNA HORA Y LUEGO LAVADAS EN EL MISMO AMORTIGUADOR POR 16 HORAS MÁS, DESHIDRATADAS EN ALCOHOLES GRADUALES Y ÓXIDO DE PROPILENO, EMBEBIDAS EN ÓXIDO DE PROPILENO-EPON, INCLUIDAS EN EPON 812, CORTADAS A 400-600 Å Y SE RECOGIERON SOBRE REJILLAS DE COBRE CUBIERTAS CON PELÍCULA FORMVAR Y SE OBSERVARON YA SEA SIN TEÑIR O TEÑIDAS EN ACETATO DE URANILO EN MICROSCOPIO ELEC-

TRÓNICO PHILLIPS FM-300.

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR.- SE INVESTIGÓ EN LAS CÉLULAS MALIGNAS POR LA TÉCNICA DE BENITEZ Y VELÁZQUEZ (10). PARA ELLO SE PREPARARON PELÍCULAS DE GELATINA AL 5% (P/V) A PH 7.2 SOBRE PORTA-OBJETOS Y SE DEJARON SOLIDIFICAR 60 MINUTOS A 20° C EN CÁMARA HÚMEDA. TAMBIÉN SE PREPARARON PELÍCULAS DE FIBRINA POR COAGULACIÓN DE FIBRINÓGENO HUMANO (CUTTER) AL 1% (P/V) ADICIONANDO UNA UNIDAD POR ML DE TROMBINA HUMANA (ORTHO). SOBRE LAS PELÍCULAS SE EXTENDIÓ - 0.2 ML DE UNA SUSPENSIÓN CON 1×10^7 CÉLULAS MALIGNAS EN MEDIO DE CULTIVO SIN SUERO FETAL DE TERNERA Y SE INCUBARON A 37° C POR 24 - HORAS EN CÁMARA HÚMEDA. INMEDIATAMENTE DESPUÉS LAS PREPARACIONES SE FIJARON Y TIÑERON CON UNA SOLUCIÓN DE COLORANTES DE POISON AL - 0.5% (P/V) EN UNA SOLUCIÓN ACUOSA DE ÁCIDO TRICLORACÉTICO AL 5% - (P/V) Y SE OBSERVARON AL MICROSCOPIO. PARA INHIBIR LA ACTIVIDAD DE EP DE LAS CÉLULAS MALIGNAS, SE PREPARARON OTRAS PELÍCULAS DE GELATI NA O FIBRINA A LAS CUALES SE LES ADICIONÓ YA SEA T O IFS AL 0.5% O EAC 0.1 M Y SOBRE ELLAS SE DEPOSITARON LAS CÉLULAS MALIGNAS SIGUIEN DO EL PROCEDIMIENTO ANTERIOR.

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LAS CÉLULAS MALIGNAS.- SE OBTUVIERON ALÍ CUOTAS DE 10^8 CÉLULAS LAVADAS . RESUSPENDIDAS EN 2 ML DE SOLUCION - ACUOSA DE TRITON X100 (SIGMA) AL 0.1% (V/V). LAS CÉLULAS SE DESINTEGRARON EN UN HOMOGENIZADOR A 0° C LA RUPTURA DE LA TOTALIDAD DE - LAS CÉLULAS SE COMPROBÓ POR OBSERVACIÓN EN MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES A 500 DIÁMETROS DE AMPLIFICACIÓN. EL LÍQUIDO SE CENTRIFUGÓ A 30.000 G A 4° C POR 60 MINUTOS. A 0.5 ML DEL SOBRENADANTE SE LE DETERMINÓ LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA POR INCUBACIÓN CON 10 MG DE CASEINA NO HIDROLIZADA (MERCK) DISUELTA EN 2.5 ML DE AMORTIGUADOR - DE FOSFATOS 0.2 M A PH 7.2 Y SE INCUBÓ 30 MINUTOS A 37° C. LA DIGES TIÓN DE LA CASEINA SE DETUVO POR ADICIÓN DE 1 ML DE ÁCIDO TRICLORA CÉTICO AL 50% (P/V). LA MEZCLA SE AGITÓ CINCO MINUTOS A 20° C Y SE CENTRIFUGÓ A 3.000 G 15 MINUTOS. A 2 ML DE ESTE SOBRENADANTE SE LE AGREGO 1 ML DE Na OH AL 5% (P/V) Y SE LEVÓ SU DENSIDAD EN UN ESPEC TROFOTOMETRO (PMQII DE ZEISS) A 280 NM. REFERIDA YA SEA A UN BLANCO DE REACTIVOS O CONTENIENDO 2.5, 5 Y 10 MG DE CASEINA HIDROLIZADA -- (MERCK). PARA PROBAR SI PODRÍA INHIBIRSE LA ACTIVIDAD DE LAS EP, SE INCUBARON OTRAS ALÍCUOTAS DE CÉLULAS CON EAC 0.05 M, T Y IFS AL 0.5%

