



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

IDENTIFICACION DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE
CELULAS TUMORALES POR TECNICAS INMUNOQUIMICAS

T E S I S

Que para obtener el título de

B I O L O G O

p r e s e n t a

MARTIN GUSTAVO PEDRAZA ALVA



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



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.

INDICE

	Pág.
I. <u>INTRODUCCION</u>	1
1. CARACTERISTICAS DE CELULAS TUMORALES	1
2. CARCINOGENESIS	3
3. ANTIGENOS TUMORALES	7
4. RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL	9
5. MECANISMOS DE ESCAPE DE LAS CELULAS TUMORALES	11
6. EMBRIOGENESIS Y CARCINOGENESIS	13
7. ANTECEDENTES	15
II. <u>OBJETIVOS</u>	21
III. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	22
1. ANIMALES	22
2. LINEAS TUMORALES	22
3. CULTIVO DE CELULAS	23
3.1 Precauciones	23
3.2 Soluciones	
3.3 Sueros	24
3.4 Medios de Cultivo	24
3.5 Congelación de Células	25
3.6 Descongelación de células	25
3.7 Crecimiento	25
4. TECNICAS INMUNOQUIMICAS	26
4.1 Obtención de Antisueros y Sueros Normales	26
4.1.1 Purificación de Antisueros	26
4.1.2 Comprobación de la reactividad de los antisueros	27

	Pág.
4.2 Acoplamiento de IgG de Cabra anti-IgG de conejo a Isotiocianato de Fluoresceína	28
4.2.1 Procedimiento de conjugación	28
4.2.2 Purificación del conjugado	29
4.2.3 Evaluación del conjugado	29
4.2.4 Almacenamiento del conjugado	30
4.3 Radiiodinación (¹²⁵ I) de los Componentes Superficiales de las Células Tumorales	30
4.3.1 Marcaje de la superficie celular	30
4.3.2 Solubilización de los componentes superficiales radiocidinados	31
4.3.3 Precipitación de proteínas celulares por TCA	31
4.4 Inmunoprecipitación de los Antígenos de la Superficie Celular	32
4.5 Determinación de Proteína por el Método de Lowry	33
4.6 Electroforesis de Geles de Poliacrilamida-SDS	33
4.6.1 Tinción de Coomassie	34
4.6.2 Tinción de Schiff	34
4.6.3 Tinción de Plata	35
4.6.4 Identificación de la marca radioactiva	35
4.7 Purificación de Membranas Plasmáticas	36
4.8 Purificación de la Glicoproteínas Tumoral gp160	37
4.8.1 Acoplamiento de WGA a Sepharosa 6B	37
4.8.2 Purificación	38
4.9 Inmunofluorescencia	38
4.9.1 Células en suspensión	39
4.9.2 Cortes histológicos por congelación	40
5. ANALISIS ESTADISTICO	41
IV. <u>RESULTADOS</u>	42
1. PURIFICACION DE ANTISUEROS	42
2. COMPROBACION DE ANTISUEROS	42

	Pág.
3. ACOMPLAMIENTO DE IgG DE CABRA ANTI-IgG DE CONEJO A ISOTIOCIANATO DE FLUORESCINA	42
4. PURIFICACION DE LA GLICOPROTEINA TUMORAL gp160	45
5. IDENTIFICACION DE LA GLICOPROTEINA TUMORAL gp160 EN DIFERENTES MIELOMAS MURINOS (H-2 ^d)	45
5.1 Expresión de gp160 en Mielomas de Ratón	45
5.2 Inmunoprecipitación de gp160 de los Diferentes Mielomas con Antisuero Anti-LPC-1	50
6. IDENTIFICACION DE LA GLICOPROTEINA TUMORAL gp160 EN POBLACIONES CELULARES EMBRIONARIAS Y ADULTAS	50
V. <u>DISCUSION</u>	68
VI. <u>CONCLUSIONES</u>	74
VII. REFERENCIAS	75

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
Con-A	Concanavalina A
Doc-Na	Deoxicolato de sodio
DMSO	Dimetil Sulfoxido
EqCe	Equivalentes celulares
H-E	Hematoxilina - eosina
LPS	Lipopolisacaridos
LTCs	Linfocitos T citotóxico
NP-40	Nonident P-40
PBS	Buffer de fosfatos salino
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonato
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TCA	Acido tricloroacético
U.V.	Luz ultravioleta
WGA	Aglutinina de germen de trigo

I. INTRODUCCION

1. CARACTERISTICAS DE LAS CELULAS TUMORALES

Una célula tumoral es una célula modificada que adquiere la capacidad de escapar de los mecanismos homeostáticos de regulación, y que adquiere así un potencial incoordinado de crecimiento y un alto grado de autonomía. El cambio operado en la transformación de una célula normal es irreversible y la evolución de un tumor representa el desarrollo de -- una colonia de células permanentemente alteradas. El crecimiento celular exagerado ocasiona la formación de masas celulares denominadas neoplasias (crecimiento nuevo).

Es necesario enfatizar tres características de las células tumorales (32), las cuales les permiten competir por los nutrientes y energía de las células normales, conllevando a la destrucción del organismo.

Tales características son:

- Crecimiento autónomo
- Invasión, metástasis y destrucción de tejidos
- Disminución y/o pérdida de funciones especializadas

Una célula tumoral difiere de su contraparte normal en que sufre alteraciones bioquímicas (50,12) morfológicas (8) membranales y antigénicas (28,73) (Fig. 1).

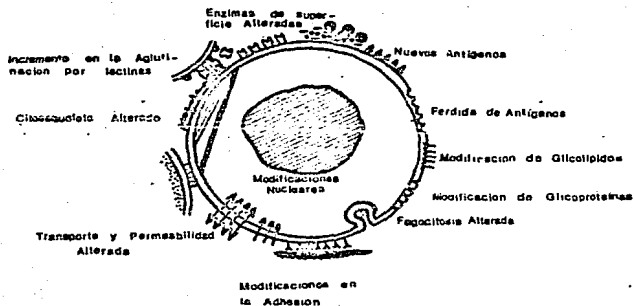


Fig. 1. Cambios que sufre una célula después de la transformación maligna.

2. CARCINOGENESIS (43)

La carcinogénesis se puede definir como el proceso por el cual un tejido normal se transforma en tejido canceroso. La mayoría de los -- investigadores asumen que la carcinogénesis es el efecto de un carcinógeno ya sea agente químico, físico o biológico.

A) Teorías de Carcinogénesis

Teoría de Thiersch y Waldeyer. Estos autores propusieron que en los tejidos normales hay un equilibrio entre elementos conectivos y -- epiteliales, y que debido al envejecimiento más rápido del componente conectivo se pierde su capacidad de regulación sobre el epitelio. Bajo estas condiciones ahora liberado de la restricción del tejido conectivo, el epitelio revierte a un tipo celular embrionario, el cual presenta la capacidad ilimitada de proliferación, esto es, se vuelve canceroso. Esta teoría se derivó de tres hechos importantes: a) el 90% de los cánceres humanos derivan de tejido epitelial, b) la curva de incidencia concuerda con la -- edad avanzada y c) la señal obvia de envejecimiento es la pérdida de elasticidad de la piel. Pero esta teoría no explica como se originan los tumores que no derivan de epitelio (10%) (43).

Teoría de la Irritación. Propone que los tumores se originan por contacto con agentes irritantes, que pueden causar un efecto inflamatorio y de ulceración en células epiteliales, que después se tornan cancerosas. Entre estos agentes se encuentran: el alcohol, el tabaco, radioactividad, solventes, etc. Pero una inferencia lógica es que no todas -- las inflamaciones derivan en enoplasias y no todas las neoplasias están

precedidas por inflamaciones (43).

Teoría Embrionaria. Propone que los restos embrionarios que se encuentran en la etapa adulta son el foco del desarrollo tumoral. Por ejemplo, los vestigios de la pituitaria pueden originar un carcinoma de bronquios, los restos notocordales se pueden transformar en un cordoma. Esta teoría no es capaz de explicar el origen de la gran mayoría de los cánceres en la vida adulta (43).

Teoría de la Mutación Somática y Teoría de la Activación Selectiva de Genes. Sin duda alguna, estas dos teorías son las más aceptadas actualmente. La teoría de la mutación somática postula que la transformación de células normales a células malignas es análoga a la formación de un mosaico de elementos aberrantes en el tejido normal. El término de mutación implica que ocurren algunos cambios fundamentales en el material genético somático de la célula, que conducen: primero, a un moderado aumento en la velocidad de la duplicación y finalmente a la pérdida completa del control de crecimiento. En tanto que la teoría de la activación selectiva de genes propone que la transformación es ocasionada por una expresión inapropiada de genes normales, y además sostiene que el fenotipo transformado puede ser reversible.

El crecimiento del tumor podría involucrar una activación selectiva de genes diferentes y la mutación somática sería un fenómeno incidental más que causal en el desarrollo de subclonas de gran malignidad (76).

Con el descubrimiento de los oncógenes se ha visto que tanto las mutaciones somáticas como la activación selectiva de genes son capaces de

generar células tumorales.

Inicialmente los oncogenes (del griego onkos = masa o tumor) se definieron como elementos genéticos de retrovirus que provocan una transformación maligna. Pero recientemente, se han encontrado las contrapartes celulares de los oncogenes virales (protooncogenes), los cuales se han conservado a través de la evolución. Se encuentran en especies muy diversas: moscas, peces y mamíferos incluyendo el hombre.

La gran conservación de los protooncogenes en las células -- normales, sugiere que pueden jugar un papel muy importante, probablemente en la diferenciación celular o en la división celular. La pregunta es: ¿qué es lo que hace que los oncogenes produzcan una división celular incontrolada y los patrones anormales de diferenciación vistos en las células cancerosas? Existen dos hipótesis para explicar la activación de los protooncogenes o oncogenes:

a) Hipótesis de la dosis - Que sugiere que la oncogénesis - ocurre ya sea:

- Cuando los protooncogenes celulares se amplifican genéticamente, es decir, hay muchas copias del mismo oncogene - en el genoma.
- Cuando se transcriben a altas velocidades, influenciados por promotores o activadores que aumentan la actividad de transcripción. Recientemente se han descrito virus que no

tienen oncogenes propios pero que tienen la capacidad de transformar células normales, cuando una secuencia viral llamada LTR (long terminal repeat) se inserta cerca de los protooncógenes; esta secuencia viral lleva promotores de la expresión génica (89).

- Cuando ocurren cambios estructurales en el protooncógeno, por la inserción de material vírico.
- Cuando está involucrado un rearrreglo cromosomal. Por ejemplo, las células tumorales de pacientes con linfoma de Burkitt presentan ciertas anomalías; la más común es un cambio de segmentos entre el cromosoma 8 y el 14. Una de las consecuencias de esta anomalía es la traslocación del gene celular myc de su posición normal en el cromosoma 8 al cromosoma 14; en esta nueva localización, el gen está influenciado por promotores que regulan la expresión de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. El mismo fenómeno se presenta en algunos plasmocitomas murinos (70,61).

B) Hipótesis del producto modificado. Sugiere que la oncogénesis resulta de la expresión de genes anormales producidos por una mutación puntual, codificando así para una proteína modificada. La mutación puntual puede ser producida por un carcinógeno químico o físico. Se ha descrito que existe una mutación en el codón 12 del gen ras de células tumorales inducidas por nitrometilurea, además de que otros ocho genes transformantes presentan mutaciones puntuales (61).

Ninguna de las dos hipótesis explica como un número aparentemente reducido de genes puede desarrollar una multitud de cambios pleiotrópicos en la apariencia y actividad celular. Sin embargo, en la observación clínica, se describen desequilibrios metabólicos como resultado de la expresión genética defectuosa (69).

3. ANTIGENOS TUMORALES

En los últimos años se han hecho grandes esfuerzos para la detección y caracterización de antígenos que aparecen en las células transformadas, ya sea por agentes químicos o por agentes virales (25).

El término antígeno en este contexto se refiere a aquellos productos que inician una respuesta inmune en hospederos autólogos o en receptores singénicos. Aunque una variedad de productos se han definido como antígenos por su reactividad con sueros alogénicos producidos contra extractos de tejido fetal o tumoral (73).

Los antígenos tumorales mejor conocidos que aparecen en el curso o después de la transformación maligna son:

A) Antígenos de Transplante Tumor-Específico (TSTA)

Estos antígenos aparecen en células transformadas tanto in vitro como in vivo, y se ha especulado sobre el papel importante en el mantenimiento del fenotipo maligno que estos antígenos pudieran tener (64). Por otro lado estos antígenos son capaces de provocar una respuesta inmune humoral y celular en el hospedero autólogo o en receptores singénicos. Aunque estos antígenos pueden tener un papel importante en la destrucción --

inmune de las células tumorales, no están bien caracterizados (24).

B) Antígenos Embrionarios o Fetales (Oncofetales)

Se ha sugerido que la expresión de características fetales en neoplasias ocurre por medio de la desrepresión de genes silenciados.

Las células tumorales producen componentes fetales tales como: hormonas, enzimas, proteínas placentarias y antígenos fetales.

Los antígenos oncofetales son moléculas que se expresan normalmente en tejido embrionario y que no se reconocen como propias en la etapa adulta por haber desaparecido antes del desarrollo del sistema inmune. Por lo cual dichos antígenos provocan una respuesta inmune en el hospedero adulto (25,5).

Se han descrito una gran cantidad de antígenos oncofetales, -- ejemplos de los cuales son: la α -fetoproteína, que es característica de hepatomas y teratocarcinomas de ovario (1,23), en el embrión dicha proteína se sintetiza en el hígado y se distribuye en el suero fetal. El antígeno carcinoembrionario (ACE) es una glicoproteína de 180 000 daltones que -- contiene un 65% de carbohidratos por molécula, está presente en neoplasias humanas de origen intestinal pero aún no se determina su origen embrionario (82,77). La sulfoglicoproteína que se encuentra en el jugo gástrico de pacientes con cáncer estomacal y en el tracto alimenticio fetal (38); el antígeno F de la enfermedad de Hodgkins se encontró en bazo e hígado fetal humano (22). Antígenos asociados a membranas de células leucémicas están presentes en embriones humanos del primer trimestre de gestación --

(97). Antígenos de melanoma se han encontrado en fibroblastos fetales (91). El antígeno oncofetal (AOF) que se encuentra en melanomas y en sistema nervioso embrionario (49), entre otros.

4. RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL

En la literatura esta fundamentada la existencia de antígenos de superficie de las células tumorales que inducen una respuesta inmune del hospedero.

Ehrlich sugirió en 1909, la existencia de una vigilancia inmunológica constante sobre los tejidos del individuo y que se encarga de eliminar células mutantes que pudieran aparecer y provocar un tumor (15,16). La multiplicidad de los mecanismos efectores envueltos en la resistencia contra los tumores, sugiere que in vitro se activa probablemente más de un mecanismo antitumoral.

A) Respuesta Inmune Celular

La respuesta inmune celular está mediada por células asesinas naturales (41), células asesinas (71), macrófagos activados (37) y linfocitos T citotóxicos (68).

