

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

" ESTUDIOS SOBRE LA BIOSINTESIS DE UNA GLICOPROTEINA DE MEMBRANA DE
UN MIELOMA MURINO RESISTENTE A LA DESTRUCCION INMUNE"

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIATURA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA PRESENTA

M A R G A T H E E L E N M O L I N A

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Página

Abreviaciones

1

Introducción

2

Características generales de las células neoplásicas

Antígenos de superficie de células normales y neoplásicas

a) Antígenos de histocompatibilidad

b) Antígenos de diferenciación

c) Antígenos tumorales

Respuesta antitumoral

Evasión de la respuesta inmune

Antecedentes

12

Material y Métodos

15

1. Animales de Experimentación

2. Líneas Tumorales

3. Cultivo de Células tumorales

a) Medio de cultivo

b) Obtención de las células tumorales

c) Cultivo de las células LPC-1 en presencia de líquido de ascitis

d) Co-cultivo de células LPC-1 y células esplénicas

4. Tratamiento de las células tardías con tripsina

5. Marcajes Celulares

a) Incorporación de ^{125}I a proteínas de la superficie celular

b) Marcajes de residuos de ácido siálico de la superficie celular

c) Incorporación de ^{35}S -met in vitro a proteínas celulares para marcar IgG

d) Incorporación de ^3H -azúcares a glicoproteínas celulares

6. Preparación de Extractos Celulares Totales

7. Precipitación de proteínas celulares por TCA

8. Inmunoprecipitados
9. Electroforesis de geles de poliacrilamida-SDS
10. Identificación de marca radioactiva
 - a) Cuantificación de marca en rebanadas de gel
 - b) Autorradiografías y densitometría
11. Ensayo de citotoxicidad con anticuerpos y complemento

Resultados

26

1. Estudio de la expresión de gp160 in vivo marcando las proteínas de la superficie celular por medio de la incorporación de ^{125}I

2. Estudio de la expresión de gp160 in vitro marcando las proteínas de superficie con ^{125}I y NaB^3H_4

3. Estudios de la expresión de gp160 in vitro marcando metabólicamente con ^3H -azúcares o ^{14}C -aminoácidos

4. Estimulación de la biosíntesis de gp160 in vitro

5. Susceptibilidad a la lisis mediada por anticuerpos anti H-2 y complemento de células LPC-1co-cultivadas en presencia de células de bazo

6. Estudios sobre la biosíntesis de Igs en células LPC-1 y Litton y su posible relación con la expresión de gp160

Discusión

32

Conclusiones

38

Bibliografía

39

ABREVIACIONES

Ac	:	anticuerpo
Ag(s)	:	antígeno(s)
Con	:	control
DME	:	Dulbecco's Modified Eagle Medium (medio eagle modificado por dulbecco)
DMSO	:	dimetilsulfóxido
DSS (SDS):	:	dodecil sulfato de sodio (sodium dodecyl sulfate)
EGPA	:	electroforesis en geles de poliacrilamida
Exp	:	experimental
Gal	:	galactosa oxidasa
³ H-fuc	:	³ H-fucosa
³ H-glucN:	:	³ H-glucosamina
Ig(s)	:	inmunoglobulina(s)
IgG	:	gamaglobulinas
Litton	:	LPC-1 Litton
LTC(s)	:	linfocitos T citotóxicos
MHC	:	major histocompatibility complex (complejo principal de histocompatibilidad)
NaNa	:	ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico)
NP-40	:	Nonidet P 40
PBS	:	phosphate buffered saline (solución amortiguadora de fosfatos/salina)
SFB	:	suero fetal bovino
³⁵ S-met:	:	³⁵ S-metionina
Sn	:	sobrenadante
<u>Staphilococcus a.:</u>	:	Staphilococcus aureus tipo Cowan I
TCA	:	trichloroacetic acid (ácido tricloroacético)
tot	:	total

INTRODUCCION

Características generales de las células neoplásicas

La palabra "neoplasia" se refiere literalmente a un nuevo crecimiento celular.