(P/V) DURANTE 30 MINUTOS A 20° C Y DESPUÉS DE LAVADAS SE SIGUIÓ EL PROCEDIMIENTO ANTERIOR. LOS VALORES INFORMADOS REPRESENTARON EL PROMEDIO DE CINCO DETERMINACIONES EN RATONES DIFERENTES (TABLA 1).

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LÍQUIDO DE ASCITIS.- SE DETUVO LÍQUIDO DE ASCITIS LIBRE DE CÉLULAS POR CENTRIFUGACIÓN A 3.000 G POR 20 MINUTOS. LA AUSENCIA DE CÉLULAS L5178Y SE COMPROBÓ POR OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DEL SOBRENADANTE. EN ESTE SE DETERMINÓ LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SIGUIENDO EL PROCEDIMIENTO ANTERIOR. OTRAS MUESTRAS DE LÍQUIDO SE INCUBARON CON EAC Y IFS ANTES DE AÑADIR LA CASEINA Y SE SIGUIÓ EL PROCEDIMIENTO COMO EN EL PÁRRAFO ANTERIOR. LOS RESULTADOS INFORMADOS REPRESENTAN EL PROMEDIO DE CINCO RATONES DISTINTOS (TABLA 1).

R E S U L T A D O S :

EL LÍQUIDO DE ASCITIS DEL LINFOMA L5178Y AL OCTAVO DÍA POSTRANSPLANTE CONTUVO 2.4×10^8 CÉLULAS/ML EN PROMEDIO. DE ELLAS, EL 91-96% - FUERON CÉLULAS L5178Y, 2.5% MACRÓFAGOS, 2.3% ERITROCITOS Y 0-1% LINFOCITOS.

DEL 90-100% DE LAS CÉLULAS ASCÍTICAS DEL LINFOMA L5178Y MOSTRARON - ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR CUANDO SE LES COLOCÓ EN PELÍCULAS DE GELATINA, DE ACUERDO A LA TÉCNICA DE BENITEZ Y VELÁZQUEZ (10). LA DIGESTIÓN APARECIÓ EN FORMA DE UN HALO CLARO EN TORNO A LAS CÉLULAS ASCÍTICAS (FIGURA 1), PROBABLEMENTE POR DIFUSIÓN DE LAS EP HACIA LA GELATINA. POR ESTA TÉCNICA NO PUDIERON DIFERENCIARSE LAS CÉLULAS L5178Y DE LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES. EN BASE AL PORCENTAJE DE CÉLULAS MALIGNAS Y SU MENOR TAMAÑO, SE PENSÓ QUE ESTAS DESARROLLARON ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR. LA DIGESTIÓN EFECTUADA POR LAS EP DE LAS CÉLULAS ASCÍTICAS SE INHIBIÓ TOTALMENTE CUANDO SE ADICIONÓ A LA GELATINA EL T, IFS O EAC.

LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA LIBERADA POR LA FRAGMENTACIÓN DE LAS CÉLULAS ASCÍTICAS Y LA QUE APARECIÓ EN EL LÍQUIDO ASCÍTICO LIBRE DE CÉLULAS SE MUESTRA EN LA TABLA 1. EN ELLA PUEDE VERSE QUE LAS CÉLULAS Y LÍQUIDOS ASCÍTICOS CONTUVIERON EP, CUYO ORIGEN PUDO HABER SIDO LAS CÉLULAS L5178Y O LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES. LAS EP DE LAS CÉLULAS Y DEL LÍQUIDO FUERON INHIBIBLES POR EL T, EAC Y IFS.

LOS RESULTADOS DE LAS REACCIONES EXPERIMENTALES Y TESTIGOS QUE SE EFECTUARON PARA EL MARCAJE DE LAS EP DE LAS CÉLULAS L5178Y APARECEN EN LA TABLA 2.

LA REACCIÓN 1 FUE NEGATIVA, LO CUAL INDICÓ QUE LAS CÉLULAS L5178Y - CARECEN DE LA CAPACIDAD DE OXIDAR POR SI SOLAS EL REACTIVO DE KARNOVSKY EN AUSENCIA DE H_2O_2 EXÓGENO.