Las células asesinas naturales tienen una actividad antitumoral independiente de anticuerpos y no restringida por antígenos de histocompatibilidad, su actividad citotóxica se puede aumentar por interferón y por linfocinas como Il-2 (40).

Las células asesinas o nuías tienen la capacidad de destruir - células tumorales recubiertas de anticuerpos de la clase IgG. Su actividad lítica depende de la expresión del receptor para el fragmento Fc de - la IgG y no requiere de complemento (7).

Los macrófagos requieren de un proceso de activación para llevar a cabo su actividad citolítica. La activación de los macrófagos se - puede desarrollar in vivo con estimulantes del sistema reticuloendotelial e in vitro con ciertas linfocinas. Se requiere del contacto celular entre el macrófago y la célula tumoral para la muerte de esta última, la cual - no depende de la fagocitosis, aunque esto puede ocurrir después de la -- muerte y fragmentación de la célula tumoral.

Los linfocitos T citotóxicos (LTCs) son los responsables de la respuesta inmune antitumoral más importante (67). Los LTCs tienen la capa - cidad de destruir células que manifiestan en su superficie estructuras -- alteradas, ajenas o modificadas. Esta destrucción es sumamente específica ya que sólo lisan a células semejantes a las que indujeron su activa-- ción.

La lisis celular por LTCs es el resultado de la colisión entre el LTC (célula efectora) y la célula tumoral (célula blanco). Algunos de los requerimientos necesarios para que los LTCs lleven a cabo su función - son los siguientes:

- viabilidad de la célula efectora
- contacto celular (célula efectora-célula blanco)

- receptor de la célula T para el antígeno
- cationes divalente (Ca^{2+} , Mg^{2+}) y glucosa
- los productos del CMH presentes en la célula blanco y en el LTC.

Los LTC sobreviven a la interacción con la célula tumoral y pueden interaccionar con otras células tumorales, las cuales tienen un papel completamente pasivo en el evento lítico, sirviendo solamente como "presentadores de antígeno".

B) Respuesta Inmune Humoral

Por mucho tiempo se ha considerado que los anticuerpos contra antígenos de células tumorales no tienen un papel importante en el control inmunológico de las células tumorales. Esta aseveración está basada principalmente en que estos anticuerpos no confieren inmunidad a nuevos hospederos (11,71), aunque se han reportado anticuerpos dirigidos contra antígenos tumorales capaces de destruir específicamente a la célula tumoral, en presencia de complemento. Estos hechos hacen difícil determinar el grado de importancia de la respuesta inmune humoral evocada contra células tumorales.

5. MECANISMOS DE ESCAPE DE LAS CELULAS TUMORALES

A pesar de los mecanismos inmunológicos que despierta una célula tumoral, ésta crece, se desarrolla y mata al hospedero. Este fracaso de la vigilancia inmunológica en la destrucción de las células tumorales podría ser explicado por uno o varios de los mecanismos de escape de las células tumorales, que a continuación se enumeran:

A. Modulación Antigénica

Algunas células tumorales tienen la capacidad de modular la expresión de sus antígenos de superficie al momento de entrar en contacto con anticuerpos dirigidos contra estos, ya sea desprendiéndolos en forma de complejos inmunes o internalizándolos (30,53). Además, ciertas neoplasias pueden desprender espontáneamente antígenos de su superficie, en grandes cantidades, sin haber interactuado aun con anticuerpos. Estos antígenos desprendidos tienen la capacidad de reaccionar con LTCs y anticuerpos dirigidos contra el tumor. De esta manera al desaparecer y liberar antígenos superficiales, la célula neoplásica evade la respuesta inmune.

B. Escasa Antigenicidad

Cuando un tumor se encuentra en sus primeras etapas de desarrollo puede no expresar antígenos tumorales (13) o expresa cantidades demasiado pequeñas como para estimular al sistema inmune. Para cuando estos antígenos son finalmente detectados, el tumor ha crecido en tal magnitud que aún la mejor respuesta inmunológica de rechazo no es suficiente para controlarlo (53).

C. Estados de Inmunosupresión Inducidos por el Tumor

Algunos tumores son capaces de inducir estados de inmunosupresión en el hospedero (3), mediante la secreción de moléculas farmacológicamente activas que estimulan células T supresoras que abaten la respuesta inmune (9).

D. Enmascaramiento de Antígenos de Histocompatibilidad

Ciertos tipos de tumores producen glicoproteínas de alto peso molecular que enmascaran los antígenos mayores de histocompatibilidad propios, impidiendo el reconocimiento de éstos por LTCs y anticuerpos. Tal es el caso del tumor mamario TA3 que produce una glicoproteína de 500 000 daltones denominada epiglicanina (88) y el mieloma murino LPC-1 que produce una glicoproteína de 160 000 daltones denominada gp160 (20).

E. Otros Factores

Algunas células tumorales se vuelven resistentes a la lisis -- por medio de la producción de material con actividad anticomplementaria (10), por una rápida reparación de los sitios dañados de la membrana celular (79), y por que los antígenos tumorales se encuentran bloqueados por anticuerpos no citotóxicos llamados facilitadores (41).

6. ENBRIOGENESIS Y CARCINOGENESIS

En los últimos años se ha reportado que las células cancerosas pueden expresar productos genéticos que en condiciones normales son componentes de células embrionarias o fetales, pero que están ausentes o presentes en muy bajas cantidades en células adultas (63).

La célula tumoral expresa proteínas de superficie características de células embrionarias y que se han detectado inmunológicamente (antígenos oncofetales). Estas proteínas fetales o embrionarias son fase-específicas, en el sentido de que son "apagadas" en el feto a término o en el

recién nacido. Aunque, por otro lado no se sabe que señales de desarrollo pueden inducir su expresión en circunstancias normales, y menos aún si son fase específicas en la célula tumoral (38,63).

Por otro lado se sabe que las células tumorales o neoplásicas además de los antígenos oncofetales, expresan otras propiedades embrionarias. Por ejemplo, se han encontrado formas de tRNA embrionario en células tumorales, además de que la metilación de tRNA es mucho más grande en células embrionarias y en células cancerosas que en células normales adultas (4). Se conoce desde hace tiempo que la actividad de metiltransferasas del hígado decrece marcadamente después del nacimiento y después de la formación del blastocisto, en la embriogénesis temprana del conejo (62). Otra característica compartida por las células embrionarias y las células tumorales es que se aglutinan por lectinas (66).

Por otro lado se sabe que las células embrionarias y fetales contienen antígenos de transplante contra los cuales la madre monta una respuesta inmune (80). Las células del trofoblasto de los mamíferos resisten a la respuesta inmune del hospedero, y pueden estimular el flujo local de sangre en los tejidos circundantes (33). Todas las células cancerosas, sin importar el tejido de procedencia comparten estas propiedades con las células del trofoblasto (23).

El escape del trofoblasto de la respuesta inmune de la madre debe de estar relacionado con procesos fisiológicos presentes en células fetales y no en células adultas; de la misma manera, una célula que ha sufrido una transformación maligna adquiere la capacidad de escape de la respuesta inmune. Alexander sugiere que las células malignas mimetizan

el escape de las células fetales (4), por otra parte se ha observado que células embrionarias liberan antígenos de histocompatibilidad de sus superficie, lo cual también se ha observado en algunos tumores (4). Por todo esto se antoja pensar que los antígenos fetales presentes en células tumorales pueden ser una consecuencia de que el tumor ha adquirido alguno de los mecanismos de escape de las células fetales.

En todos estos ejemplos, la pregunta sin respuesta es: si la expresión de características embrionarias es una parte integral de la transformación maligna o es un efecto incidental.

Hay tres posibilidades de generar un fenotipo maligno a partir de un genotipo inalterado; tal fenotipo maligno podría resultar de la -- coexpresión en la célula adulta (a) de un tipo de genes expresados normalmente durante la ontogenia; (b) de la combinación de diferentes genes o -- (c) de genes que están normalmente silenciados durante la ontogenia (63). Aunque una dificultad para aceptar la última posibilidad es que resulta -- sumamente difícil probar la existencia de un gene dado que nunca se ha expresado durante la ontogenia, las otras dos posibilidades, sin embargo, parecen tener más futuro.

7. ANTECEDENTES

Estudios previos muestran que el mieloma murino LPC-1 (H-2^d) adquiere periódicamente una resistencia a la lisis por linfocitos T citotóxicos (LTCs) o por anticuerpos y complemento.

El mieloma LPC-1 crece en la cavidad peritoneal de ratones de la cepa BALB/c (H-2^d) y producen ascitis. Las células obtenidas de la --

cavidad peritoneal del ratón tres días después de la inoculación del tumor (células tempranas) son susceptibles a la lisis por LTCs o por anticuerpos dirigidos contra H-2 y complemento cuando se prueban en un ensayo de citotoxicidad. Sin embargo, las células LPC-1 obtenidas 12 - 14 días después de la inoculación del tumor (células tardías) se muestran resistentes a la lisis inmune (Fig. 2) (18).

Estudios comparativos de la superficie de las células LPC-1 tempranas y tardías, muestran que la aparición del fenotipo resistente correlaciona estrechamente con la expresión de una proteína de membrana de 160 000 daltones (gpl60), la cual se acumula con el tiempo en la superficie de las células LPC-1 (Fig. 3) (19).

La resistencia de las células tardías a la lisis por LTCs y por anticuerpos anti-H-2^d y complemento se pierde cuando las células son transplantadas a ratones BALB/c y extraídas tres o cuatro días después; cuando las células se mantienen en cultivo por más de cuatro días (39) o cuando se tratan con tripsina, quimiotripsina, subtilisina, (proteasas) o neuraminidasa (glicosidasa) (Fig. 4) (19). Todos estos tratamientos disminuyen la concentración de gpl60 en la superficie celular.

Estudios cuantitativos de los antígenos de histocompatibilidad H-2 presentes en la superficie de las células tempranas y tardías -- tratadas con tripsina, muestran que hay cantidades semejantes en ambos tipos celulares, lo cual sugiere que gpl60 puede estar interaccionando con ellos, impidiendo estéricamente su reconocimiento por LTCs y por anticuerpos anti-H-2 (39). Posteriormente se observó que gpl60 interacciona preferentemente con los antígenos H-2D y H-2K y que antígenos no --

relacionados con el complejo mayor de histocompatibilidad no están signi-
ficativamente enmascarados por gp160 (20).

gp160 es una glicoproteína formada por una sola cadena poli--
peptídica, rica en ácido siálico (10% de su peso molecular) y se ha esti-
mado que existen 1.5×10^6 moléculas de gp160 por célula tardía LPC-1,
en tanto que el número de moléculas H-2 que existen por linfocito es de
 5×10^5 . En las células LPC-1 existirían tres moléculas de gp160 por una
de H-2, lo cual hace posible una gran interacción entre estas dos moléculas
dando por resultado un mecanismo de escape a la respuesta inmune del
hospedero (78).

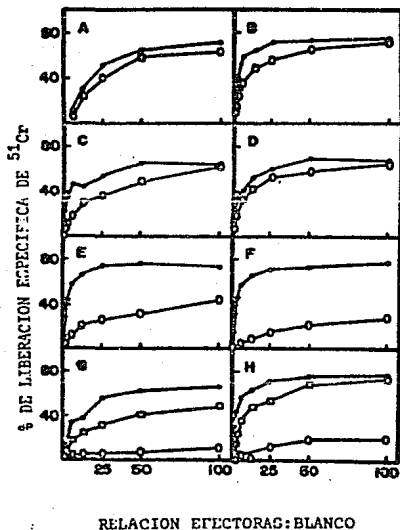


Fig. 2. Cambios en el tiempo de la susceptibilidad de las células LPC-1 a la lisis por LFCs anti-H-2^d. Se mide la susceptibilidad a la lisis (liberación de ⁵¹Cr) de células LPC-1 cosechadas 2,4, 6,8,10,12,14 día después de haber sido inoculadas en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c (PANEL A,B,C,D,E,F,G,H, respectivamente. Células LPC-1 o—o, Blastos H-2^d ●—●. Células retransplantadas □—□.

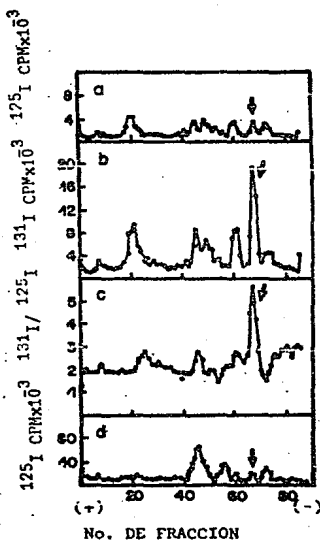


Fig. 3 . Electroforésis en geles de poliacrilamida-SDS de los componentes radioiodinados de la superficie de las células LPC-1 tempranas (a), tardías (b) y tempranas + tardías (c). La mayor diferencia radica en la fracción 65, indicando un aumento en la cantidad de una proteína de 160 000 daltones en las células LPC-1 tardías; esta proteína es eliminada cuando las células se tratan con tripsina (d).

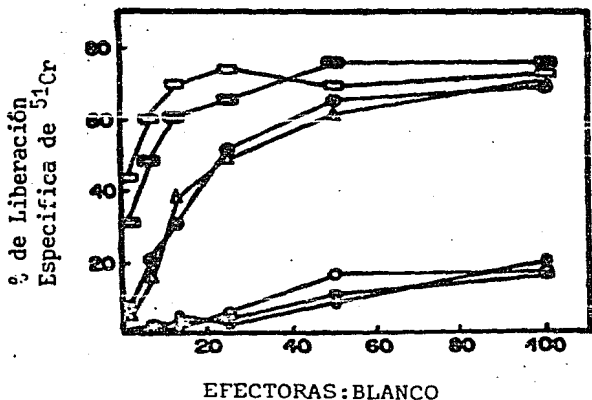


Fig. 4. . Efecto de diferentes proteasas sobre la susceptibilidad de las células LPC-1 tardías a la lisis por LTCs anti-H-2^d. Las células LPC-1 tardías son tratadas con tripsina (○—○), quimotripsina (■—■), subtilisina (□—□), proteasa de *Staphylococcus* (◉—◉) y trombina (△—△). Las células LPC-1 tempranas no tratadas (○—○) y tardías (◉—◉) están incluidas.

II. OBJETIVOS

Por todo lo anterior resulta interesante saber si la glicoproteína tumoral gp160 es un antígeno exclusivo de células tumorales (antígeno tumoral) o bien si se expresa en tejido adulto y/o embrionario.

Por lo que la estrategia del presente trabajo es:

1. Identificar los componentes de la superficie de las membranas de diferentes mielomas murinos por métodos bioquímicos, y compararlos con los componentes superficiales de las células LPC-1.
2. Producir anticuerpos contra la proteína gp160, y verificar la reactividad de dichos anticuerpos con la proteína.
3. Con la ayuda de los anticuerpos, estudiar la distribución de la glicoproteína gp160 en tejido adulto y embrionario.

III. MATERIALES Y METODOS

1. ANIMALES

Se utilizan ratones de diferentes cepas, dependiendo del haplotipo de su Complejo Mayor de Histocompatibilidad H-2 (CMH):BALB/c, (H-2^d), BALB-b (H-2^b), BALB-k (H-2^k), C57BL/6 (H-2^b), NZB (H-2^d) y CD2 (BALB/c X DBA/2, F1) (H-2^d).