Resulta difícil describir de una manera concisa las propiedades de una neoplasia. Las neoplasias han sido definidas como "masas anormales de tejido cuyo crecimiento excede el de los tejidos normales, es independiente de ellos, y que continúa con los mismos excesos aún después de la desaparición del estímulo que le generó". (Benacerraf, 1981). A esta pérdida del fenómeno de inhibición por contacto (Ponten, 1973; Eisen, 1980) había que agregar otra característica de las células cancerosas: su capacidad de perder, en grados distintos las propiedades de las células diferenciadas a partir de las cuales se originaron: pérdida de localización, alteraciones morfológicas, cromosómicas y bioquímicas. En algunas ocasiones ocurre una regresión hacia patrones característicos de la vida embrionaria, aunque lo contrario ocurre también) o sea que las células tumorales pueden adquirir nuevas propiedades cuyas consecuencias metabólicas son tan indeseables como la pérdida de sus funciones normales.

Las neoplasias difieren mucho unas de otras: se generan a partir de diferentes tejidos diferenciados y los agentes causales pueden ser de varios tipos (químicos, físicos o virales) y estas diferencias se traducen en comportamientos distintos en lo que se refiere a evolución, capacidad de crear metástasis (Fidler, 1975), malignidad y respuesta a posibles agentes anticancerosos.

Es probable que muchos de los factores que regulan el crecimiento desmesurado de las células tumorales y su capacidad de invadir otros tejidos se encuentren localizados en la superficie celular. Se han escrito cientos de artículos comparando la superficie de células normales y cancerosas. Se han encontrado diferencias en prácticamente todos los componentes de la superficie celular, trátase de proteínas, antígenos, glicoproteínas, glicolípidos, colesterol, actividades enzimáticas, contenido de azúcares, etc. Pero prácticamente en ningún caso se encontró función alguna para estas alteraciones y aún menos alguna correlación con el crecimiento tumoral.

Entre los antígenos membranales más estudiados se encuentran las glicoproteínas pues desempeñan múltiples funciones: pueden estar directamente involucrados en las interacciones celulares entre células inmunes (Ags de histocompatibilidad clase II) o bien entre células inmunes y células tumorales infectadas por algún virus (Ags de histocompatibilidad clase I). Los receptores para el Fc de Inmunoglobulinas son también glicoproteínas, mientras que otras proteínas de este tipo intervienen en los procesos de secreción o de internalización celular. Se han descrito algunas glicoproteínas de células tumorales y que parecen intervenir directamente en los mecanismos de escape de estas células (Codington, 1975; Celis, 1979 a, Robbins, 1975).

Antígenos de superficie de células normales y neoplásicas.

Se han descrito más de 40 loci que codifican para determinantes alógenos de la membrana de linfocitos (McKenzie, 1979).

Estos estudios han permitido identificar a las diferentes subpoblaciones funcionales de linfocitos, los cambios que presenta una célula linfocítica a lo largo de su diferenciación, el polimorfismo genético que

tiene como consecuencia la variabilidad estructural de la superficie celular y el examen de ciertos tumores en comparación con las células normales.

Los Ags identificados hasta el momento se han clasificado en:

- aquellos relacionados con el MHC (Major histocompatibility complex).
- aquellos que son característicos de un tipo celular.

El complejo principal de histocompatibilidad, denominado HLA en humano (cromosoma 6) y H-2 en el ratón (cromosoma 17), está formado por un grupo de genes relacionados entre sí responsables entre otras funciones de la regulación de la respuesta mediada por anticuerpos y de la expresión de moléculas de superficie involucradas en interacciones celulares (Klein, 1979; Shreffler, 1975; Hood, 1983).

a. Antígenos de histocompatibilidad

El conjunto de genes del MHC se ha clasificado de la siguiente manera:

Los genes de la clase I, que codifican para dos tipos de antígenos: aquellos codificados por las regiones K, D y L, así como Qa-2 y Tla (Soloski, 1981). Los productos génicos de las regiones K, D y L del MHC son glicoproteínas de 45 000 daltones sumamente polimórficas que se encuentran presentes en la superficie de todas las células de ratón, (los eritrocitos de humano no tienen antígenos de histocompatibilidad). En general van asociadas en forma no covalente a una proteína de menor peso molecular (12 000 daltones) denominada B-2-microglobulina (Klein, 1981).

Los genes de la clase II corresponden a la región I del MHC. Esta re-

gión consta de 5 subregiones llamadas I-A, I-B, I-J, I-E e I-C. Las características de los productos génicos de la clase II son las siguientes: son heterodímeros compuestos de una cadena α y una β . El peso molecular de las cadenas α es de alrededor de 30 000 y el rango de peso de las cadenas β es de 27 000 a 29 000 daltones. La diferencia del peso molecular de las cadenas se debe a diferencias en glicosilación. Estas moléculas están involucradas en la regulación de las funciones de las células T: ayuda (T_h), supresión (T_s) o para el reconocimiento de un antígeno extraño en conjunto con la identificación de lo propio en la superficie de otras células T, de macrófagos o de células B. También parecen estar involucrados en la estimulación de la diferenciación de las células B. (Hood, 1983, Klein 1981, 1983).