LA REACCIÓN 2 FUE NEGATIVA, LO CUAL SE INTERPRETÓ EN EL SENTIDO DE QUE LAS CÉLULAS L5178Y CARECEN DE PEROXIDASA ENDÓGENA YA QUE NO FUERON CAPACES DE OXIDAR EL REACTIVO DE KARNOVSKY EN PRESENCIA DE H_2O_2

APORTADA EXOGENAMENTE. SIN EMBARGO, ESTA REACCIÓN FUE POSITIVA EN LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES, EN ESTOS SE LE ENCONTRÓ EN FORMA DE - 3 A 5 GRÁNULOS ESFÉRICOS U OVOIDES INTRACITOPLÁSMICOS DE 0.1 A 0.3 MICRAS DE DIÁMETRO, SITUADOS FRENTE A ALGUNA ESCOTADURA DEL NÚCLEO. LOS ERITROCITOS DIERON REACCIÓN POSITIVA EN TODO EL CITOPLASMA. - LOS LINFOCITOS DIERON SIEMPRE REACCIONES NEGATIVAS.

LA REACCIÓN 3 RESULTÓ SIEMPRE NEGATIVA TANTO EN LAS CÉLULAS L5178Y COMO CON LAS NO MALIGNAS. ELLO DEMOSTRÓ QUE LAS CÉLULAS TRATADAS CON EL NITROPRUSIATO EN METANOL Y EN AUSENCIA DE H_2O_2 EXÓGENO, CAECIERON DE LA CAPACIDAD DE OXIDAR EL REACTIVO DE KARNOVSKY.

LA REACCIÓN 4 RESULTÓ SIEMPRE NEGATIVA TANTO CON LAS CÉLULAS L5178Y COMO CON LOS MACRÓFAGOS Y ERITROCITOS. ESTO SIGNIFICÓ QUE LAS CÉLULAS TRATADAS CON NITROPRUSIATO EN METANOL Y EN PRESENCIA DE H_2O_2 EXÓGENO, FUERON INCAPACES DE OXIDAR EL REACTIVO DE KARNOVSKY. COMO ESTAS REACCIONES RESULTARON TOTALMENTE NEGATIVAS, SIN MARCAJE - DE LA PEROXIDASA ENDÓGENA DE LOS MACRÓFAGOS Y ERITROCITOS, SE OPTÓ POR EMPLEAR EL NITROPRUSIATO EN METANOL PARA EL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS ASCÍTICAS EN TODAS LAS REACCIONES SIGUIENTES Y ASÍ OBTENER RESULTADOS MÁS CLAROS.

LA REACCIÓN 5 FUE NEGATIVA, LO QUE DEMOSTRÓ QUE LA ADICIÓN DEL T A LAS CÉLULAS ASCÍTICAS NO ACTIVO INESPECÍFICAMENTE LA OXIDACIÓN DEL REACTIVO DE KARNOVSKY EN PRESENCIA DEL H_2O_2 .

LA REACCIÓN 6 FUE NEGATIVA, POR LO QUE SE CONCLUYÓ QUE EL IFS TAM POCO ACTIVÓ INESPECÍFICAMENTE LA OXIDACIÓN DEL REACTIVO DE KARNOVSKY.

LA REACCIÓN 7 FUE POSITIVA TANTO CON LAS CÉLULAS L5178Y COMO CON LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES. ÉSTA DEMOSTRÓ QUE EL ACOPLADO T-P - FUE CAPAZ DE COMBINARSE ESPECÍFICAMENTE CON LOS SITIOS ACTIVOS DE LAS EP DE ÉSAS CÉLULAS.

LA LOCALIZACIÓN DE LAS EP EN LAS CÉLULAS L5178Y PRESENTÓ TRES MODALIDADES DIFERENTES: DEL 70 AL 80% DE LAS CÉLULAS OBSERVADAS AL