Estas cepas son mantenidas y conservadas en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

2. LINEAS TUMORALES

Los tumores de células plasmáticas (mielomas H-2^d) LPC-1, LPC-1-LITTON, OPEC 315, MOPC 167 y MOPC 460 se mantienen en forma de ascitis en la cepa de ratón BALB/c (H-2^d) en tanto que el mieloma Pc3 (H-2^d) se mantiene en la cepa NZB (H-2^d) y el mastocitoma P815 (H-2^d) se mantiene en la cepa CD2 (H-2^d). El mieloma X63. Ag8 (H-2^d) se mantiene in vitro.

Las células tempranas y tardías se obtienen de 3-4 días y 12-14 días después de su trasplante, respectivamente, por medio de lavados de la cavidad peritoneal del ratón, con 5-10 ml de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS, 0.15M NaCl, 0.01M fosfatos, pH 7.4). Las células se lavan tres veces con PBS por centrifugación a 400 g durante 10 minutos, posteriormente se resuspenden en 30 ml de PBS y se cuentan en un hemocitómetro. El número de células por mililitro se calcula me--

diante la siguiente fórmula (27):

$$\text{Células/Cm}^3 = \text{NC} \times \text{d} \times 10^4$$

donde: NC - Número de células

d - Factor de dilución.

10^4 - Factor que transforma el número de células de un mm^2 a el número de células en mm^3

3. CULTIVOS DE CELULAS

3.1 Precauciones

Cuando se tiene un cultivo de células es necesario extremar los cuidados al trabajar, así como la esterilización del material y de las soluciones que se van a utilizar; por lo que:

- a) Todo el material antes de trabajar, debió haber sido lavado, enjuagado y esterilizado.
- b) Todas las manipulaciones de un cultivo de células se deben realizar en un laboratorio exclusivo para el cultivo celular y en campanas de flujo laminar
- c) El material utilizado para este fin debe ser exclusivo
- d) De ser posible, usar reactivos de máxima pureza, de grado cultivo de células.

3,2 Soluciones

- Antibióticos: Penicilina 100 mg/ml, estreptomina 100 mg/ml (100X)
- Antimicóticos: anfotericina B 250 ug/ml (100X)
- L-Glutamina 200 mM (100X) (GIBCO)

- Aminoácidos no esenciales (100X) (GIBCO)

L-alanina	0.89 mg/ml
L-asparagina	1.50 mg/ml
L-ácido aspártico	1.33 mg/ml
L-ácido glutámico	1.47 mg/ml
Glicina	0.75 mg/ml
L-prolina	1.15 mg/ml
L-serina	1.05 mg/ml

- Concanavalina A 1 mg/ml (Sigma)

- Lipopolisacárido 1 mg/ml (E. coli, O111:B4, DIFCO)

3.3 Suero

Se utiliza suero fetal bovino (Flow Laboratories, Virginia, USA) libre de micoplasma y de inmunoglobulinas. Antes de utilizarse el suero se descomplementa calentándolo durante media hora en baño maría a 56°C.

3.4 Medio de Cultivo

Todas las células crecidas in vitro se cultivan en medio RPMI 1640 (GIBCO) el cual se prepara disolviendo el contenido de un sobre en un litro de agua desionizada, y se agregan 2 g de bicarbonato de sodio -- por litro y se ajusta el pH a 7.3. Se esteriliza por filtración en doble filtro millipore de 0.22 um y finalmente se almacena en alícuotas de 500 ml a 4°C. Al momento de utilizarse cada 100 ml de medio se suplementan con:

- 1 ml de solución de antibióticos
- 1 ml de la solución de antimicóticos
- 1 ml de la solución de L-Glutamina
- 1 ml de la solución de aminoácidos no esenciales
- 10 ml de suero fetal bovino

Las células de bazo y de timo de ratón puestas en cultivo, se estimulan con 50 µg/ml de lipopolisacáridos (mitógeno de células B) o con 5 µg/ml de Concanavalina A (mitógeno de células T).

Todas las células se mantienen a 37°C y en una atmósfera húmeda con 7% de CO₂.

3.5 Congelación de células

2 x 10⁷ células tumorales se centrifugan y se resuspenden en un mililitro de medio de congelación (90% suero fetal bovino, 10% DMSO) a 4°C. Se colocan en un criotubo y en una caja de poliestireno con paredes de 1 cm de grosor, la cual se guarda a -80°C por 24 Hr y posteriormente los tubos se trasladan a un tanque de nitrógeno líquido. Las células se mantienen por tiempo indefinido bajo estas condiciones.

3.6 Descongelación de Células

Se retira el criotubo del nitrógeno líquido y se descongela inmediatamente después en un baño maría a 37°C. Las células son inyectadas a un ratón receptor, o son mantenidas en cultivo bajo las condiciones ya mencionadas.

3.7 Crecimiento

Las células de los mielomas deben mantenerse a una densidad de 10^5 - 4 x 10⁵ células por mililitro, lo cual se logra diluyéndolas 1:5 diariamente con medio de cultivo. En tanto que las células de bazo y de timo se mantienen a una densidad de 5 x 10⁶ células por mililitro.

4. TECNICAS INMUNOQUIMICAS

4.1 Obtención de Antisueros y Sueros Normales

a) Antisuero de ratón anti-LPC-1. Se obtiene de la inmunización por vía intraperitoneal de ratones BALB.b con 10^7 células LPC-1). El tumor crece inicialmente pero es rechazado alrededor del día 20. Los animales se refuerzan el día 28 con 10^7 células LPC-1 y después cada 15 días. Los ratones se sangran 7 días después de cada refuerzo y el suero se almacena a -70°C .

b) Antisuero de conejo anti-gpl60. Se obtiene de la inmunización de conejos con gpl60 purificada por columnas de afinidad. Los conejos se inmunizan por vía intradérmica con 100 μg de proteína en un mililitro de adyuvante completo de Freund. Después de la inmunización los animales se refuerzan al siguiente mes y se sangran a los 10 días después del refuerzo.

c) Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo. Estos anticuerpos se adquieren comercialmente de los laboratorios Cappel (Pensilvania, USA).

d) Sueros normales. Se obtienen del sangrado de un conejo normal o de ratones normales, generalmente los mismos que posteriormente serán inmunizados.

4.1.1 Purificación de Antisueros

Los antisueros y sueros normales tanto de ratón como de conejo se purificaron mediante una columna de afinidad (Sephacosa 4B acoplada a proteína A) (51).

La proteína A tiene la propiedad de reaccionar fuertemente con el fragmento Fc de algunas clases de inmunoglobulinas de diferentes especies (84). Todas las IgG's se unen a la proteína A, y en el caso del ratón solo se pierden las IgG₁. Una molécula de proteína A puede enlazar -- al menos dos moléculas de inmunoglobulinas. La proteína A se acopla a -- Sepharosa 4B covalentemente por el método de Cuatrecasas y el inmunoadsorbente resultante, que contiene 4 mg de proteína A, puede enlazar hasta -- 30 mg de IgG por mililitro de gel. La columna de Sepharosa-proteína A se lava con TRIS-HCl 0.1 M pH 7.95 a una velocidad de flujo de 20 a 40 ml/hr. Posteriormente, se aplican 2 ml del antisuero a la columna y se deja incubar una hora a temperatura ambiente. Inmediatamente después, la columna se lava con TRIS-HCl 0.1 M pH 7.95 hasta que la absorbancia a 280 nm sea cero, eliminándose así la proteína no adsorbida. Las inmunoglobulinas se eluyen con glicina-HCl 0.1 M pH 3.0 a la misma velocidad de flujo. El -- eluido se colecta en fracciones de un mililitro en tubos que contiene 0.1 ml de TRIS-HCl 1 M pH 7.95 para neutralizarlo. Las fracciones con alta cantidad de proteína (absorbancia a 280 nm) son dializadas contra PBS, alícuotadas y almacenadas a -70°C hasta su uso.

4.1.2 Comprobación de la reactividad de los antisueros.

Antes de utilizar los diferentes antisueros, se verifica su -- reactividad por medio de la técnica de Ouchterlony (48).

a) Preparación de placas para inmunodifusión. Se prepara una solución de agarosa tipo II (Sigma) al 0.8% en PBS y se pone a disolver -- en un baño maría en ebullición, se deja enfriar a 60°C aproximadamente e

inmediatamente después se colocan 5 ml de la solución de agarosa sobre ca da portaobjetos a utilizar. Se deja solidificar y por último se perforan las placas. Se colocan 10 ul de los sueros a probar, en cada pozo de la placa de inmunodifusión, previamente diluidos en PBS, contra 10 ul del -- antígeno. El Ag y el Ac deben de encontrarse en concentraciones equipara bles, y alrededor de 1 mg/ml. La placa se deja en cámara húmeda a 4°C du rante una noche para que se lleve a cabo la reacción antígeno-anticuerpo.

b) Tinción de placas. Las placas se lavan con solución salina 0.15 M durante 24 hrs. Después se colocan en agua destilada por una hora. Al cabo de este período, se pone papel filtro sobre cada placa y se deja secar por un día a temperatura ambiente. El agar deshidratado queda -- adherido al papel filtro como una película fina. Se enjuaga con agua des tilada y se tiñe con amido negro (amido negro 0.1%, metanol absoluto 20%, ácido acético 1%, agua destilada) durante 10 minutos. Las placas se des tiñen con una solución de ácido acético al 2%.

4.2 Acoplamiento de IgG de Cabra Anti-IgG de Conejo a Isotiocianato de Fluoresceína (34)

4.2.1. Procedimiento de Conjugación.

La concentración de proteína (IgG) a la cual se obtienen los me jores resultados de conjugación es de 4-5 mg/ml en tanto que la concentra ción de isotiocianato de fluoresceína es de 12.5 mg/ml de proteína.

El fluorocromo se disuelve en 50-100 ul de una solución 0.1 M de carbonato de sodio. La solución de proteína (2-3 ml) es equilibrada en frío llevando el pH a 9.0 añadiendo carbonato de sodio 0.1 M. Una vez equi

librada la solución de proteína, se le añade lentamente la solución de -- fluorocromo. Para mantener el pH en 9.0 se agrega carbonato de sodio -- 0.05 M cuando es necesario. Si el pH no cambia después de 15 minutos, la mezcla se deja reaccionar en frío con agitación y en la oscuridad durante 18 hrs. Para remover cualquier precipitado, la muestra se centrifuga en una centrifuga Eppendorf durante 10 minutos (14000 g).

4.2.2 Purificación del Conjugado

Para su purificación, el conjugado se pasa por una columna de Sefadex G-50 (fino) de 8-10 mm de diámetro y 60 cm de longitud. La columna se lava previamente con PBS pH 7.5. La elución se realiza con el mismo buffer y se obtienen dos fracciones: la primera corresponde al anticuerpo conjugado y la segunda corresponde al fluorocromo libre, que no reaccionó (absorbancia a 280 nm y absorbancia a 495 nm).

4.2.3 Evaluación del Conjugado

La concentración del anticuerpo y la relación fluorocromo-anticuerpo se calculan en función de la densidad óptica a la cual absorban -- tanto la proteína (absorbancia 280 nm) como el isotiocianato de fluoresceína (absorbancia 495 nm), y utilizando las siguientes fórmulas:

$$\frac{\text{Absorbancia } 280 \text{ nm} - (0.35 \times \text{absorbancia } 495 \text{ nm})}{1.4} = \text{concentración de anticuerpo (mg/ml)}$$

$$\frac{2.87 \times \text{absorbancia } 495 \text{ nm}}{\text{Absorbancia } 280 \text{ nm} - (0.35 \times \text{absorbancia } 496 \text{ nm})} = \text{moles de fluorocromo - por moles de anticuerpo}$$

Por regla general, los conjugados con una relación molar menor de 1 son reactantes pobres, en tanto que conjugados con una relación molar de 2 - 3 dan buenos resultados.

4.2.4 Almacenamiento del conjugado

El conjugado se hace isotónico dializándolo contra PBS y se ajusta la concentración de anticuerpo a 0.5 mg/ml. El conjugado se esteriliza por filtración en filtros de acetato de nitrocelulosa 0.22 μ m (Millipore) y se almacena a 4°C en la obscuridad.

4.3 Radioiodinación (125 I) de los Componentes Superficiales de las Células Tumorales

4.3.1 Marcaje de la superficie celular

Para la caracterización de las moléculas de la superficie celular de las células tumorales se empleó la técnica de iodinación descrita por Marchalonis (50). La técnica se basa en la oxidación de iones yoduro en presencia de lactoperoxidasa y peróxido de hidrógeno para dar lugar a un complejo enzimático capaz de convertir los residuos de tirosina de las proteínas superficiales en derivados monoiodinados. La histidina también puede reaccionar aunque en menor grado (47). Debido al alto peso molecular de la lactoperoxidasa (78 Kd) ésta no penetra a la célula, lo que proporciona un sistema particularmente útil para el marcaje de las proteínas superficiales.

En resumen, a 1×10^7 células tumorales (95 - 100% de viabilidad) previamente lavadas con PBS se les agregan 10 μ l de lactoperoxidasa

(4 mg/ml en PBS) y 1 mCi de Na^{125}I (Amersham, actividad específica 350 - 500 mCi/mM). Inmediatamente después, se agregan 10 ul de una solución fresca de H_2O_2 al 0.03% preparada en PBS; las células se incuban por 5 minutos a 30°C; los dos últimos pasos se repiten dos veces más. Para parar la reacción y eliminar el exceso de ^{125}I libre, las células se lavan 3 veces con 15 ml de PBS-KI 5 mM y una vez más con PBS centrifugando a 450 g durante 5 minutos.

4.3.2 Solubilización de los componentes superficiales radioiodinados

Para solubilizar los componentes radioiodinados de la superficie celular las células marcadas (10^7) se resuspenden en 100 ul del detergente no iónico NP-40 al 0.5% en PBS y en presencia de inhibidor de proteasas PMSF (fenilmetilsulfonilfluoruro, Sigma) y se incuban durante 30 minutos a 4°C. Al cabo de este periodo la fracción soluble se separa de los restos celulares por centrifugación a 14 000 g en una centrífuga Eppendorf (54).

4.3.3 Precipitación de proteínas celulares por TCA

Cuando las proteínas se llevan a su punto isoeléctrico por la adición de H^+ (TCA), su carga neta es cero y precipitan, separándose de esta manera el isótopo libre de la marca incorporada a las proteínas (6).

A 10 μl (10^6 EqCe) de extracto celular en NP-40 0.5% se le añaden 10 ul de suero fetal bovino (para hacer visible el precipitado) y 3 ml de TCA al 10%. La mezcla se incubó 10 minutos a 4°C y se centrifuga a 500 g por 5 minutos; el precipitado se lava dos veces más con 3 ml de TCA.

al 10%, dejando incubar nuevamente y centrifugando de igual modo. El precipitado resultante se resuspende en un mililitro de PBS y se cuenta en un contador gama Autologic (Abbot).