Por último, los genes de la clase III contienen la información de algunos componentes de activación de la cascada de complemento: C4 que consta de la proteína sérica y de la proteína ligada al sexo (Klein, 1979).

Se ha observado que para las reacciones de ayuda mediadas por linfocitos T, la activación de macrófagos y la hipersensibilidad retardada es necesario que estén expresados productos génicos correspondientes a la clase II del MHC (Zinkernagel, 1978). Mientras que la citotoxicidad mediada por linfocitos T no se produce si no están expresados los productos H-2K y H-2D del MHC (clase I), en la célula que provocó el estímulo (Shearer, 1977; Bevan, 1978, Zinkernagel, 1979).

b) Antígenos de diferenciación.

Además de los productos del MHC, se han identificado Ags de superficie característicos de ciertos tipos celulares. La mayoría de los marcadores

identificados en las células B no están realmente restringidos a este tipo celular y su función es desconocida.

Entre los Ags de los linfocitos B se encuentran los relacionados a los loci Ly. Los primeros antígenos específicos de linfocitos que fueron descritos son los productos del locus Ly (Boyse, 1969). Estas moléculas se denominan Lyt cuando se expresan en la superficie de las células T y Lyb cuando se encuentran en las membranas de las células B. También hay antígenos que se encuentran en ambos tipos celulares: Ly6 -17. Los antígenos Lyt, Lyb, y Ly se han encontrado también en neoplasias linfoides y no parecen ser antígenos de diferenciación (McKenzie, 1979; Ahmed, 1982). Lyb-3, 5 y 7, presentes en las células B parecen tener una función en la interacción con células T_h y en la regulación de los genes que codifican para la cadena pesada de Ig (Howard, 1982).

El antígeno PC-1 es un antígeno de diferenciación de las células B que se expresa en células plasmáticas en las etapas tardías de diferenciación. También se encuentra en la superficie de células de cerebro, riñón, hígado y en algunos mielomas (Takahashi, 1970; Tung, 1980). Por su distribución Heberman y colaboradores (1972) han propuesto que PC-1 es un antígeno de origen viral, y que éste solo se expresa en la última etapa de diferenciación de las células B (Tung, 1978). Recientemente se han identificado dos antígenos de diferenciación que aparecen en las células precursoras de linfocitos B, mediante el uso de anticuerpos monoclonales. Se les llama AA4.1 y Gf1.2 respectivamente. Parece ser que una célula pre-B AA4.1⁺ se diferencia a cé-

lula B GF1.2⁺, sIgM⁺. (McKearn, 1984). Aún faltan por caracterizar muchos Ags de superficie de los linfocitos B que ayuden a elucidar los mecanismos de regulación, función y diferenciación de este tipo celular tanto normal como transformado.

c) Antígenos tumorales:

Prehn, Floey, Main y Klein (1960) probaron la existencia de Ags tumorales específicos que podían ser reconocidos por el huésped para su defensa. Observaron además, en su sistema experimental, que los Ags eran específicos para cada tipo de tumor, o sea la inmunización de un ratón con un sarcoma no impide que otro tipo de tumor se desarrolle en el ratón, sin embargo el sarcoma se rechaza.

Los antígenos tumorales pueden ser de origen viral o resultar de alguna mutación producida por agentes químicos o físicos:

- Los antígenos de origen viral son moléculas codificadas por genes del virus, que se encuentran incorporados al genoma celular. Son los mismos en cualquier tejido o tipo celular en el que se expresen. Un ejemplo de este tipo de Ags son los relacionados con el virus de la leucemia murina que codifica para partículas presentes en la superficie de los linfocitos T. Estos Ags virales pueden llegar a expresarse bajo ciertas condiciones como el tratamiento de las células con factores químicos o radiaciones.