MICROSCOPIO DE LUZ Y ELECTRÓNICO PRESENTARON EP INTRACELULARES (FIG. 2) DE FORMA IRREGULARMENTE ESFÉRICA, DE 0.1 A 0.8 MICRAS DE DIÁMETRO, DE 4 A 8 POR CÉLULA CON MARCAJE MUY ELECTRODENSO Y DISTRIBUIDAS IRREGULARMENTE EN EL CITOPLASMA. EN ALGUNAS CÉLULAS AISLADAS EN QUE LAS EP SE MARCARON CON MENOR INTENSIDAD, LAS GRANULACIONES SE OBSERVARON DELIMITADAS POR UNA ESTRUCTURA MEMBRANAL EN LOS CORTES DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA TEÑIDOS. LA DISTRIBUCIÓN DE LAS EP INTRACELULARES - EN LAS CÉLULAS MALIGNAS FUE EXCLUSIVAMENTE GRANULAR. DEL 10 AL 15 % DE LAS CÉLULAS L5178Y, PRESENTARON MARCAJE POSITIVO PARA EP SOBRE LA SUPERFICIE CELULAR (FIG. 3) DISTRIBUIDO EN FORMA DE UN DEPÓSITO GRANULOSO CONTINUO SOBRE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y DE UN GROSOR UNIFORME DE 80 A 120 NM DEL 5 AL 20% DE LAS CÉLULAS L5178Y PRESENTARON DOBLE-MARCAJE PARA EP SUPERFICIALES E INTRACELULARES (FIG. 4-5).

LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES PRESENTARON MARCAJE POSITIVO PARA LAS EP INTRACELULARES (FIG. 6) EN FORMA DE GRÁNULOS ESFÉRICOS U OVOIDEOS DE 0.1 A 0.5 MICRAS DE DIÁMETRO, DE 4 A 8 EN EL CITOPLASMA; PERO NUNCA PRESENTARON MARCAJE PARA EP SUPERFICIALES.

LA REACCIÓN 8 RESULTÓ POSITIVA Y DEMOSTRÓ QUE EL ACOPLADO IFS-P FUE CAPAZ DE COMBINARSE CON LOS SITIOS ACTIVOS DE LAS EP DE LAS CÉLULAS DEL LÍQUIDO ASCÍTICO. LA DISTRIBUCIÓN DEL MARCAJE FUE ENTERAMENTE-SIMILAR AL DESCRITO EN LA REACCIÓN 7.

LA REACCIÓN 9 FUE COMPLETAMENTE NEGATIVA. ELLO DEMOSTRÓ QUE EL T - SOLO PUDO COMBINARSE CON LOS SITIOS ACTIVOS DE LAS EP DE LAS CÉLULAS ASCÍTICAS E INHIBIR ESPECÍFICAMENTE POR COMPETENCIA LA COMBINACIÓN-SUBSECUENTE DEL ACOPLADO T-P CON DICHAS EP. EL RESULTADO DE ESTA - REACCIÓN FUE IGUALMENTE NEGATIVO CON LAS CÉLULAS L5178Y QUE CON LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES, EN MICROSCOPIA DE LUZ Y ELECTRÓNICA.

LA REACCIÓN 10 FUE TOTALMENTE NEGATIVA. DEMOSTRÓ QUE EL IFS INHIBIÓ LA COMBINACIÓN SUBSECUENTE DEL IFS-P CON LOS SITIOS ACTIVOS DE LAS EP DE LAS CÉLULAS MALIGNAS Y DE LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES. LA INTERPRETACIÓN DE ESTE RESULTADO ES SIMILAR AL DE LA REACCIÓN 9.

LA REACCIÓN 11 FUE NEGATIVA. DEMOSTRÓ QUE EL T SOLO PUDO COMPETIR-HETEROESPECÍFICAMENTE CON EL IFS-P EN SU COMBINACIÓN CON LOS SITIOS

ACTIVOS DE LAS EP DE LAS CÉLULAS MALIGNAS Y MACRÓFAGOS PERITONEALES.

LA REACCIÓN 12 FUE NEGATIVA. ESTA REACCIÓN ES RECÍPROCA DE LA REACCIÓN 11 Y DE INTERPRETACIÓN SEMEJANTE.

LA REACCIÓN 13 FUE TOTALMENTE NEGATIVA. DEMOSTRÓ QUE EL EAC FUE CAPAZ DE INHIBIR POR COMPETENCIA LA COMBINACIÓN SUBSECUENTE DEL ACOPLADO - T-P CON LOS SITIOS ACTIVOS DE LAS EP DE LAS CÉLULAS L5178Y Y MACRÓFAGOS PERITONEALES.

LA REACCIÓN 14 FUE IGUALMENTE NEGATIVA Y DEMOSTRÓ QUE EL EAC INHIBIÓ LA COMBINACIÓN DEL IFS-P CON LAS EP DE LAS CÉLULAS MALIGNAS Y NO MALIGNAS DEL LINFOMA L5178Y EN FASE ASCÍTICA.

DISCUSION :

SE HA INFORMADO QUE LA CAPACIDAD DE INVASIVIDAD DE LAS CÉLULAS MALIGNAS ESTA RELACIONADA A SU CONTENIDO DE EP (1-6). POR ESTO NOS PARECIÓ IMPORTANTE INVESTIGAR LA LOCALIZACIÓN TOPOGRÁFICA DE LAS EP EN LAS CÉLULAS TUMORALES.