4.4 Inmunoprecipitación de los Antígenos de la Superficie Celular

Las células tumorales se iodinan y solubilizan en NP-40 como se describió anteriormente. A 100 ul del extracto celular se le añaden 20 ul del antisuero específico y se incuba la muestra durante una hora a 4°C. - Para aislar los complejos antígeno-anticuerpo se añaden a la muestra 100 ul de una suspensión al 10% de Staphylococcus aureus, tipo Cowan I inactivado (Pansorbin, Calbiochem) en PBS-NP 40 al 0.5% y se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este periodo, la muestra se centrifuga a 14 000 g por 5 minutos en una centrífuga Eppendorf y se lava tres veces más con PBS-NP 40 al 0.5%. El Staphylococcus aureus presenta en su superficie proteína A la cual tiene receptores para la fracción Fc de las inmunoglobulinas. Al centrifugar la muestra el Staphylococcus aureus sedimenta, llevándose los complejos antígeno-anticuerpo que se encuentran fijados en su superficie (26).

Los complejos inmunes unidos a la bacteria se eluyen con 50 ul de 0.1 M TRIS (pH 6.4), 5% SDS y 5% beta-mercaptoetanol en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos. La muestra se centrifuga a 14 000 g por 10 minutos, el sobrenadante se conserva y se analiza por medio de electroforésis en geles de poliacrilamida en SDS. Las proteínas inmunoprecipitadas se identifican mediante la autorradiografía de los geles.

4.5 Determinación de Proteína por el Método de Lowry (59)

La determinación de proteína con el reactivo de Folin consta de dos pasos esenciales:

- a) La reacción de la proteína con el Cu^{++} en alcali formando el complejo Cu^{++} -Proteína
- b) La reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico (reactivo de Folin) por el complejo Cu^{++} -proteína (aminoácidos aromáticos), dando como resultado diferentes grados de coloración azul, la cual es proporcional a la concentración de proteína presente. La relación es lineal en un rango de proteína de 10-100 μg .

A diferentes cantidades de una solución patrón de seroalbúmina bovina (en PBS, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y de las muestras problema aforadas a un mililitro de agua se les añaden 4 ml de reactivo A (Na_2CO_3 2% en NaOH 0.1 N, - tartrato de sodio y potasio 2%, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1%) y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después se agregan 0.4 ml de reactivo de Folin (diluido 1:2 en agua) y se deja incubar 30 minutos a temperatura ambiente, al cabo de lo cual se lee la absorbancia a 595 nm de cada muestra y se traza la curva patrón. Los valores de absorbancia de los problemas se interpolan en la curva patrón y se calcula la concentración de proteína.

4.6 Electroforesis de Geles de Poliacrilamida-SDS

Las proteínas de la superficie celular se analizan por electroforesis en geles de poliacrilamida siguiendo la metodología descrita por Laemmli (55,92).

En este método se tienen concentraciones discontinuas de acrilamida y de pH. En el gel concentrador la acrilamida se usa al 5% y a un pH de 6.8, en tanto que el gel separador contiene 7.5% de acrilamida y un pH de 8.8. Como solución de corrida se usa TRIS-glicina (pH 8.3). Inicialmente las muestras se mezclan vol/vol con 0.3 M TRIS pH 6.4, 5% SDS, 5% beta mercaptoetanol y 0.002% azul de bromofenol y se colocan en un baño de agua en ebullición por 5 minutos. Después de colocar las muestras se aplica una corriente de 15 mA por gel en placa y 3 mA por gel en tubo, hasta que la muestra rebasa el gel concentrador y la corrida se continua a 20 mA por gel en placa y 5 mA por gel en tubo hasta que la muestra llega al límite inferior del gel separador.

Dependiendo de las características de las muestras los geles se procesan de diferentes maneras.

4.6.1 Tinción de Coomasie (57)

El gel se coloca en azul de Coomasie (Azul brillante de Coomasie R 250 0.06%, metanol 30%, ácido acético 10%) durante 30 minutos o toda la noche. Posteriormente se destiñe con una solución de ácido acético 10%, metanol 5%. Esta tinción detecta hasta un microgramo de proteína.

4.6.2 Tinción de Schiff (31)

a) Preparación del reactivo de Schiff. Se disuelve un gramo de fuscina básica en 200 ml de agua hirviendo, se agita por 5 minutos y se deja enfriar hasta 50°C, al cabo de lo cual la solución se filtra y se le añaden 20 ml de 1N HCl. Nuevamente se deja enfriar (25°C), se le añade un

gramo de metabisulfito de sodio y se guarda en obscuridad durante 12 hrs. Posteriormente se le agregan 2 g de carbón activado se agita por un minuto, se filtra y se guarda a temperatura ambiente en un frasco ámbar.

b) Tinción. El gel se fija en una solución de TCA al 12.5% durante 30 minutos, inmediatamente después se coloca en ácido acético al 7.5% por una hora, después se pasa a una solución de ácido periódico al 0.2% en agua y se incuba por 45 minutos a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo, el gel se coloca en reactivo de Schiff y se deja incubar 45 minutos o más a 4°C. Para desteñir el gel se le practican varios cambios de una solución de ácido acético al 10%.

4.6.3 Tinción de Plata (65)

Esta técnica es muy sensible y detecta cantidades de proteína en el orden de nanogramos. El gel se coloca en una solución de alcohol metílico al 50%, ácido acético al 12% durante 30 minutos. Después el gel se pasa a una solución de alcohol etílico al 10%, ácido acético al 5% y se deja incubar 45 minutos, al cabo de los cuales se coloca en una solución de dicromato de potasio 3.4 mM en agua y ácido nítrico 3.2 mM por 10 minutos. El gel se lava exhaustivamente con agua bidestilada y a continuación se le agregan 100 ml de una solución de nitrato de plata 10 mM en agua desionizada y se incuba 30 minutos. El gel se revela con una solución de carbonato de sodio anhidro 0.28 M en agua y formaldehído (100 ul/100 ml). La reacción de revelado se detiene con ácido acético al 1% en agua.

4.6.4 Identificación de la Marca Radioactiva

a) Autorradiografía en placa de rayos X.

Los geles de placa que contienen muestras radioactivas (^{125}I), se secan y se ponen en contacto con una placa sensible a rayos X. La placa se coloca a -70°C por diferentes períodos de tiempo, lo cual depende de la cantidad de marca presente en la muestra (5 días con 20 000 c.p.m.).

b) Determinación directa

Los geles de poliacrilamida de tubo que contienen muestras radioactivas (^{125}I) se congelan en hielo seco y se rebanan en secciones de 2 mm de grosor y finalmente se determina la cantidad de radioactividad -- de cada sección en un contador gamma Autologic Abott. Se determina el -- Rf de las secciones en las que aparece marca radioactiva y se calcula el peso molecular de la muestra.

4.7 Purificación de Membranas Plasmáticas

La sedimentación de equilibrio o colchón de densidad tiene la capacidad de separar sustancias o partículas de acuerdo a su densidad.

La purificación de membranas plasmáticas de células tumorales se hace como sigue (46). Brevemente, 6×10^7 células tumorales por mili litro de solución hipotónica (100 mM MgCl_2 , 1 M NaCl, PMSF 1 mM y 0.02% de azida de sodio) se dejan en reposo durante 20 minutos a 4°C . Después de este tiempo las células se rompen en un homogeneizador de tejidos -- (Wheaton 357544) 20 golpes a 4°C . El homogeneizado se coloca sobre un -- colchón de sacarosa al 41% en tubos de nitrocelulosa previamente lavados con EDTA y enjuagados con agua desionizada. Se centrifuga a 95 000 X g por 2 hrs. Las membranas plasmáticas forman una banda blanca en la inter fase del homogeneizado y el colchón de sacarosa; se separan y se lavan -

una vez con solución hipotónica y dos veces con PBS centrifugando a -- 95 000 X g durante 20 minutos cada vez. El precipitado que contiene las membranas se almacena a -70°C hasta su uso.

4.8 Purificación de la Glicoproteína Tumoral gp160

Las células, partículas subcelulares y moléculas que contie-- nen carbohidratos solubles se pueden purificar por cromatografía de afinidad con aglutinina de germen de trigo (WGA) acoplada a Sepharosa 6B, ya que esta lectina tiene la capacidad de enlazar selectivamente porciones - de carbohidratos que contienen N-acetilglucosamina y ácido siálico. Un - mililitro de gel contiene 5 mg de WGA y enlaza aproximadamente 1 mg de -- glicoproteína por mililitro de gel.

4.8.1 Acoplamiento de WGA de Sepharosa 6B

a) Activación de Sepharosa 6B (48). Se suspenden 10 g de -- Sepharosa 6B en 10 ml de Na_2CO_3 2M y 6 ml de agua y se lleva a una temper-- ratura de 5-6°C. Se le añade poco a poco una solución de 400 mg de CNBr en 4 ml de agua a la misma temperatura (5-6°C). La mezcla se deja agitan-- do por 10 minutos manteniendo el pH entre 9 y 11 con NaOH 6N y se filtra por succión. La Sepharosa activada se lava exhaustivamente con agua -- (300 ml) y M NaHCO_3 0.1 (100 ml).

b) Acoplamiento de WGA a Sepharosa 6B. La Sepharosa activada (1 g) se suspende en 10 ml de NaHCO_3 0.1 M, NaCl 0.5 conteniendo 10 mg - de WGA disueltos en el buffer en presencia de N-acetil glucosamina al 2%. Para proteger los sitios activos de la WGA la mezcla se deja agitando a

temperatura ambiente por 2 hrs, y a 4°C 12 hrs más. Al cabo de este período, la mezcla se lava por succión con 200 ml de 0.1 M NaHCO₃, 100 ml de agua y 100 ml de PBS. El gel húmedo se suspende en PBS y se coloca en una columna.

4.8.2 Purificación

Una vez acoplada la WGA a Sepharosa y montada en la columna, ésta se lava con PBS-Desoxicolato de sodio 0.25% (DOC-Na) con una velocidad de flujo de 30 a 40 ml por hora. Las membranas plasmáticas de las células tumorales LPC-1 tardías se solubilizan en PBS-DOC Na 0.5% (1×10^9 eq c/ml) durante una hora, y se centrifugan a 14000 X g por cinco minutos para eliminar el material insoluble. El sobrenadante se coloca en la columna, se deja incubar 30 minutos a temperatura ambiente y se lava con -- PBS-DOC Na 0.25% hasta que la absorbancia a 280 nm o las c.p.m. sean cero, para eliminar la proteína no unida. La glicoproteína tumoral gp160 se -- eluye de la columna por competencia con N-acetilglucosamina 10%, PBS-DOC Na 0.25%. El eluido rico en proteína (absorbancia 280 nm 6 c.p.m.) se -- concentra y se dializa. La concentración de proteína se determina por el método de Lowry.

La pureza de la glicoproteína eluida se determina por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS teñidos por reactivos de Schiff, - plata y Coomassie.

4.9 Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia se introdujo a la biología celular a -- principios de los 40s cuando Coons et al., describieron por primera vez la

posibilidad de acoplar tintes fluorescentes a inmunoglobulinas sin afectar su actividad, dando por resultado una técnica capaz de detectar de manera sensible y específica algunas partículas y antígenos solubles en tejidos animales.

La técnica es ahora utilizada para resolver problemas de virología, microbiología, patología y diagnóstico. En la inmunología básica algunos problemas importantes relacionados con la diferenciación de inmunocitos se elucidaron por inmunofluorescencia. La técnica es una poderosa herramienta para el estudio de antígenos de membrana (34).

4.9.1 Inmunofluorescencia indirecta sobre células en suspensión (14)

La técnica recibe el nombre de inmunofluorescencia indirecta porque en ella se emplean dos anticuerpos, el primero que está dirigido contra el antígeno que se desea identificar; y el segundo está dirigido contra el primer anticuerpo y que además se encuentra acoplado a un fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína o rodamina), de esta manera se amplifica considerablemente la señal.

La presencia de gp160 en células del sistema inmune de diferentes cepas de ratón se detecta por inmunofluorescencia indirecta sobre células de bazo y timo de tres días de cultivo y sobre células de médula ósea recién obtenidas.

Las células se lavan 3 veces por centrifugación a 400 g durante 10 minutos. Un total de 10^6 células se resuspenden en 50 ul de inmunoglobulinas de conejo anti-gp160 (6 mg/ml) (primer anticuerpo) o en 50 ul de inmunoglobulinas provenientes del suero preinmune de conejo (6 mg/ml)

(suero control). La suspensión celular se incuba 30 minutos, se lava 3 veces como se describió anteriormente con PBS-Na₃ 0.01M. Las células se resuspenden en 50 µl del anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo acoplado a isotiocianato de fluoresceína (1 mg/ml) diluido 1:5 en PBS-Na₃ 0.01M (segundo anticuerpo) y se incuban por 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Al cabo del tiempo, las células se lavan tres veces con PBS y se resuspenden en 50 µl de PBS-glicerol (1:9). Las células positivas se enumeran por microscopía de fluorescencia.

En todos los casos se observaron por lo menos 100 células de -- diferentes campos escogidos al azar, para determinar el porcentaje de células fluorescentes.

4.9.2 Inmunofluorescencia indirecta sobre cortes histológicos (93).

Para determinar si gpl60 se encuentra en tejidos normales de -- ratón y en tejido embrionario se hacen cortes de 6 µm por congelación -- (criostato, -20°C) de hígado, cerebro y embriones de 17 días de gestación. Los cortes se sumergen en acetona a -20°C por 5-10 minutos, se secan a temperatura ambiente y se utilizan para inmunofluorescencia durante las próximas 48 hrs.

Las secciones se incuban con el primer anticuerpo (anti-gpl60 e IgG normales) a las mismas concentraciones que en el caso de células en -- suspensión, durante 30 minutos en atmósfera húmeda. Después de la incubación con el primer anticuerpo las secciones se lavan 3 veces con PBS y se incuban a temperatura ambiente, en atmósfera húmeda y oscuridad durante 30 minutos con el anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo, fluoresceinado (1 mg/ml) diluido 1:40 en PBS. Los cortes se lavan exhaustivamente con --

PBS, se montan en PBS-glicerol (1:9 v/v) y se observan al microscopio de fluorescencia.

Los cortes seriados se tiñen con hematoxilina y eosina (58) -- para la identificación celular.

5. ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados obtenidos se analizaron por la prueba de t de student.

IV. RESULTADOS

1. PURIFICACION DE ANTISUEROS

La fracción de las inmunoglobulinas (gamma) de los antisueros y sueros normales (preinmunes) se purifican por afinidad al pasarse por una columna de Sepharosa 4B acoplada a proteína A. De la columna se obtienen dos picos, el primero corresponde a las fracciones del suero que no se unen a la proteína A (Albumina, α -1, α -2, y B macroglobulinas) y el segundo corresponde a la fracción gamma del suero que se une a la proteína A (Fig. 5). Se obtienen 10 mg de inmunoglobulinas totales de 5 ml de antisuero o suero preimmune.