- Ags que aparecen cuando la célula ha sufrido alguna mutación:

Estos Ags, a diferencia de los virales, son característicos de cada tumor, habiendo diferencias entre dos tumores derivados del mismo tipo histológico y producidos por el mismo agente químico. Pueden ser macromoléculas que se

expresan normalmente en tejido embrionario y que no se reconocen como propias en el animal adulto por haber desaparecido antes del desarrollo del sistema inmune. Entre los antígenos embrionarios identificados se encuentran la α -fetoproteína, que es característica de hepatomas y teratoblastomas de ovario (Abelev, 1971; Coggin, 1974), y el antígeno carcinoembrionario (ACE). El ACE es una glicoproteína de 180 kilodaltones que contiene un 65% de carbohidratos por molécula, y que está presente en neoplasias humanas de origen gastrointestinal (Gold, 1965; Shively, 1981).

Además de los Ags embrionarios hay autores que proponen la existencia de Ags específicos del tumor. Estos Ags son moléculas que normalmente se expresan en la superficie de las células, pero que han sufrido una mutación (Natori, 1977; Rusell, 1979).

Respuesta antitumoral:

En la literatura está bien fundamentado el concepto según el cual las células neoplásicas tienen antígenos de superficie diferentes a los presentes en células normales y que éstos antígenos tumorales pueden inducir una respuesta del sistema inmune del huésped. En los últimos años se ha centrado la atención en el estudio de la naturaleza de esas respuestas antitumorales.

La respuesta antitumoral se lleva a cabo principalmente por linfocitos T citotóxicos (LTCs), células asesinas naturales, macrófagos activados y cé-

lulas asesinas. Además se ha sugerido la existencia de una constante vigilancia inmunológica sobre los tejidos de los individuos y que se encarga de eliminar células mutantes que pudieron aparecer (Burnet, 1970; 1971).

Las células asesinas o nulas son células linfoides que carecen de antígenos de superficie característicos de las células T o B. Están involucradas en las reacciones de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (Ac). El Ac se adhiere al Ag de superficie de la célula neoplásica y es este complejo el que reconoce la célula asesina para lisar a la célula tumoral (Benacerraf, 1979; Eisen, 1980).

Los macrófagos activados también tienen actividad antitumoral. El proceso de activación de los macrófagos requiere de la interacción de estas células con linfocitos T sensibilizados o con factores producidos por ellos actualmente conocido como I1 (MAF) (Fidler, 1976). La lisis de la célula neoplásica solo se lleva a cabo si hay una interacción directa entre la célula blanco y el macrófago y por la liberación de un factor lítico por el macrófago (Johnson, 1980; Adams, 1981).

Las células asesinas naturales constituyen una subpoblación de células linfoides que se caracterizan por carecer del antígeno de superficie Thy-1 y de las células T, del receptor para inmunoglobulinas (Ig). Se encuentran principalmente en el bazo y en la sangre. Tienen una actividad citolítica espontánea en contra de algunas células tumorales o normales, la cual puede aumentarse por interferón (Heberman, 1979a; 1979b). En humanos, la lisis pa

rece involucrar a antígenos de superficie de las células asesinas naturales que son sensibles al tratamiento con proteasas como la tripsina, la quimiotripsina y la papaina (Hiserodt, 1983; Fast, 1983).

Dentro de las reacciones mediadas por células con actividad antitumoral, la más importante es aquella mediada por LTCs. En este tipo de reacciones, la respuesta se induce cuando aparece una alteración en la superficie celular de tal modo que la célula ya no es reconocida como "propia" por el sistema inmune. El reconocimiento de la célula extraña por los LTCs se lleva a cabo por la identificación tanto del neoantígeno, como de los productos H-2K y H-2D del complejo principal de histocompatibilidad sin que se sepa realmente si hay uno o dos receptores involucrados en el proceso (Zinkernagel, 1979). Se ha reportado recientemente la identificación del posible receptor de las células T (Acuto, 1983; Kappler, 1983) : se ha propuesto que es un heterodímero formado por una cadena α de 49- 51 kilodaltones y una cadena β de 43 kilodaltones. Estas subunidades están asociadas no covalentemente a una molécula monomórfica de 20 -25 kilodaltones (Acuto, 1983; Kappler, 1983). Los LTCs lisan a la célula extraña en forma autónoma, unidireccional y sin dañar a células circundantes.