PARA ELLO SE ELIGIÓ COMO MODELO EXPERIMENTAL EL LINFOMA DE MURINO -- L5178Y EN FASE ASCÍTICA, QUE ES UN TUMOR TRANSPLANTABLE DE ALTA MALIGNIDAD. DE ÉL PUDO OBTENERSE UN NÚMERO SUFICIENTE DE CÉLULAS PARA EFECTUAR SIMULTANEAMENTE LAS REACCIONES EXPERIMENTALES Y TESTIGOS.

LAS REACCIONES BIOQUÍMICAS REVELARON LA PRESENCIA DE EP TANTO EN LAS CÉLULAS ASCÍTICAS COMO EN EL LÍQUIDO DE ASCITIS LIBRE DE CÉLULAS. LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SE INHIBIÓ EN PRESENCIA DE EAC E IFS, LO QUE DEMOSTRÓ QUE LAS EP TUVIERON AFINIDAD POR ESOS INHIBIDORES.

LA CAPACIDAD PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR DE LAS CÉLULAS ASCÍTICAS SE DEMOSTRÓ MORFOLÓGICAMENTE POR LA TÉCNICA DE BENITEZ Y VELÁZQUEZ (10) Y TAMBIÉN FUE INHIBIDA POR EL T, IFS Y EAC INCORPORADOS A LAS PELÍCULAS DE GELATINA.

SE HA INFORMADO QUE EL T, IFS Y EL EAC INHIBEN LA ACTIVIDAD DE ALGUNAS PROTEASAS POR OCUPACIÓN DEL SITIO ACTIVO DE ELLAS (7). ELLO NOS SUGIRIÓ QUE DICHS INHIBIDORES PODRÍAN SER DE UTILIDAD PARA LA LOCALIZACIÓN DE LAS EP EN LAS CÉLULAS MALIGNAS.

POR LOS RESULTADOS DE LAS REACCIONES CITOQUÍMICAS, PARTICULARMENTE -- LAS REACCIONES DE INHIBICIÓN POR COMPETENCIA, CABE SUPONER QUE LOS -- ACOPLADOS T-P E IFS-P CONSERVARON LA MISMA AFINIDAD QUE LOS INHIBIDORES SOLOS HACÍA LOS SITIOS ACTIVOS DE LAS EP. DE SER ASÍ, ESTE PROCEDIMIENTO PERMITIRÍA LA LOCALIZACIÓN DIRECTA DE LAS EP, LO QUE NO -- ES POSIBLE CON OTRAS TÉCNICAS QUE SE BASAN EN LA DETECCIÓN DE UN PRODUCTO DE LA REACCIÓN (11). ADEMÁS, EL USO DE LA P PARA EL MARCAJE DE LAS EP PERMITIÓ LA OBTENCIÓN DE PREPARACIONES PARA MICROCIURUGÍA ELEC TRÓNICA.

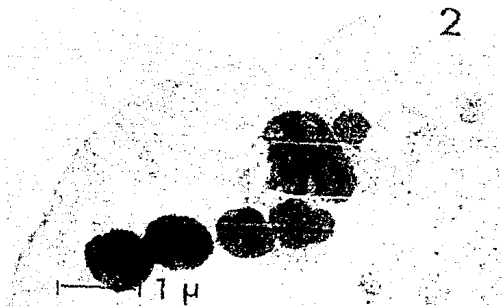
SE HA INFORMADO QUE LOS MACRÓFAGOS CONTIENEN EP EN LAS GRANULACIONES EXTRAIBLES DE SU CITOPLASMA (12). EN ESTE TRABAJO SE CONFIRMÓ LA PRESENCIA DE EP EN ELLAS; Y ADEMÁS SE LES LOCALIZÓ TOPOGRÁFICAMENTE IN-SITU.

LA MAYORÍA DE LAS CÉLULAS MALIGNAS PRESENTARON EP INTRACELULARES. LA DISTRIBUCIÓN DE LAS EP ES CONGRUENTE CON LOS MECANISMOS DE AGRESIÓN HACIA LOS TEJIDOS SANOS CIRCUNDANTES. SIN EMBARGO, DESCONOCEMOS EL DESTINO QUE SIGAN LAS EP INTRACITOPLÁSMICAS CONTENIDAS EN LAS GRANULACIONES. EL PRESENTE TRABAJO NO PERMITIÓ SABER SI LOS GRÁNULOS SON SECRETADOS O SI LAS EP QUE CONTIENEN SE INCORPOREN A LAS EP-SUPERFICIALES. COMO LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA FUE MAYOR EN EL LÍQUIDO QUE EN LAS CÉLULAS, LA PRIMERA POSIBILIDAD PARECE MÁS PROBABLE.