2. COMPROBACION DE LA ESPECIFICIDAD DE ANTISUEROS

A las inmunoglobulinas purificadas se les prueba su reactividad con el antígeno contra el cual están dirigidas por el método de Ouchterloni. El anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo acoplado a isotiocianato de fluoresceína, reconoce hasta una dilución 1:32 del antisuero de conejo anti-gp160 (Fig. 6). La especificidad del antisuero de conejo anti-gp160 se verificó por inmunoprecipitado (Fig. 7). Precipita una banda de 160 Kd.

3. ACOPLAMIENTO DE IgG de CABRA ANTI-IgG DE CONEJO A ISOTIOCIANATO DE FLUORESCINA

El conjugado se purificó por filtración en una columna de Sephadex G-50 (60 x .9 cm) de la cual se obtienen dos picos; el primero

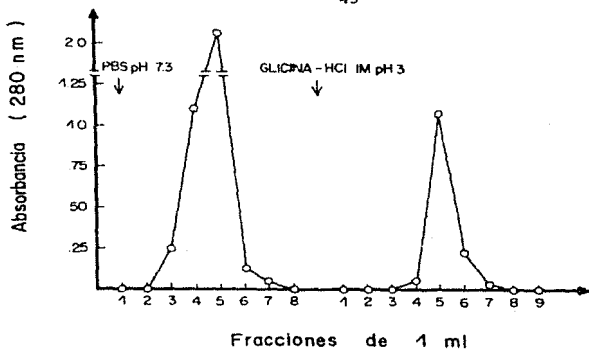


Fig. 5. Perfil de elución de la cromatografía de afinidad - en Sepharosa 4B-proteína A, para la purificación de un suero hiperinmune de conejo anti-gpl60.

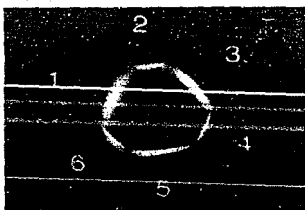


Fig. 6. Determinación de la reactividad del anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo por inmunodifusión. Pozo central: dilución 1:5 del anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo. Pozo 1 al 3, diluciones 1:8, 1:16 y 1:32 de las Ig's de conejo anti-gpl60; pozos 4 al 6, de las inmunoglobulinas "preinmunes" de conejo, a las mismas diluciones que las Ig's - inmunes.

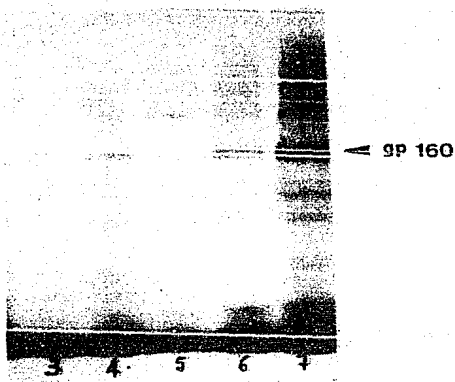


Fig. 7. Comprobación de la reactividad de las inmunoglobulinas de conejo anti-gp160 y del antisuero de ratón (BALB.b) anti-LPC-1 por inmunoprecipitación. (Autorradiografía). Carril 7, extracto total de las células LPC-1. Carriles 5 y 6, inmunoprecipitados con las inmunoglobulinas de conejo anti-gp160. Carriles 3 y 4, inmunoprecipitados con el antisuero de ratón anti-LPC-1. Ambos antisueros precipitan una banda de 160 kd.

corresponde al fluorocromo que no reaccionó (Fig. 8). La concentración del anticuerpo después de la conjugación fue de 1.76 mg/ml y se acoplaron 2.17 moles de fluorocromo a cada mol de inmunoglobulina.

4. PURIFICACION DE LA GLICOPROTEINA TUMORAL gpl60

Se obtuvieron 197 μ g de la glicoproteína tumoral gpl60 (0.4%) a partir de 777.3 μ g de membranas plasmáticas equivalentes a 1×10^9 células tumorales LPC-1 tardías (Tabla I).

Para comprobar la pureza de gpl60 obtenida a partir del inmuno adsorbente Sepharosa 6B-WGA (Fig. 9), se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 10%. El gel al ser teñido con azul de Coomassie o con plata, no presenta ninguna banda proteica. Sin embargo, al teñirse con reactivo de Schiff aparece una banda proteica de alto peso molecular, 160 000 daltones (Fig. 10 carril 2), por lo que se obtiene la proteína gpl60 con un alto grado de pureza.

5. IDENTIFICACION DE LA GLICOPROTEINA TUMORAL gpl60 EN DIFERENTES MIOLOMAS MURINOS (H-2^d)

5.1 Expresión de gpl60 en Mielomas de Ratón

Para determinar si otros mielomas de ratón (H-2^d) expresan en su superficie una molécula semejante a gpl60 se analizaron los componentes radioiodinados de la superficie celular por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Es evidente que las células de mieloma OPEC-315, MOPC-167 y PC.3 expresan una molécula de peso aproximado de 160 000 daltones que migra de manera idéntica a la gpl60 de las células

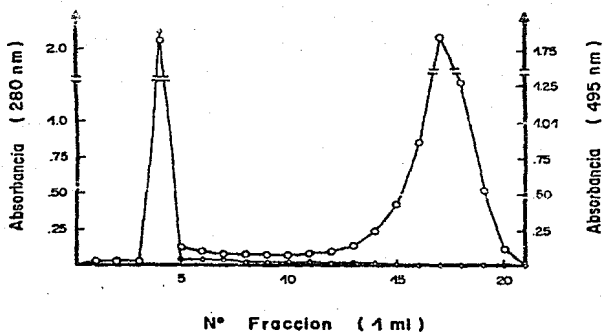


Fig. 8. Purificación del conjugado (anticuerpo de cabra -- anti-IgG de conejo acoplado a isotiocianato de -- fluoresceína) por filtración en una columna de -- Sephadex G50. ○ - Absorbancia 495 nm (fluorocromo), ◆ - absorbancia 280 nm (proteína).

TABLA I. RENDIMIENTO DE LA PURIFICACIÓN DE LA GLICOPROTEINA TUMORAL gp160 A PARTIR DE CELULAS LPC-1 TARDIAS.

Purificación de gp160	ug totales (1×10^9 EqCè)	%
Células rotas	47 000 \pm 00	100
Membranas plasmáticas	777.3 \pm 0.07	1.65
Glicoproteína tumoral	187.4 \pm 69	0.4

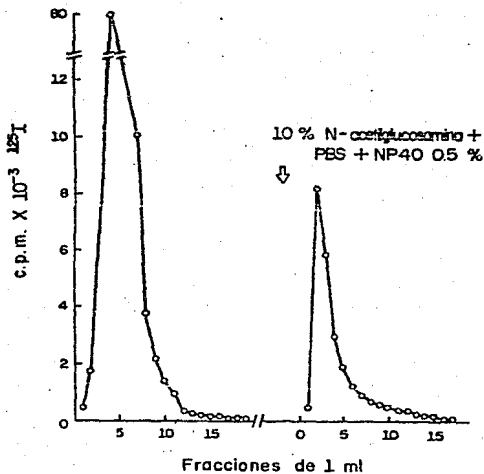


Fig. 9. Perfil de elución de la cromatografía de afinidad en Sepharosa 6B-WGA para la purificación de gpl60 a partir de membranas plasmáticas de células LPC-1 tardías, solubilizadas con Doc-Na 0.5%.

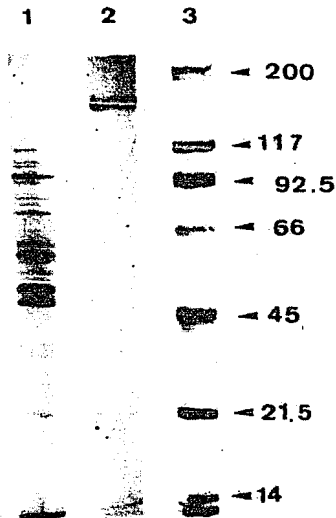


Fig. 10. Comprobación de la pureza de gp160 por medio de electroforesis en gels de poliacrilamida-SDS al 10%. Carril 1, membranas plasmáticas de células LPC-1 tardías solubilizadas con Doc-Na 0.5% (tinción de Coomassie). Carril 2, glicoproteína tumoral -- gp160 purificada por cromatografía de afinidad en Sepharosa 6B-WGA (Tinción de Schiff). Carril 3, marcadores de peso molecular (lisosima 14 000 d, inhibidor de tripsina 21 500 d, ovalbúmina 45 000 d, seroalbúmina bovina 66 000 d, fosforilasa B 92 000 d, β -galactosidasa 117 000 d, miosina 200 000 d).

lulas LPC-1 (Fig. 11).

El mieloma X-63 Ag.8 (H-2^d) y el mastocitoma P815 (H-2^d) no expresan alguna proteína semejante a gp160 (Fig. 12).

5.2 Inmunoprecipitación de gp160 de los Diferentes Mielomas con Antisuero Anti-LPC-1

Para determinar si la glicoproteína de 160 000 daltones presente en los tumores MOPC-167, MOPC-460 y PC.3 era antigénicamente idéntica a la glicoproteína de 160 000 daltones de las células LPC-1, se realizaron inmunoprecipitados con antisuero BALB.6 anti-LPC-1 (anti-gp160) de los componentes radioiodinados de la superficie celular de estos mielomas.

La Fig. 13 muestra que el antisuero anti-LPC-1 inmunoprecipita a gp160 junto con los antígenos H-2D y H-2K de las células LPC-1 y MOPC-460, no siendo así en las células p815 (mastocitoma H-2^d) en las que solo se identifican los Ags H-2^d.

Asimismo la Fig. 13 muestra que el antisuero anti-LPC-1 precipita también gp160 del extracto radioiodinado de las células PC.3 y MOPC-167.

6. IDENTIFICACION DE LA GLICOPROTEINA TUMORAL gp160 EN POBLACIONES CELULARES EMBRIONARIAS Y ADULTAS

Las células LPC-1 (gp160⁺) cuando se ensayan por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos anti-gp160 presentan un 80% de fluorescencia, en tanto que las células X63 Ag8 presentan un 5% de fluorescencia (Fig. 14 y Fig. 15). Cuando ambos tipos celulares se incuban con inmunoglobulinas normales de conejo, como primer anticuerpo, sólo fluoresce el -

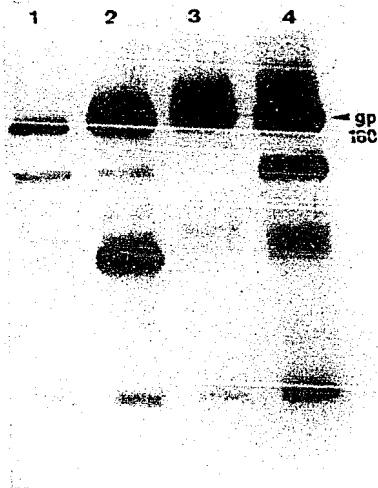


Fig. 11. Patrón electroforético de -- las células tumorales LPC-1 (1), MOPC-167 (2), PC-3 (3) y MOPC-460 (4). Las células se marcaron con ^{125}I , se solubizaron con NF-40 0.5% y se sometieron a electroforé- sis en geles de poliacrilami- da-SDS-10%. (Autorradiogra- fía).

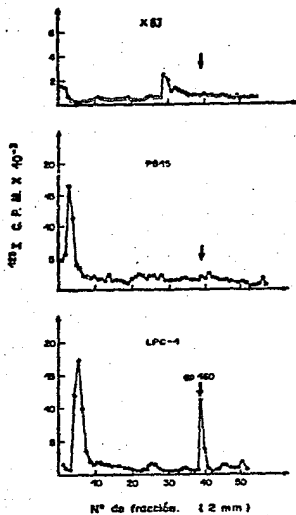


Fig. 12. Electroforesis en gels de poliacrilamida -SDS- de los componentes radioidi-
nados de la superficie de las células
X-63 (A), P815 (B) y LPC-1 tardías (C).

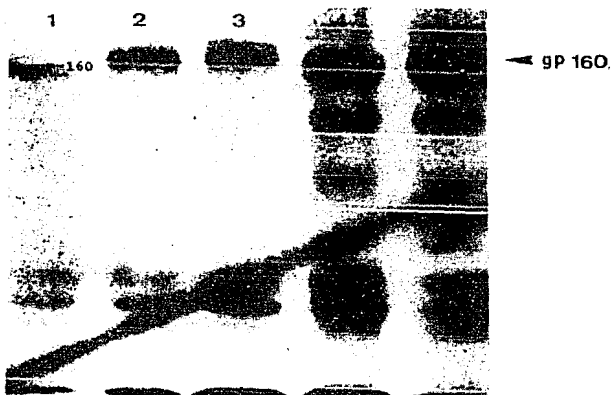


Fig. 13. Autorradiografía del gel de poli--acrilamida-SDS de los componentes radioiodinados de la superficie de las células tumorales inmunoprecipitados con el antisuero de ratón BALB.b anti-LPC-1. Carril 1 P815, Carril 2, MOPC-460, Carril 3, --- MOPC-167, Carril 4, LPC-1, Carril 5, PC.3.

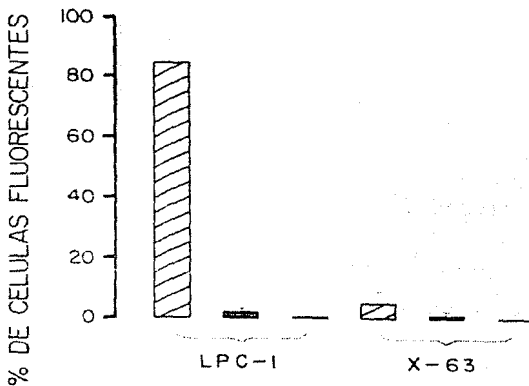





Fig. 14. Porcentaje de células teñidas por las inmunoglobulinas anti-gp160 cuando se ensayan por inmunofluorescencia indirecta. Células incubadas con inmunoglobulinas anti-gp160 (ler. anticuerpo) , células incubadas con inmunoglobulinas normales (ler. anticuerpo) , y células sin primer anticuerpo . Todas las células se incubaron con el anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo como segundo anticuerpo. Los valores representan la medida de los triplicados de cada experimento \pm desviación estándar.

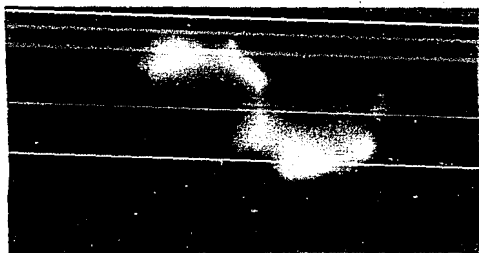


Fig. 15. Células LPC-1 tardías teñidas por inmunofluorescencia indirecta con inmunoglobulinas de conejo anti-gp160. Nótese la fluorescencia en la superficie celular.

2% de las células. Cuando se omite el primer anticuerpo fluoresce el 1% de las células. Por todo lo anterior las células LPC-1 y X63. Ag8 se emplearon como controles positivo y negativo, respectivamente, en cada ensayo de inmunofluorescencia con células del sistema inmune.