Evasión de la respuesta inmune:

A pesar de que las células tumorales sean capaces de inducir una respuesta inmune en contra de ellas mismas, suelen evadir esta respuesta. La evasión de la respuesta inmune se refiere a los mecanismos por los cuales una célula

neoplásica se defiende de las diferentes reacciones inmunológicas, para desarrollarse y crecer en un ambiente que está encargado de destruirla. Entre los mecanismos mediante los cuales las células tumorales evaden la respuesta inmune se han propuesto:

- 1) La inmunosupresión del huésped debida a la liberación de factores solubles por la célula neoplásica (Hellström, 1970; Hellström, 1974).
- 2) La escasa antigenicidad tumoral que presentan algunas células, ocasiona que se despierte una respuesta inmune lenta y poco eficaz (Old, 1965; Klein, 1973).
- 3) La capacidad que tienen algunas células neoplásicas de desprender o internalizar antígeno membranal cuando éste reacciona con el anticuerpo (Esmon, 1976).
- 4) El enmascaramiento superficial de determinantes antigénicos tumorales - o de productos del MHC para impedir la interacción de los LTCs con sus receptores membranales. Se han sugerido diferentes formas de enmascaramiento de los antígenos de superficie de células neoplásicas:

a) Por un mecanismo de cargas, como por ejemplo la presencia de una carga negativa en la superficie celular que repela a cualquier molécula que pueda tener esta misma carga. Se ha observado que algunas células neoplásicas están cargadas negativamente debido a la presencia de residuos de ácido siálico (Sharer et al, 1977; van Beek et al, 1973).

b) Por la producción intrínseca de la célula neoplásica de glicoproteínas que cubran antígenos reconocibles, como la epiglicanina presente en las células TA3-H (Codington, 1975) o gp160 que se encuentra en el mieloma LPC-1 (Celis et al, 1979a).

ANTECEDENTES

Estudios previos muestran que el mieloma LPC-1 adquiere periodicamente una resistencia a la lisis por LTCs o por anticuerpos y complemento (Celis et al, 1979a, b; Hale et al, 1979).

El mieloma LPC-1 crece en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c en forma de ascitis. Las células tumorales obtenidas de la cavidad peritoneal de ratón 3 días después de la inoculación (células tempranas) son susceptibles a la lisis por LTCs o por anticuerpos anti H-2 y complemento cuando se prueban en un ensayo de citotoxicidad. Sin embargo las células LPC-1 recolectadas 12 a 14 días después de ser trasplantado el tumor (células tardías) se muestran resistentes a la lisis inmune (Celis et al, 1979a). Paralelamente a esta resistencia las células LPC-1 tardías adsorben 6 a 10 veces menos anticuerpos anti H-2^d que las células tempranas (Hale et al, 1979).

Estos cambios en el comportamiento de las células LPC-1 podrían explicarse por una disminución de la síntesis y expresión de los antígenos del MHC, H-2K y H-2D, o porque estos antígenos estén cada vez menos accesibles.

Estudios comparativos de las superficies de las células tempranas y tardías muestran que la aparición del fenotipo resistente correlaciona estrechamente con la expresión de una glicoproteína de membrana de 160 000 daltones (gp160), la cual se acumula con el tiempo en la superficie de las células LPC-1 (Celis et al, 1979b).

Gp160 es una glicoproteína formada por una sola cadena polipeptídica,

rica en ácido siálico (Rosenstein, 1984). Se encuentra, en las células tempranas, a la mitad de la concentración encontrada en las células tardías. Es muy sensible a la tripsina y reacciona con algunas lectinas tales como la aglutinina de germen de trigo y la concanavalina A (Celis, B., 1983).

La resistencia de las células tardías a la lisis por LTCs y por anticuerpos anti H-2 más complemento se pierde cuando las células son retrasplantadas a ratones BALB/c y extraídas 3 ó 4 días después, cuando las células se mantienen en cultivo por más de 4 días (Hale et al, 1979) o cuando se tratan con proteasas como la tripsina, la quimiotripsina, la subtilisina o la neuroaminidasa (Celis et al, 1979b). Todos estos tratamientos disminuyen la concentración de gp160 en la membrana celular.

Estudios cuantitativos de la expresión de los antígenos H-2 presentes en la superficie de células tempranas y tardías tratadas con tripsina, muestran que hay cantidades semejantes en ambos tipos celulares, lo cual sugiere que gp160 puede estar interaccionando con ellos impidiendo estéricamente su reconocimiento por LTCs y anticuerpos anti H-2 (Hale et al, 1979). Posteriormente se observó que gp160 interacciona preferencialmente con los antígenos H-2K y H-2D y que antígenos no relacionados al MHC no están significativamente enmascarados por gp160 (Celis et al, 1980).

Aún cuando los anticuerpos dirigidos en contra de antígenos no relacionados con el MHC se adsorben en cantidades equivalentes en células tempranas y en tardías, la lisis mediada por complemento es menor en las últimas (Celis et al, 1980; Celis, 1983).