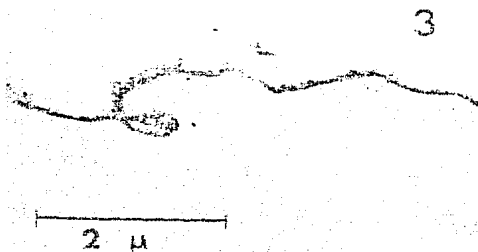
LA DEMOSTRACIÓN DE EP SOBRE LA SUPERFICIE DE LAS CÉLULAS MALIGNAS RESULTA INTERESANTE EN LA RELACIÓN QUE PUDIERA TENER CON LA LIBERACIÓN DE ANTÍGENOS DE LA CUBIERTA EXTERIOR (13), INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL POR ANTÍGENOS CIRCULANTE (14-18) O IMPEDIMENTO DEL ENLACE DE LOS LINFOCITOS INMUNES CON LAS CÉLULAS TUMORALES (19).



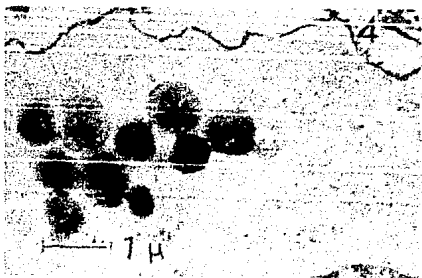
- 1.- CÉLULAS ASCÍTICAS DEL LINFOMA MURINO TRATADOS SEGÚN LA TÉCNICA DE BENITEZ Y VELÁZQUEZ (10), PARA DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR. LAS ZONAS CLARAS MUESTRAN LA DIGESTIÓN DE LA PELÍCULA DE GELATINA EN TORNO DE ELLAS.



- 2.- PORCIÓN DE UN LEUCOBLASTO DEL LINFOMA L5178Y QUE FUE TRATADO PARA LOCALIZACIÓN DE LAS EP SEGÚN LA REACCIÓN CITOQUÍMICA 7 DE LA TABLA 2 Y PRECESADA PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA. LOS GRÁNULOS ELECTRODENSOS CORRESPONDEN A LAS EP INTRACELULARES. CÉLULAS SIN TERNIR.



- 3.- PORCIÓN DE UN LEUCOBLASTO DEL LINFOMA L5178Y QUE FUE TRATADO PARA LA LOCALIZACIÓN DE LAS EP SEGÚN LA REACCIÓN CITOQUÍMICA 7 DE LA TABLA 2 Y PROCESADA PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA. EL DEPÓSITO ELECTRODENSO SOBRE LA SUPERFICIE CELULAR CORRESPONDE A LAS EP SUPERFICIALES. CÉLULA SIN TERNIR.



- 4.- PORCIÓN DE UN LEUCOBLASTO DEL LINFOMA L5178Y QUE FUE TRATADO PARA LA LOCALIZACIÓN DE LAS EP SEGÚN LA REACCIÓN CITOQUÍMICA 8 DE LA TABLA 2 PROCESADA PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA. EL DEPÓSITO ELECTRODENSO SOBRE LA SUPERFICIE CELULAR Y EN GRÁNULOS INTRACITOPASMICOS CORRESPONDIÓ A LAS EP. CÉLULA SIN TERNIR.



- 5.- PORCIÓN DE UN LEUCOBLASTO DEL LINFOMA L5178Y QUE FUE TRATADO PARA LOCALIZACIÓN DE LAS EP SEGÚN LA REACCIÓN CITOQUÍMICA 7 DE LA TABLA 2 Y PROCESADA PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA, A MAYOR AMPLIFICACIÓN QUE LAS ANTERIORES. EL DEPÓSITO ELECTRODENSO SOBRE LA SUPERFICIE CELULAR Y EN LOS GRÁNULOS INTRACITOPLÁSMICOS CORRESPONDIÓ A LAS EP. CÉLULA SIN TEÑIR.



- 6.- PORCIÓN DE UN MACRÓFAGO PERITONEAL DEL LÍQUIDO DE ASCITIS DEL LINFOMA - L5178Y QUE FUE TRATADO PARA LA LOCALIZACIÓN DE LAS EP SEGÚN LA REACCIÓN 8 DE LA TABLA 2 Y PROCESADA PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA. EL DEPÓSITO ELECTRODENSO EN GRÁNULOS INTRACITOPLÁSMICOS CORRESPONDIÓ A LAS EP. CÉLULA SIN TEÑIR.