Para determinar la presencia de gp160 en células del sistema inmune, se crecieron in vitro células de bazo y timo y se obtuvieron células de la médula ósea de diferentes cepas de ratón (DALB/c, BALB.b, BALB.k y C57BL/6).

Las células de bazo y timo de tres días de cultivo así como las células de la médula ósea se ensayaron por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-gp160.

a) Células de bazo. Cuando las células de bazo estimuladas con LPS (linfocitos B) se ensayaron con anticuerpos anti-gp160 presentan un porcentaje significativo de fluorescencia ($P \ll .001$), siendo 58, 52% y 48% para las células de las cepas BALB/c, BALB.k y C57BL/6, respectivamente. En cambio resulta interesante notar que solamente un 13% de las células de la cepa BALB.b fluorescen ($P > .001$) (Tabla II, Fig. 16 y Fig. 17). Las células de bazo estudiadas con Con-A (linfocitos T) no presentan tinción positiva significativa ($P \gg .001$) con el anticuerpo anti-gp160, en ninguna de las cepas. (Tabla II y Fig. 16). Lo mismo ocurre cuando las células se crecen en ausencia de mitógenos y se observó que presentan niveles de fluorescencia muy semejantes a los controles (Tabla II y Fig. 16).

Tabla II. Presencia de gp160 en células de bazo de ratón de diferentes cepas. Las células se crecieron in vitro en presencia de LPS, con A o sin mitógenos (RPMI).

CEPA	HAPLO TIPO	Ac $\bar{\alpha}$ gp160	γ NC ^a	2° Ac ^b	% DE CELULAS FLUORESCENTES		
					RPMI	CON-A	LPS
BALB/c	H-2 ^d	+	-	+	7.3	10.0	58.0
		-	+	+	<2.5	<2.5	<2.5
		-	-	+	<2.5	<2.5	<2.5
BALB.b	H-2 ^b	+	-	+	3.6	3.0	13.2
		-	+	+	<2.5	<2.5	<2.5
		-	-	+	<2.5	<2.5	<2.5
BALB.k	H-2 ^k	+	-	+	8.2	10.0	52.0
		-	+	+	<2.5	<2.5	<2.5
		-	-	+	<2.5	<2.5	<2.5
C57BL/6	H-2 ^b	+	-	+	7.0	9.5	47.6
		-	+	+	<2.5	<2.5	<2.5
		-	-	+	<2.5	<2.5	<2.5

- (a) Inmunoglobulinas normales de ratón
 (b) Anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo

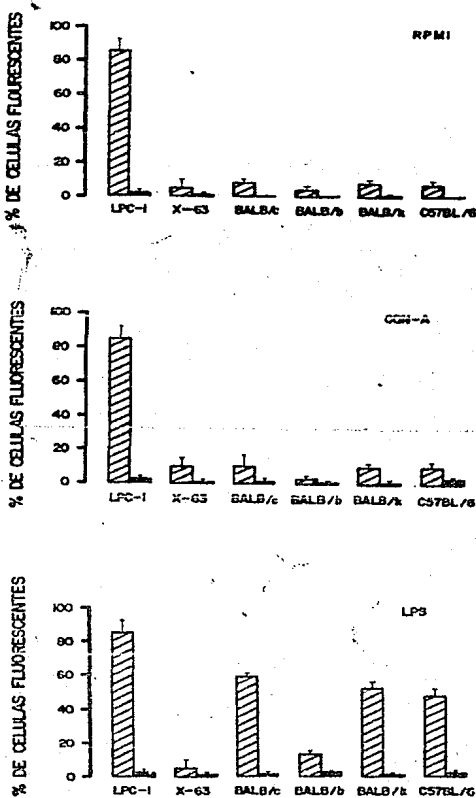




Fig. 16. Presencia de gp160 en células de bazo de ratón. Las células de bazo de las diferentes cepas se cultivaron 3 días en presencia de LPS, Con-A o sin mitógeno (RPMI). Al cabo del tiempo las células se ensayaron por inmunofluorescencia indirecta. Inmunoglobulinas de conejo anti-gp160. , Inmunoglobulinas normales de conejo . En todos los casos se usó como segundo anticuerpo, el anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo.

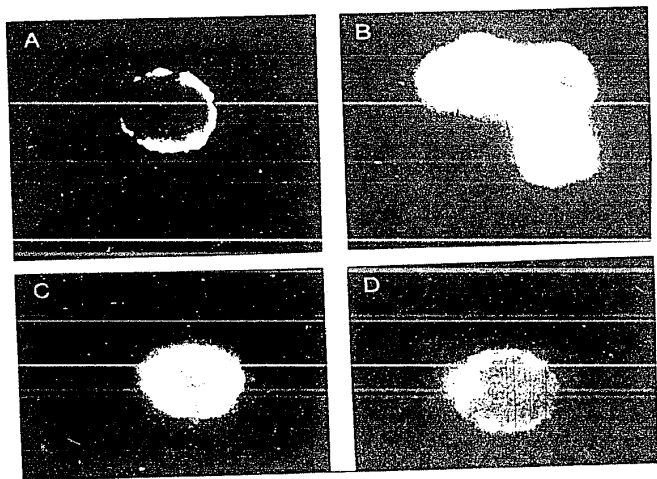


Fig. 17. Células de bazo de ratón creadas in vitro y estimuladas con LPS durante 3 días teñidas por inmunofluorescencia indirecta con -- las inmunoglobulinas de conejo anti-gp160.
 A y C - células de cepa FMR/c
 B - células de la cepa C57BL/c
 D - células de la cepa BALB.K

b) Células de Timo: Las células de timo de las diferentes cepas crecidas in vitro, en presencia o ausencia de mitógenos (LPS o Con-A) no presentan un porcentaje significativo de fluorescencia ($p \gg .001$) -- cuando se ensayan con anticuerpos anti-gp160, siendo 2.5% en todos los casos.

c) Células de Médula Ósea. Las células de la médula ósea (Prelinfocitos B y T) fluorescen significativamente ($p < .001$) al ser recubiertas con el anticuerpo anti-gp160. El porcentaje de células positivas es 42% para BALB/c, 27% para BALB.b, 43% para BALB.k, 43% para --- C57BL/6 (Tabla III, Fig. 18 y Fig. 19).

1. Presencia de gp160 en Tejidos Embrionarios y Adultos

Se llevó a cabo inmunofluorescencia indirecta sobre cortes -- por congelación de tejido adulto y embrionario de ratón, con las inmunoglobulinas anti-gp160.

En las secciones de embriones de 17 días de gestación, las inmunoglobulinas anti-gp160 reaccionan con células epiteliales independientemente de su origen germinal, es decir, reacciona con células epidérmicas (Fig. 20), del iris (ectodermo), epitelio de intestino (Fig. 21), epitelio de bronquios y tráquea (Fig. 22) además de reaccionar con las células epiteliales del hígado (Fig. 23) (Endodermo). El tejido conectivo -- embrionario (hueso y cartílago) presenta una tinción positiva (Fig. 24) - (Mesodermo).

En los cortes de hígado de ratón adulto se observó una reacción débil pero claramente positiva en la superficie de las células parenquimatosas y una reacción fuerte en el epitelio. En cerebro tanto embrionario como adulto no se observó reacción positiva.

Tabla III. Presencia de gp160 en células de la médula ósea de ratón de diferentes cepas.

CEPA	HAPLO TIPO	Ac $\bar{\alpha}$ gp160	γ NC ^a	b Ac ^b	% células fluorescentes
BALB/c	H-2 ^d	+	-	+	42.5
		-	+	+	<2.5
		-	-	+	<2.5
BALB. b	H-2 ^b	+	-	+	27.7
		-	+	+	<2.5
		-	-	+	<2.5
BALB. k	H-2 ^k	+	-	+	43.4
		-	+	+	<2.5
		-	-	+	<2.5
C57BL/6	H-2 ^b	+	-	+	43.3
		-	+	+	<2.5
		-	-	+	<2.5

- (a) Inmunoglobulinas normales de conejo
 (b) Anticuerpo de cabra anti IgG de conejo

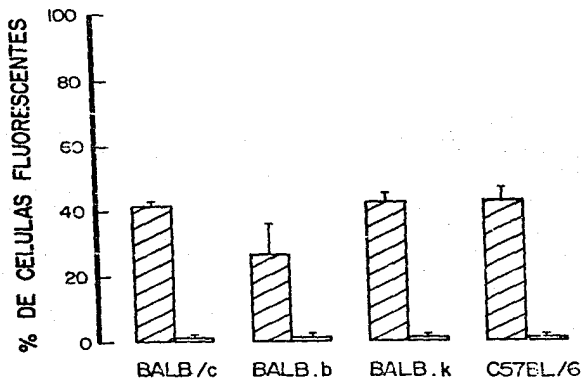


Fig. 18. Porcentaje de fluorescencia presente en células de médula ósea de ratón. Las células de la médula ósea se ensayaron por inmunofluorescencia indirecta con las inmunoglobulinas de conejo anti-gp160 (hachado) y con las inmunoglobulinas normales de conejo (negro). Y se empleó como segundo anticuerpo el anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo.

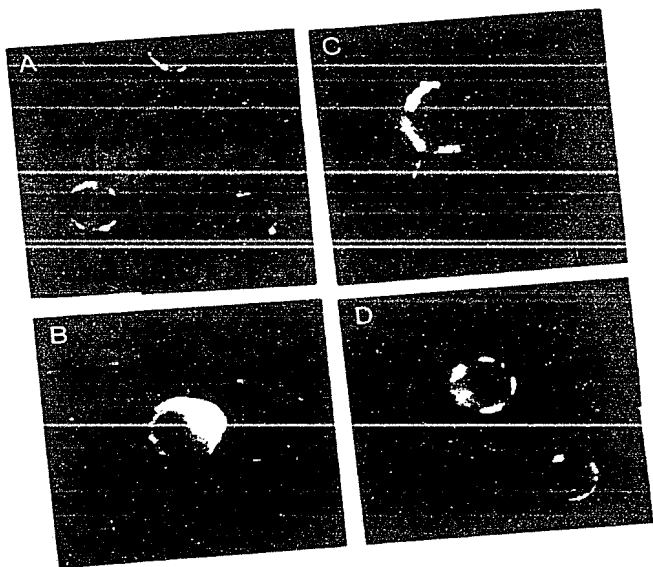


Fig. 19. Células de médula ósea de diferentes cepas de ratón, teñidas por inmunofluorescencia con las inmunoglobulinas de conejo anti-gp160.
A) Células de la cepa BALB/c
B) Células de la cepa BALB.K
C) Células de la cepa BALB.b
D) Células de la cepa C57BL/6

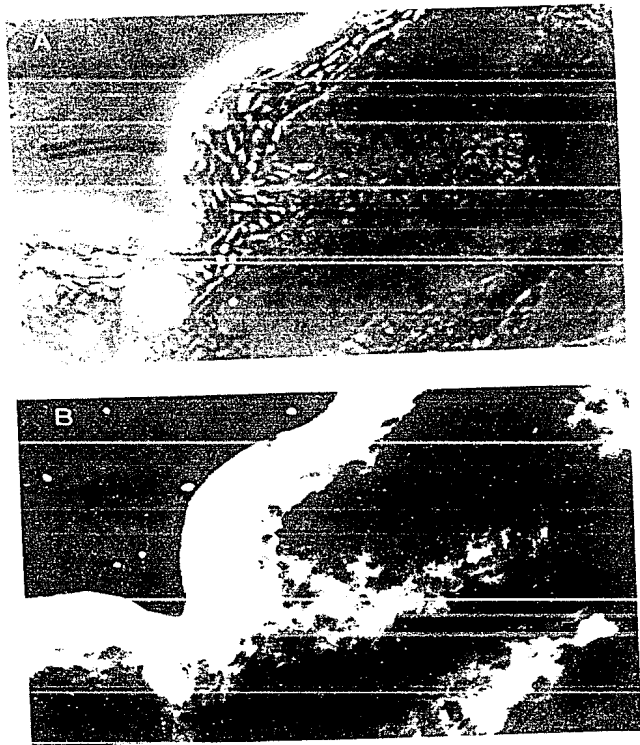


Fig. 20. Inmunofluorescencia indirecta sobre cortes histológicos de embrión de ratón (BALB/c) de 17 días de --gestación con las IgGs anti-gp160 (Ver sec. I.2)

A) Epidermis - campo claro

B) Epidermis - iluminación con luz ultravioleta, - en la cual se observa la tinción positiva solamente en las células epidérmicas.

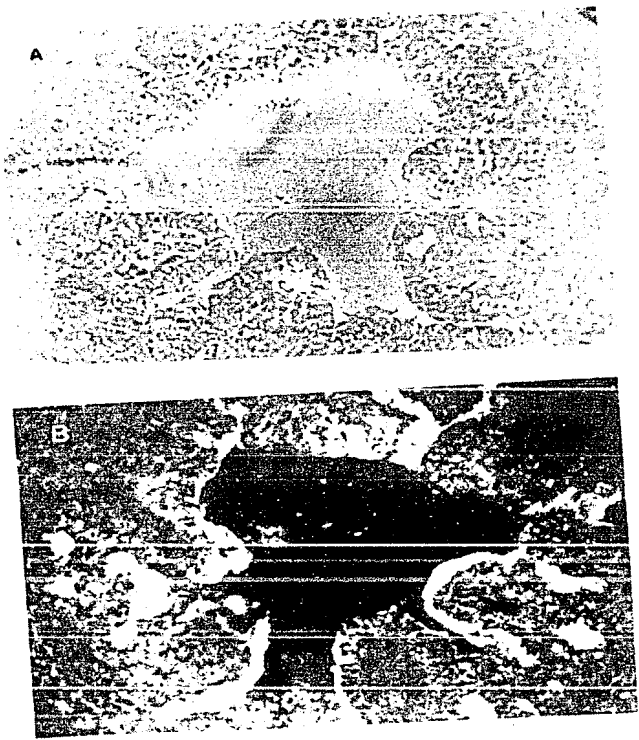


Fig. 21. Intestino delgado embrionario, teñido por inmunofluorescencia indirecta con las inmunoglobulinas anti-gp260.
A) Campo claro
B) Microscopía de fluorescencia. La reacción se -- localiza únicamente en las células epiteliales.

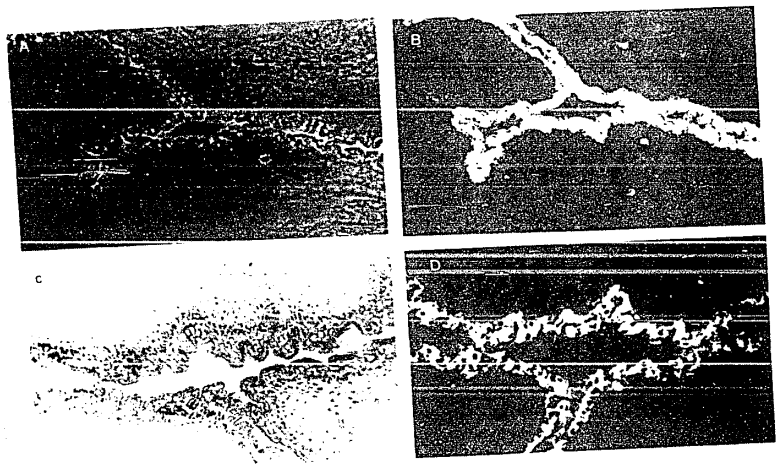


Fig. 22. Las células epiteliales de los brotes embrionarios presentan una reacción positiva con las inmunoglobulinas de conejo anti-gp160. Cuando se ensaya por inmunofluorescencia indirecta.