A lo largo de este trabajo, se intentó buscar, in vitro, la existencia de algún factor responsable de la acumulación de gp160 en la superficie de las células LPC-1. Se analizó el efecto del líquido de ascitis o de células inmunocompetentes, agregados al medio de cultivo, sobre la expresión de gp160. Se estudió si la acumulación de gp160 en la superficie celular es el resultado de una menor degradación (o secreción) o bien de una mayor síntesis. Se demostró también que no existe correlación entre la pérdida de la capacidad de secretar inmunoglobulinas y la aparición de gp160.

MATERIALES Y METODOS

1. Animales de Experimentación

En cada experimento se utilizaron animales del mismo sexo y edad (9 semanas). Se utilizaron ratones de ambos sexos de las siguientes cepas:

a) BALB/c (H-2^d), obtenidos del Instituto Mexicano del Seguro Social.

b) BALB/b (H-2^b), obtenidos del Instituto de Tecnología de Massachussetts y reproducidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

2. Líneas Tumoraes

Se usaron dos mielomas murinos LPC-1 (H-2^d) y LPC-1 Litton, (Litton, H-2^d). LPC-1 Litton es la línea original y fue inducida por Michael Potter con aceite mineral en ratones BALB/c. LPC-1 es una sublínea obtenida esponáneamente a partir de LPC-1 Litton y mantenida desde hace varios años en el laboratorio del Dr. Herman Eisen, de donde provienen ambas líneas. LPC-1 ha perdido la capacidad de secretar inmunoglobulinas mientras que las células Litton sintetizan IgG_{2k}.

3. Cultivo de Células Tumoraes (todos los cultivos se hicieron por duplicado a partir de las células obtenidas por lo menos de 2 ratones).

a) Medio de cultivo. Se utilizó el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DME: Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) adicionado con:

20% de suero fetal bovino (SFB, Flow Laboratories)

2mM de glutamina (Gibco)

1% de una solución de antibióticos y antimicóticos (Gibco: penicilina 100 ug/ml, anfotericina B 0.25 ug/ml, streptomycin 100 ug/ml)

0.1 mM de una solución de aminoácidos no esenciales (Gibco)

1% de 100mM de piruvato de sodio (Gibco).

b) Obtención de las células tumorales. Cada semana se inoculan ratones BALB/c intraperitonealmente con 1×10^7 células tumorales en 0.5ml de una solución amortiguadora de fosfatos/salina (pH=7.4, 0.15 M NaCl, 0.01 M $\text{PO}_4^{=}$, PBS: phosphate buffer saline).

Las células tumorales se obtienen en condiciones de esterilidad lavando con PBS la cavidad peritoneal de los ratones inoculados. Las células tumorales se lavan varias veces mediante centrifugaciones a 100 x g durante 5 min, lo cual permite separar eritrocitos de células neoplásicas. La viabilidad se estima con azul tripano, siendo siempre mayor del 90%.

Con el fin de encontrar los posibles factores o el factor responsable de la acumulación de gp160 en la superficie de la célula LPC-1 se cultivaron las células en presencia del líquido de ascitis y de células de bazo de animales normales y portadores del mieloma:

c) Cultivo de células LPC-1 en presencia de líquido de ascitis. Se lava la cavidad peritoneal de los ratones BALB/c con 5ml de medio de cultivo y se separan las células por centrifugación a 100 x g durante 5 min. El líquido de ascitis, libre de células tumorales se centrifugó a 1000 x g durante 10 min para eliminar fragmentos celulares y se añadió al medio de cultivo a una concentración final de 10 a 15%.

Las células LPC-1 resuspendidas en PBS estéril se cultivaron a una concentración final de 2×10^5 células por ml.

d) Co-cultivo de células LPC-1 y células esplénicas. Para ésto se usa ron bazos de ratones BALB/c sanos y de animales portadores del tumor.

Los bazos, obtenidos en condiciones estériles, se disgregaron en PBS usando una malla metálica (200 mesh). La suspensión celular obtenida se coloca en tubos cónicos de 15ml y se deja reposar para que las partículas más grandes sedimenten. El sobrenadante de estos tubos se decanta en tubos lim pios y se centrifuga a 100 x g por 5 min. El botón celular se resuspende en medio de cultivo y se añade al cultivo de células tumorales (2×10^5 células/ml) a una concentración final de 2×10^6 células de bazo/ml de medio de cultivo.