TABLA 1

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LAS CÉLULAS ASCÍTICAS Y DEL LÍQUIDO ASCÍTICO LIBRE DE CÉLULAS DEL LINFOMA MURINO L5178Y AL OCTAVO DÍA POSTRANSPLANTE, EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DE PROTEASAS- O SIN ELLOS.

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN
PRESENCIA DE:

	-	T	IFS	EAC
CÉLULAS	0.194	0.019	0.008	0.001
LÍQUIDOS	0.410	0.023	0.017	0.003

T: INHIBIDOR PANCREÁTICO BOVINO DE LA TRIPSINA (TRASYLOL, BAYER).

IFS: INHIBIDOR DE LA TRIPSINA DEL FRIJOL SOYA.

EAC: ÁCIDO ÉPSILON-AMINO-CAPROICO.

20
TABLA 2

RESULTADOS DE LAS REACCIONES CITOGUÍMICAS PARA LA LOCALIZACIÓN DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS (EP) DE LOS LEUCOBLASTOS DEL LINFOMA MURINO -- L5178Y, CON INHIBIDORES DE LAS PROTEASAS ACOPLADOS A LA PEROXIDASA Y REVELADOS POR LA REACCIÓN DE KARNOVSKY.

REACCIÓN	REACTIVOS	RESULTADOS
1	C + K	NEGATIVO
2	C + K + H ₂ O ₂	NEGATIVO*
3	C + IN + K	NEGATIVO
4	C + IN + K + H ₂ O ₂	NEGATIVO
5	C + IN + T + K + H ₂ O ₂	NEGATIVO
6	C + IN + IFS + K + H ₂ O ₂	NEGATIVO
7	C + IN + TP + K + H ₂ O ₂	POSITIVO**
8	C + IN + IFS-P + K + H ₂ O ₂	POSITIVO**
9	C + IN + T + T-P + K + H ₂ O ₂	NEGATIVO
10	C + IN + IFS + IFS-P + K + H ₂ O ₂	NEGATIVO
11	C + IN + T + IFS-P + K + H ₂ O ₂	NEGATIVO
12	C + IN + IFS + T-P + K + H ₂ O ₂	NEGATIVO
13	C + IN + EAC + T-P + K + H ₂ O ₂	NEGATIVO
14	C + IN + EAC + IFS-P + K + H ₂ O ₂	NEGATIVO

C: CÉLULAS DE LINFOMA MURINO L5178Y.

K: REACTIVO DE KARNOVSKY (DIAMINO BENCIDINA).

IN: INHIBIDOR DE NITROPRUSIATO EN METANOL.

T: TRASILOL.

IFS: INHIBIDOR DE FRIJOL SOYA P-PEROXIDASA.

T-P: ACOPLADO TRASILOL-PEROXIDASA

EAC: ACIDO EPSILON-AMINO-CAPROICO.

*EL RESULTADO POSITIVO HUBIERA REVELADO PEROXIDASA ENDÓGENA. EL RESULTADO FUE POSITIVO CON LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES.