- A) Campo claro
- B) Iluminación con Luz U.V.
- C) Campo claro de un corte seriado y teñido con H-E
- D) Iluminación con Luz U.V.

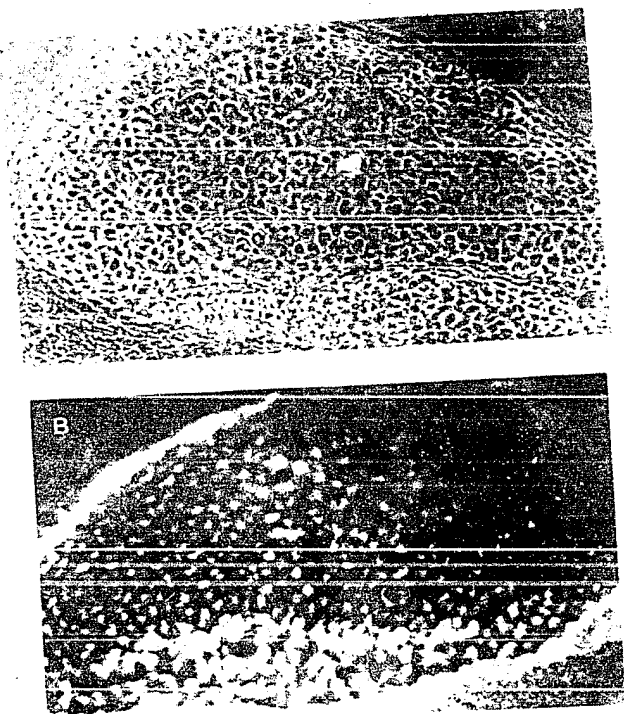


Fig. 23. Las células de hígado embrionario se tiñen positivamente con las inmunoglobulinas anti-gp160.
A) Campo claro
B) Iluminación con luz U.V. Nótese que además de -- las células epiteliales, también algunas células parenquimatosas presentan fluorescencia.

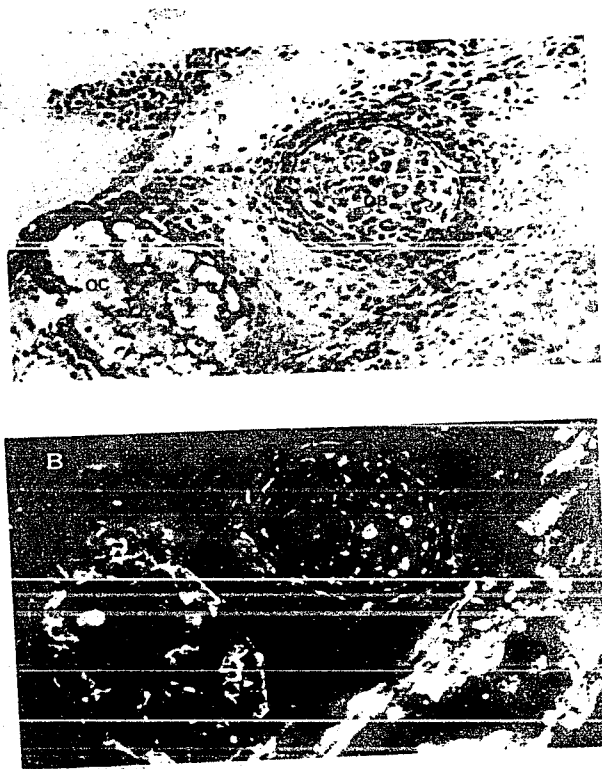


Fig. 24. Los núcleos germinales de hueso y cartílago embrionario exhiben fluorescencia positiva cuando se ensayan con las inmunoglobulinas de conejo anti-gp160.
A) Campo claro. Oc-Osteocitos, OB osteoblastos.
B) El mismo campo pero iluminado con luz U.V.

V. DISCUSION

En años recientes la producción de anticuerpos monoclonales - contra antígenos de superficie celular se ha considerado una de las técnicas más ventajosas para el estudio de dichos antígenos (56,90). A pesar de la gran cantidad de tiempo y esfuerzo empleado, el número de moléculas interesantes descubiertas por esta metodología es frustrantemente pequeño.

En el trabajo presentado aquí, se uso un método diferente, más directo, en el cual se produjeron anticuerpos policlonales contra la glicoproteína tumoral gp160, purificada por columnas de afinidad.

Las posibles ventajas de este método son: 1) el proceso de selección, se realiza antes de la producción de anticuerpos, eliminando así anticuerpos contra antígenos de naturaleza no proteica; 2) la producción de anticuerpos policlonales disminuye las dificultades típicas de la caracterización inmunquímica de los anticuerpos monoclonales causadas por las uniones inespecíficas de estos últimos.

El anticuerpo anti gp160 precipita una banda de 160 Kd del extracto de las células LPC-1, por lo que nuestro anticuerpo es específico.

Por otro lado la glicoproteína gp160 se marca fuertemente después de la iodinación de célula LPC-1, de la misma manera aparece una banda de 160 kd cuando se marcan (¹²⁵I) células de los mielomas OPEC-315, MOPC-167 y PC.3 en las autorradiografías de los geles correspondientes.

Cuando se realizan inmunoprecipitados con las inmunoglobulinas

de los ratones BALB.b inmunizados con células LPC-1, las inmunoglobulinas precipitan una proteína de 160 kd de los extractos de las células MOPC-167, MOPC-460 y PC.3. Por lo que esta glicoproteína es inmunológicamente semejante a la presente en las células LPC-1. Los mielomas MOPC-167, MOPC-490 y PC.3 al igual que el mieloma LPC-1 son resistentes a la lisis por anticuerpos anti-H-2^d y complemento (21). Se han reportado otras glicoproteínas que están asociadas a la resistencia inmune, por ejemplo el mieloma de BALB/c reportado por un grupo japonés (88), que también presenta en su superficie una glicoproteína de peso molecular de 120-160 kd; el adenocarcinoma mamario de ratón llamado TA-3Ha, el cual expresa en su superficie una glicoproteína de alto peso molecular (500 kd) (75) llamada epiglicanina, - el cual puede crecer en ratones alogénicos y en ratas. TA-3Ha es una variante del tumor TA-3St, el cual no expresa la epiglicanina y sólo puede transplantarse en la cepa en la que se originó (A/HeHa).

Estas glicoproteínas enmascaran efectivamente antígenos de histocompatibilidad y como resultado el tumor no es rechazado por linfocitos T citotóxicos. Por otro lado, hay evidencias que sugieren que al incrementar la cantidad de ácido siálico en las glicoproteínas de superficie aumenta la resistencia de las células tumorales al ataque por células asesinas naturales (94).

La gran cantidad de gpl60 en las células LPC-1 (1.5×10^6 moléculas/célula) y el alto contenido de ácido siálico de esta proteína (25-40 residuos por moléculas de gpl60) (78) proporcionan un mecanismo efectivo de evasión a la respuesta inmune por parte de las células LPC-1.

Los resultados de inmunofluorescencia indican que gpl60 no sólo está presente en las células LPC-1 sino que también se encuentra en --

células de bazo de los ratones de las cepas BALB/c, BALB.k y C57BL/6 estimuladas con LPS (células plasmáticas), cosa que no ocurre en las células de la cepa BALB.b. Las células de la médula ósea de las cuatro cepas presenta fluorescencia significativamente con respecto a los controles --- ($p < .001$). Aunque hay que hacer notar que hay una dispersión alta en los resultados de la cepa BALB.b ($27 \pm 9\%$).

Los resultados de las células de bazo (células plasmáticas) y de las células de la médula ósea de los ratones de la cepa BALB.b concuerdan con el hecho de que los ratones de esta cepa son los únicos que producen anticuerpos anti-gp160 cuando se inmunizan con células LPC-1, dado -- que si gp160 no está presente en las células de estos ratones, la reconocen como extraña y producen anticuerpos contra ella.

Está bien establecido que las moléculas de la superficie celular están asociadas a la aparición de fenotipos particulares durante el desarrollo, diferenciación y estados neoplásicos (17). Los linfocitos B presentan un grupo único de moléculas de superficie [Lyb-2, Lyb-3, Lyb-4, Lyb-5, Lyb-6, Lyb-7, Pc-1, Pc-2 y Ly-17, (45)] y que algunas de estas moléculas sólo se encuentran en las células B en algunas etapas de diferenciación (Pc-1 y Pc-3) y algunos antígenos de las células B también se expresan en células de la médula ósea (Lyb-2). gp160 es una molécula ausente en linfocitos B no estimulados y presente en blastos de células B, en tanto que en células T como en blastos derivados de ellas gp160 está ausente. Por todo lo anterior, gp160 parece ser una glicoproteína exclusiva de los linfocitos B que aparece en un estado determinado de diferenciación, pero hacen falta estudios para determinar el papel que juega esta proteína en --

las superficies de las células plasmáticas, ya que otros antígenos que se expresan durante la activación de linfocitos se han identificado como receptores para nutrientes que se requieren para crecer y expandirse rápidamente (por ejemplo, receptor de la transferrina (72) o como receptores -- para hormonas polipeptídicas tales como Interleucina 2 que se requiere -- para mantener la expansión clonal de las células T (85).

El más próspero de todos los aloinjertos naturales es el em--
brión de los mamíferos: el desarrollo embrionario de los mamíferos re--
quiere de un mecanismo para evitar que el feto sea rechazado por la madre
(4). Las células embrionarias y fetales contienen antígenos de transplan--
te contra los cuales la madre monta una respuesta inmune (80). Las célu--
las del trofoblasto de los mamíferos resisten a la respuesta inmune del -
hospedero (83). Todas las células cancerosas sin importar el tejido de -
procedencia comparten estas propiedades con las células del trofoblasto -
(33). Estas observaciones concuerdan con el descubrimiento de que célu--
las tumorales reexpresan antígenos que se expresaron en un estado temprano
de diferenciación y que se suprimen conforme avanza el estado de dife--
renciación. Ejemplos típicos pueden ser el antígeno carcinoembrionario -
(77) la α -fetoproteína (1) y algunas enzimas fetales tales como la fosfa--
tasa alcalina de la placenta. Todos estos hallazgos concuerdan con el --
hecho de que las células tumorales parecen encontrarse en un estado menos
diferenciado comparado con el tejido que les dió origen, y presentar una
morfología similar a la del tejido fetal. En base a estos hechos se ha -
propuesto que las células tumorales y las células embrionarias comparten
ciertos mecanismos de evasión de la respuesta inmune como por ejemplo li-

beración de antígenos de histocompatibilidad. Por el hecho de que gp160 se encuentre en las células embrionarias epiteliales de tubo digestivo, bronquios, piel e hígado se antoja pensar que posiblemente gp160 esté -- interactuando con los antígenos de histocompatibilidad del embrión, de la misma manera que ocurre en las células tumorales LPC-1, evadiendo así la respuesta inmune de la madre.

Otro hecho importante es que gp160 se expresa en células parenquimatosas de hígado embrionario y adulto. Recientemente se han descrito glicoproteínas relacionadas en la adhesión celular del hígado; en pollos (L-CAM) (29,36) en ratas (C-CAM) y en ratón (gp123) (90) y además que anticuerpos contra estas glicoproteínas reaccionan con tejido embrionario, principalmente epitelios. Con base en lo anterior se podría especular que posiblemente gp160 esté relacionada en procesos de compactación o reconocimiento celular tanto en tejidos adultos como en tejidos embrionarios.

La presencia de antígenos comunes en células embrionarias y tumorales, y los mecanismos por los cuales ambos tipos celulares evaden la respuesta inmune apenas comienzan a ser entendidos. Se trata de un problema multidisciplinario y se espera que el entendimiento de estos mecanismos proveerá una herramienta para evitar el escape de las células tumorales: objetivo de la inmunoterapia.

Alcáncese o no este objetivo, el reto está presente: investigar y entender los diferentes mecanismos de escape inmunológico.

Por todo lo expuesto en este trabajo se abren nuevos enfoques sobre el mismo tema: --¿Cuál es el papel de gp160 en las células del sig

tema inmune? ¿Es un receptor importante en la superficie de las células plasmáticas.

--¿Es posible que gp160 este interaccionando con antígenos de histocompatibilidad en el embrión? ¿Es ésta la forma en que el embrión evade la respuesta inmune de la madre?

--¿Qué papel juega gp160 en los procesos de compactación o reconocimiento celular de las células embrionarias y adultas?

VI. CONCLUSIONES

1. gp160 es un antígeno presente en diferentes mielomas H-2^d, lo cual favorece la evasión de la respuesta inmune y el crecimiento del tumor.
2. gp160 es un antígeno presente en células plasmáticas, aunque su papel aún no ha sido determinado.
3. gp160 se encuentra presente en células epiteliales embrionarias.
4. Ya que gp160 parece expresarse tanto en células tumorales como en células adultas normales y en células embrionarias, resulta difícil su clasificación, ya sea como un antígeno oncofetal, de diferenciación, o tumoral.

VII. REFERENCIAS

1. Abelev, G.I. (1971) Alpha fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors. *Adv. Cancer Res.* 14: 295.
2. Adams, D.O. and Marino, P.A. (1981) Evidence for a multistep mechanism of cytolysis by BCG activate macrophages. The interrelationship between the capacity for cytolysis, target binding and secretion of cytolytic factor. *J. Immunol.* 126: 981.
3. Alden, W., Tarigudin, T. and Smith, P.T. (1971) Phytohemagglutinin irresponsiveness in mouse tethylcholanthrene sarcoma. *Cancer Res.* 31: 864.
4. Alexander, P. (1974) Escape from immune destruction by the host through shedding of surface antigens: Is this a characteristic sagred by malignant and embryonic cells.
5. Arends, W.J., Bosman, T.F. and Hielgers, J. (1985) Tissues antigen in large-bowel carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta.* 78: 1.
6. Awden, Z.L., Williamson, A.R., and Askonos, A.B. (1968) Isoelectric focusing poliacrylamide gel out its application to immunoglobulins. *Nature* 219: 66.
7. Benacerraf, B. and Unanue, E.R. (1979) Tumor immunity. *Textbook of Immunology.* Benacerraf, B., Unanue, E.R. and Williams (Eds.) Baltimore, Lond. p. 196.
8. Ben-ze'ev, A. (1985) The cytoskeleton in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 780: 197.