4. Tratamiento de las células tardías con tripsina.

Para remover gp160 de la superficie celular, se tratan las células LPC-1 con tripsina (Celis, et al, 1979b): 1×10^7 células se resuspenden en 10ml de una solución de PBS con tripsina al 0.025% (Sigma). Las células se incuban a temperatura ambiente durante 30 min; posteriormente se lavan 4 ve ces con PBS centrifugando a 100 x g por 5 min. El botón final se resuspende en PBS y se cuenta el número de células tumorales viables.

5. Marcajes Celulares

Para la caracterización de las moléculas de la superficie celular de los mielomas se utilizan diferentes técnicas de marcaje:

a) Marcaje in vitro

Incorporación de ^{125}I a proteínas de la superficie celular.

La técnica se base en la oxidación de iones iodo en presencia de lacto peroxidasa y peróxido de hidrógeno para dar lugar a un complejo enzimático con la capacidad de convertir los residuos de tirosinas de las proteínas de superficie en derivados monoiodinados (Marchalonis et al, 1971). Las histi_udinas también pueden iodinarse aunque en menor grado (Hubbard, 1976).

A 1×10^7 células tumorales (95-100% de viabilidad), previamente lavadas se les agrega 10 ul de lactoperoxidasa (4mg/ml en PBS), 300 uCi de Na^{125}I (New England Nuclear, actividad específica: 16.6 mCi). Posteriormente se añaden 10 ul de una solución recién preparada de H_2O_2 al 0.03% en PBS. La mezcla se incuba durante 10 min a 30°C.

Para eliminar el exceso de ^{125}I libre, se lavan las células 4 veces con 15ml de una solución de KI 5mM en PBS.

Marcajes de residuos de ácido siálico de la superficie celular de células tumorales:

La técnica se basa en la oxidación de los residuos de carbohidratos de la superficie celular por medio de periodato de sodio. Posteriormente los residuos oxidados de las glicoproteínas se reducen con borohidruro de sodio (NaB^3H_4 , Amersham Int. actividad específica: 8 Ci/mmol) los cuales quedarán marcados con tritio (Flowers et al, 1980).

A 1×10^7 células tumorales en 0.6 ml de DME se les agregan 10 ul de NaIO_4 0.1 M. Se incuban 10 min a temperatura ambiente. Se lavan las células 3 veces con PBS frío. Después de la última centrifugación se le añade al botón celular previamente resuspendido en 0.6 ml de DME, 20 ul de una so-

lución de NaB^3H_4 (1 mCi) en 0.01 N de NaOH. Las células se dejan incubar a 4°C durante 20 min y se lavan 3 veces con PBS frío.

Marcaje de los residuos de galactosa:

Se les añaden a las células previamente lavadas y resuspendidas en 0.6 ml de DME, 6 unidades de galactosa oxidasa en 20 μl de PBS. Las células se incuban 40 min a 37°C y se lavan 3 veces con PBS. Después de resuspender las células en 0.6 ml de medio que contiene 1 mCi de NaB^3H_4 en 0.01 N de NaOH, se dejan incubar 40 min a temperatura ambiente. Finalmente se lavan las células tumorales 3 veces con PBS frío (Gahmberg, 1976).

Incorporación de ^{35}S -metionina in vitro a proteínas celulares para marcar IgG:

Las células (5×10^5 ml) se incuban durante 24 hrs en medio DME y 20% de SFB que contiene 0.01 mCi de ^{35}S -met (este medio está libre de metionina). Se ha mostrado que se necesitan 12 hrs para que la incorporación de leucina, que son aminoácidos muy comunes, alcancen una constante. Debido a que la metionina es menos común, se aumentó el tiempo de incubación a 24 hrs (Richard, 1979).

Incorporación in vitro de ^3H -azúcares a glicoproteínas celulares:

Los azúcares utilizados son los siguientes:

- ^3H -galactosa (^3H -gal, actividad específica: 51.7 Ci/mmol)
- ^3H -fucosa (^3H -fuc, actividad específica: 84 Ci/mmol)
- N-acetil- (^3H -manosamina, actividad específica: 22.8 Ci/mmol)
- ^3H -glucosamina (^3H -gluN, actividad específica: 32.5 Ci/mmol)

Se colocan 5×10^6 células en cajas de cultivo de 24 pozos en 1 ml de medio de cultivo y se le añade 5 a 10 uCi de alguno de los azúcares marcados con tritio a cada pozo. Se toman las células a intervalos de 3 hrs, se lavan con PBS 3 veces y se someten a una extracción con NP-40 al 0.5% (Melchers, 1970, 1971; Muramatsu, 1970).