**REVELÓ MARCAJE ESPECÍFICO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS.

REFERENCIAS

1. FISCHER, A: BEITRAG ZUR BIOLOGIE DER GEWEBEZELLEN. ELINE VERGLEICHENDBIOLOGISCHE STUDIE DER NORMALEN UND MALIGNEN GEWEBEZELLEN IN VITRO. ARCH. ENTWICK LUNGSTMECH ORG. (WILHELM ROUS). 104: 210, 1925.
2. MALMGREM, H., SYLVEN, B., REVERZ, L.: CATHEPTIC AND BIPEPTIDASE ACTIVITIES OF ASCITES TUMOUR CELLS BRIT. J. CANCER 9: 473,- 1955.
3. SYLVEN, B., MALMGREM, H.: THE HISTOLOGICAL DISTRIBUTION OF PROTEINASE AND PEPTIDASE ACTIVITY IN SOLID TUMOR TRANSPLANTS. ACTA RADIOL. SUPPL. 154: 1, 1957.
4. VENSEL W.H., KOMENDER, J. BARNARD, E.A.: NON PANCREATIC PROTEASES OF THE CHYMOTRYPSIN FAMILY. II TWO PROTEASES FROM A MOUSE-MAST CELL TUMOR. BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA 250: 395, 1971.
5. OSSOWSKI, L., UNKELESS, J.C., TOBIA, A., QUIGLEY, J. P. RIFKIN, D.B., REICH, E.: AN ENZYMIC FUNCTION ASSOCIATED WITH TRANSFORMATION OF FIBROBLASTS BY ONCOGENIC VIRUSES. II. MAMMALIAN FIBROBLASTS CULTURE TRANSFORMED BY DNA AND RNA TUMOR VIRUSES. J. EXP. MED. 137: 112, 1973.
6. BOSMAN, H.B., LOCKWOOD, T., MORGAN, HR.: SURFACE BIOCHEMICAL -- CHANGES ACCOMPANYING PRIMARY INFECTION WITH ROUS SARCOMA VIRUS. II. PROTEOLYTIC AND GLYCOSIDASE ACTIVITY AND SUBLETHAL AUTOLYSIS SUBLETHAL AUTOLYSIS. EXP. CELL RES. 83: 25. 1974.
7. SKOZA, L., TSE, A.O., SEMMAR, M., JOHNSON, A.J.: COMPARATIVE ACTIVITIES OF AMINO ACID AND POLYPEPTIDE INHIBITORS OF NATURAL -- AND SYNTHETIC SUBSTRATES. ANN. N.Y. ACAD. SCI 146:659, 1968.
8. MAKANE, P.K., KAWAOI, A.: PEROXIDASE-LABELED ANTIBODY. A NEW METHOD OF CONJUGATION. J. HISTOCHEM. CYSTOCHEM. 22: 1084, 1974.
9. KARNOVSKY, M.J.: THE ULTRASTRUCTURAL BASIS OF CAPILARY PERMEABI

LITY STUDIED WITH PEROXIDASE AS TRACER. J. CELL BIOL. 35: 213. - 1967.

10. BENITEZ, B.L. y VELÁZQUEZ, S.: CYTOCHEMICAL DEMONSTRATION OF PROTEOLYTIC ACTIVITY OF HUMAN AND RAT SPERMATOCYTES. J. REPROD. FERT. 29: 419, 1972.
11. GLENNER, G.G., COHEN, L.A.: HISTOCHEMICAL DEMONSTRATION OF A SPECIES-SPECIFIC TRYPSIN-LIKE ENZYME IN MAST CELLS. NATURE 185: 846, 1960.
12. COHN, Z., WIENER, E.: THE PARTICULATE HYDROLASES OF MACROPHAGES-I. COMPARATIVE ENZYMOLOGY, ISOLATION AND PROPERTIES. J. EXP. MED. 118:991, 1963.
13. SLAYTER, H.S., CODINGTON, J.F.: SIZE AND CONFIGURATION OF GLUCO-PROTEIN FRAGMENTS CLEAVED BY TUMOR CELLS BY PROTEOLYSIS. J. BIOL. CHEM. 248: 3405, 1973.
14. CURRIE, G.A., BASHAM, C.: SERUM MEDIATED INHIBITION THE IMMUNOLOGICAL REACTIONS OF THE PATIENT TO HIS OWN TUMOR A POSSIBLE ROLE - FOR CIRCULATING ANTIGEN. BRIT. J. CANCER 26: 427, 1972.
15. TOMSON, D.M.P., ECCLES, S., ALEXANDER, P.: ANTIBODIES AND SOLUBLE TUMOR - SPECIFIC ANTIGENS IN BLOOD AND LYMPH OF RATS WITH CHEMICALLY INDUCED SARCOMATA. BRIT. J. CANCER 28: 6, 1973.
16. VAAGE, J.: INFLUENCE OF TUMOR ANTIGEN ON MAINTENANCE VERSUS DEPRESSION OF TUMOR-SPECIFIC IMMUNITY. CANCER RES. 33:493, 1973.
17. BONMANSAN, E., BONMANSAN, A., GOLDIN, A., CUDKOWICZ, G. DEPRESSION OF ANTILYMPHOMA ALLOGRAFT REACTIVITY BY TUMOR-ASSOCIATED FACTORS. CANCER RES. 33: 1054, 1973.
18. VAAGE, J.: CIRCULATING TUMOR ANTIGENS VERSUS IMMUNE SERUM FACTORS IN DEPRESSED CONCOMITANT IMMUNITY. CANCER RES. 34: 2979, 1974.
19. BRAUN, R.J.: IN VITRO DESENSITIZATION OF SENSITIZED MURINE LYMPHOCYTES BY A SERUM FACTOR (SOLUBLE ANTIGEN). PROC. NAT. ACAD. SCI.- 68: 1634, 1971.