9. Berendt, M.J. y R.J. North (1980) T cell mediated suppression of anti-tumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. *J. Exp. Med.* 151: 69.
10. Bernard, A., L. Boomsell, T. Borsos, R.A. Good and N.K. Day (1975) Complement inhibitors released by leukocytes. III. Evidence a "New" Clq inhibitor in tite supernatants of short term cultures of mouse spleen thymus cells. *J. Immunol.* 115: 109.
11. Bloom, E.T. and W.H. Hildemann (1970) Mechanisms of tumor specific enhancement versus resistance toward a methylcolanthrene induced murine sarcoma. *Transplantation* 10: 321.
12. Bosman, H.B. (1972a) Elevated glycosidases and proteolytic enzymes in cells transformed by RNA tumor virus. *Biochim. Biophys. Acta*: 264: 339.
13. Boyse, E.A., L.H. Old, and T. Stockert. (1965) The T1 (Thymus leukemia) antigen: A review. *En Immunopathology*. 4th. International Symposium Grabar and Miescher P.A. Schwabe & Co., Basel.
14. Brag, R.R., Genshwin, E.M., Ahmed, A. and Castles, J.J. (1985) Tissue localization and biochemical characteristics of a new thymic antigen recognized by a monoclonal thymocytotoxic auto antibody from New Zealand Black Mice. *J. Immunol.* 134: 4001.
15. Burnet, F.M. (1970) The concept of immunology cell sorveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* 13: 1.
16. Burnet, F.M. (1971) Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant. Rev.* 7: 3.
17. Carlin, R.C. and B.B. Knowles (1983) Identification of a 90 000 dalton cell surface glycoprotein with elevated expression in human hepatoma cells. *Exp. Cell Res.* 147: 359.

18. Celis, E., A.H. Hale, J.H. Russell and H.N. Eisen (1979a) Cyclical changes in susceptibility of a myeloma tumor (LPC-1) to immune destruction. I: Changes in reactivity with cytotoxic T lymphocytes and anti-H-2^d sera. J. Immunol. 122: 954.
19. Celis, E., T.W. Chang y H.N. Eisen (1979) Cyclical changes in susceptibility of a mieloma tumor (LPC-1) to immune destruction III. Periodic production of a cell surface glycoprotein and changes in reactivity with citotoxic T cells and anti-H-2^d sera. J. Immunol. 122: 2268.
20. Celis, E. y H.N. Eisen (1980) Interaction between a novel surfaca glycoprotein and the H-2K an H-2D antigen on myeloma tumor cell. Eur. J. Immunol. 10: 455.
21. Celis, F.B. (1983) Resistencia a la lisis immune mediada por anti-cuerpos y complemento en algunos mielomas murinos. Tesis de Maestría, C.C.H.
22. Chism, S.E., S.G. Order, and S. Hellman (1973) Tumor-fetal antigen in Hodgkin's disease: An immunoelectrophoretic analysis. Am. J. Roentgenol. Radium. Therapy. Nucl. Med. 117: 5.
23. Coggin, J.H., K.R. Ambrose, P.J., Dierlam and N.G. Anderson (1974) Proposen mechanism by which autochthonous neoplasms escape immune rejection. Cancer Res. 34: 2092.
24. Coggin, H.F. and Ambrose, R.K. (1979) Embryonic and fetal determinants on virally and chemically induced tumors. En: Methods in Cancer Research. Vol. XVIII William H. Fishan an Harris Bosch. (Ed.) Academic Press. Inc. New York.
25. Coggin, T.A. and N.G. Anderson (1974) Cancer differentiation and embryonic antigens: Some central problems. Adv. Cancer Res. 19: 105.

26. Cullen, S.E. and B.D. Schwartz (1970) An improved method for isolation of H-2 and Ia alloantigens with immunoprecipitation by protein A-bearing staphylococci. *J. Immunol.* 117: 136.
27. Davdsohn, I. and M.D. Nelson (1978) *Sangre. En: Diagnóstico Clínico por el Laboratorio.* Baydsohn, I. Iennry, J.B. (Eds) Salvat. 2a. Ed. p. 103.
28. Dent, P.B. and Hillcoat, B.L. (1972). Interaction of phytohemagglutinins and concanavalin A with transplantable mouse lymphomas of differing malignant potential. *J. Natl. Cancer. Inst.* 49: 373.
29. Edelman, G. M., W.J. Gallin, A. Delowen, B.A. Cunningham and J.P. Thiery (1983) Early epochal maps of two different cell adhesion molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4384.
30. Esmon, N.C. and J.R. Little (1970) Different mechanism for the modulation of T1 antigens on murine lymphoid cell. *J. Immunol.* 117: 919.
31. Fairbanks, G., L.T. Steck, D.F. Wallach (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry.* 10: 2606.
32. Feber, E. (1984) Precancerous steps in carcinogenesis their physiological adaptative nature. *Biochim. Biophys. Acta* 738: 171.
33. Fokman, J. (1979) Tumor angiogenesis factor. *Cancer Res.* 34: 2109.
34. Forni, L. (1979) Reagents of immunofluorescence and their use for studying lymphoid cell products. En: *Immunological Methods.* Lefkovits, J. and B. Pernis (Eds.) Academic Press. New York, p 151.

35. Fridberg, S. (1972) Comparason of an immunosubceptible ascites subline from murine tumor Tg-3. Transplantability, Morphology and some phisiochemical characteristics. J. Natl. Cancer Inst. 48: 1463.
36. Gallin, J.W., M.G. Edelman and A.B. Cunningham (1983) Characteri- zation of L-cam a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1038.
37. Golub, S.H. (1975) Host immune response to human tumor antigens. En: Cancer. Vol. IV. Becker F.F. (Ed.) Plenum Press, New York.
38. Hakkien, L.P. (1972) Immunological relationships of the carcino- embryonic antigen and fetal sulphoglicoprotein antigen. Immunoche- mistry. 9: 1115.
39. Hale, A., E. Celis, J.H. Russell and H.N. Eisen (1979) Cyclical changes in susceptibility of a myeloma tumor (LPC-1) to immune destruction. II. Periodic fluctuation durin growth in normal and node mice in culture. J. Immunol. 122: 959.
40. Hanna, N. (1985) The role of natural killer cells in the control of Tumor growth and metastasis. Biochim. Biophys. Acta Vol. 780: 213-226.
41. Hellström, I., and K.E. Hellström (1909) Studies in cellular- immunity and its serum mediated inhibition in moloney virus induced mouse sarcoma. Int. J. Cancer 4: 587.
42. Henney, C.S. and S. Gillis (1984) Cell mediated citotoxicity. En Fundamental Immunology. Willam, E. Paul, M.D. (Eds.) Raven Press, New York p 669.
43. Hieger, I. (1961) Carcinogenesis la. Ed. Academic Press. London and New York p 138.

44. Hogg, N.M. (1974) A comparison of membrane proteins of normal and transformed cells by lactoperoxidase labeling. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 489.
45. Hongarth, P.M. and McKenzie, C.F. (1984) Lymphocyte antigens. En: Paul, E.W. (Ed.) Raven Press, New York. p 457.
46. Howard, F.F., Lendbetter, A.J., Mehdi, S. Q, and Herzenberg, A.B. (1980) A rapid method for the detection of antibodies to cell surface antigens: a solid phase radioimmunoassay using cell membrane. J. Immunol. Methds. 38: 75.
47. Hubbard, A.L. and Cohn, Z.A. (1976) Specific labels for cell surface. En: Biochemical Analysis of Membranes. Maddy A.H. (Ed.). Chapman and Hall, London. pp 427.
48. Hudson, L., Hay, F.C. (1980) Practical immunology 2a. Ed. Brackwel Scientific Publications pp 117.
49. Irie, R.F., Irie, K., and Morton, L.D. (1976) A membrane antigen common to human cancer an fetal brain tissues. Cancer Res. 36: 3510.
50. Isselbacher, K.J. (1972) Increased uptake of amino acids and 2-deoxy-D-glucose by virus transformed cells in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 585.
51. Jatou, J., Brandt, D.Ch. and Vassali, D. (1979) The isolation and characterization of immunoglobulins, antibodies and their constitutent polypeptide chains. En Immunological Methods. Lefkovits, F. and Pernis, B. (Eds). Academic Press, New York. p. 44.
52. Kirkwood, J.M. and Gershon, R.K. (1974) A role for suppressor T cells in immunological enhancement of tumor growth. Proc. Exp. Tumor. Res. 14: 157.

53. Kein, J. (1973-1974) Immunological surveillance against neoplasia. Harvey lect. 69: 71.
54. Kressler, S.W. (1975) Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein a-antibody adsorbent. Parameters of the interacion of antibody antigen complexes with protein A. J. Immunol. 115: 1617.
55. Laemmli, O.K. (1970) Reage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680.
56. Ledbetter, A.J., Goding, W.J., Tsu, T.T. and Herzenber, A.L. (1979). A new mouse lymphoid alloantigen (Lgp 100) recognized by a monoclonal rat antibody. Immunogenetics 8: 347.
57. Lehninger, L.A. (1975) Biochemistry. Worth Publishers Inc. 2a. Ed. p. 157.
58. Locquin, M. y Longeron, M. (1985) Manual de Microscopía. Labor 2a. Ed. p. 325.
59. Lowry, H. Rosenbrongh, J. Farr, L. and Randall, J. (1951) Protein measurement with polin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 143: 265.
60. Marchalonis, J.J., Cone, R.E. and Sauter, Y. (1971) Enzymatic iodination a probe for accesible surface proteins of normal and neoplastic lymphocytes. Biochem. J. 124: 921.
61. Mark, J.L. (1983) What do oncogen do? Science 223: 673.
62. Manes, C. and Sharmas, O.K. (1973) Hypermethylated ERNA in cleaving rabbit embryos. Nature 244: 283.

63. Manes, C. (1974) Phasing of gene products during development. *Cancer Res.* 34: 2044.
64. Melzer, M.S., Leonard, E.J., Rapp, H.J., Borsos, T. (1971) Tumor-specific antigen solubilized by hypertonic potassium chloride. *J. Natl. Cancer Inst.* 47: 703.
65. Merrill, C.R., Goldman, D., Sedman, H.J. and Everl, M. (1981) Ultrasensitive strain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebro spinal fluid proteins. *Science* 211: 1437..
66. Moscona, A.A. (1971) Embryonic and neoplastic cell surfaces availability of receptor for Concanavalin A and wheat germ agglutinin *Science*, 1971: 905.
67. Palladino, M.A., Old, L.J., and Oettgen, H.F. (1982) In vivo Inhibition of mouse leukemia by cytotoxic T-cell clones and exogenous IL-2 *Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol.* 41: 402.
68. Perlam, P., Perlam, H., and Wigzel, H. (1972) Lymphocyte mediated cytotoxicity in vitro: Induction and inhibition by humoral antibody and nature effector. *Cell. Transpl. Rev.* 13: 91.
69. Peter, J.B. and Tseng-Fun (1984) oncogenes, proto-oncogenes, and cancer. *Diagnostic Medicine.* Vol. 36.
70. Diczchazy, M., Yang, J.O., Blanchard, J.M., Jeantur, P., and Marcu, B.K. (1985) *Cell* 42: 589.
71. Price, M.R. and Baedwin, R.W. (1975) Immunobiology of Chemically Induced Tumors. En: *Cancer*, Vol. IV Becken, F.F. (Ed.) Plenum, Press., New York.

72. Price, M.R., Campbell, G.D., Robins, A.R., Blecher, T.E. and Baldwin, R.W. (1984) Characteristics of the cell surface antigen, p72, Associated with a variety of human tumors and mitogens stimulated T lymphoblast. FEBS 171: 31.
73. Rees, C.R., Price, R.M., Baldwin, W.R. (1979) Oncodevelopmental antigen expression in chemical carcinogenesis. En Methods in Cancer Research. Vol. XVIII. William H. Fishman and Harris Busch (Eds) Academic Press, Inc. New York.
74. Rennert, O.M. (1971) Transfer RNA of embryonic tissues. Cancer Research. 31: 637.
75. Robbins, C.J. and Nicolson G.L. (1975) Surfaces of normal and transformed cells. En: Cancer . Vol. 4 Becker, F.F. (Ed) Plenum Press. New York and London. p. 3.
76. Robbins, S.L. and Contran, R.S. (1979) Phatological loasu of disease. 2a. Ed. Scuander Company U.W. Philadelphia. London. p. 141.
77. Roger, G.T. (1983) Carcinoembryonic antigen and related glyco-protein molecular aspects and specificity. Biochim. Biophys. Acta. 695: 227.
78. Rosenstein, Y., Thelen, M., Sanchez, I. and Celis, E. (1984) Isolation, purification, and characterization of plasmocytoma cell surface glycoprotein involved in the resistance of the tumor cells to immune destruction. JNCI 74: 609.
79. Schalager, S.I., Ohanian, S.H. and Borsos, T. (1978) Correlation between the ability of tumor cells to resist humoral immune attack and their ability to synthesize lipids. J. Immunol. 120: 463.

80. Schlesinger, M. (1964) Serologic studies of embryonic and trophoblastic tissues of the mouse. *J. Immunol.* 93: 255.
81. Searh, F.R. (1982) Trophoblast and MHC antigens. *Immunology Today* 3: 63.
82. Shively, J.E. and Todd, C.W. (1981) The assay and structure of carcinoembryonic antigens. En: *The hand book of Cancer Immunity*. Vol. 8. Harold Water (Ed). Garland STPM Press, New York.
83. Simmons, N.L. (1971) Viviparity, Histocompatibility and fetal survival. *Advn. Biosc.* 6: 405.
84. Sjöquist, J., Meloun, B. and Hjecim, H. (1972) Protein a isolated from staphylococcus aureus after digestion with lysostaphn. *Eur. J. Biochem.* 29: 579.
85. Smith, A.K. (1984) Interleukin 2. *Ann. Rev. Immunol.* 2: 319.
86. Stackpole, C., Jacobson, J. (1978) Antigenic modulation. En: *The Handbook of Cancer Immunology*. Vol. II. Walters, H., Gorland, STPM Press, New York. pp 55.
87. Stutman, O. (1981) NK-Cell, anti-tumor surveillance and interleukins. *Immunology. Today*. Vo. No. 11, 2: 205.
88. Roruyamas, H. and Migita, S. (1978) Cell surface major glycoprotein of BALB/c mouse plasmacytoma 58-8 cel. *J. Natl. Cancer Inst.* 61: 203.
89. Varmus, E. H. (1982) Form and function of retroviral proviruses. *Science* 216: 812.

90. Vestwerber, D. and Kemler, R. (1984) Rabbit antiserum against a purified surface glycoprotein decompacts mouse preimplantation embryos and reacts with adult tissues. *Exp. Cancer Res.* 152: 167.
91. Viza, D. (1971) Human leukemic and leukoembryonic antigens. In: *Embryonic and fetal antigens in cancer*. Vol. 1 Anderson, N.G. and J.H. (Eds) Springfield, V.A.: U.S. Department of Commerce.
92. Weber, K. and Osborn, M. (1979) The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406.
93. Wight, N.T., Raugi, J.G., Mumby, M.S. and Borkstein, P. (1985) Light microscopic immunolocalization of thrombospondin in human tissues. *J. Histochem. and Cytochem.* 33: 295.
94. Yogeewaran, G., Gronberg, A., Hasson, M., Dalianis, T., Kiessling, R. and Welsh, R.M. (1981) Correlation of glycosphingolipids and sialic acid in Yac-1 lymphoma variants with their sensitivity to natural killer-cell mediated lysis. *Int. J. Cancer* 28: 517.