6. Preparación de extractos celulares totales

Para solubilizar los componentes radioactivos de la superficie celular se resuspenden las células tumorales marcadas (1×10^7) en 100 ul de PBS que contiene 0.5% de NP-40 y un inhibidor de proteasas a una concentración de 2 mM final (fenil-metil-sulfonilfloruro). Después de incubarlas 30 min a 4°C se centrifugaron las muestras a 15,600 x g durante 15 min y los sobrenadantes se conservaron a -70°C hasta ser utilizados (Schwartz, 1971).

7. Precipitación de proteínas celulares por Acido Tricloroacético (TCA)

Con objeto de conocer la cantidad de marca incorporada a la proteína se hacen precipitaciones usando ácido tricloroacético. Por este método se separan los isótopos libres de la marca incorporada.

Se toman alicuotas de 10 ul del extracto radioactivo celular, se añaden 10 ul de SFB con el fin de tener más proteína que atrape las moléculas marcadas y se precipiten con mayor facilidad. A esto se le adicionan 3 ml de TCA al 10% y se deja incubar 10 min a 4°C. Las muestras se centrifugan (500 x g/5 min) 3 veces en una solución de TCA al 10%, desechando cada vez el sobrenadante.

El botón final se cuenta 1 min, en un contador Autologic de Abbot para radiaciones gamma, si contiene muestras marcadas con ^{125}I .

Para la identificación de la marca de tritio o ^{35}S , se toma la alicuota del extracto celular radioactivo, que se resuspende en 5ml de líquido de centelleo preparado de la siguiente manera:

1 l	tritón X-100
2 l	tolueno
450 mg	PoPoP (New England Nuclear)
16.5 g	PPO (New England Nuclear)

La muestra resuspendida se cuenta 1 min en un contador para radiaciones beta. En el caso del ^{125}I , la marca oscila generalmente entre 0.2 y 0.8 cpm/célula. Para ^{35}S fue de 0.1-0.7cpm/cel., para NaB^3H_4 0.07-0.1 cpm/cel. y para galactosa .07-0.1 cpm/cel.

8. Inmunoprecipitados

Con el fin de identificar en el extracto celular la molécula marcada que nos interesa, se hacen inmunoprecipitados con un anticuerpo específico. Este antisuero se produce inmunizando repetidamente por vía intraperitoneal, ratones BALB/b con 1×10^7 células LPC-1 en 0.5 ml de PBS. Después de 5 ó 6 inmunizaciones se sangran los ratones por la cola. Este suero contiene anticuerpos anti-H-2 y anti-gp160 y lo obtuve de la Dra. Yvonne Rosenstein. (los anticuerpos anti-H-2 fueron removidos por adsorción con células P815, H-2^d).

Se toman 40 ul del extracto celular marcado radioactivamente o 100 ul

del sobrenadante del medio de cultivo y se le añaden respectivamente 5 ul y 10 ul del antisuero necesario. Esto se incuba 1 hr a 4°C. Para aislar los complejos antígeno-antisuero se añaden a las muestras 100 ul de una suspensión al 10% de Staphilococcus aureus, tipo Cowan I inactivado (Pansorbin, Calbiochem.-Behring Corp.) y se deja en reposo 30 min. El Staphilococcus a. presenta sobre su superficie proteína A que tiene receptores para la porción Fc de inmunoglobulinas. Al centrifugar las muestras, el Staphilococcus a. sedimenta llevándose los complejos antígeno-anticuerpo que se encuentran fijos en su superficie (Cullen, 1976; Celis et al, 1979b).

Los inmunoprecipitados se lavan 6 veces, colocando la muestra sobre un colchón de sacarosa al 30% con NP-40 al 0.5% y deoxicolato al 0.5% en PBS, centrifugando a 15,600xg durante 5 min. El precipitado final se hierve por 5 min con solución para muestra (ver EGPA) y se centrifuga a 15,600 x g por 10 min para separar al Staphilococcus de los complejos antígeno-anticuerpo.

9. Electroforesis de Geles de Poliacrilamida -SDS (EGPA):

La metodología que se utiliza para la separación de las proteínas membranales es la electroforesis con SDS (Weber, 1979). El principio de la electroforesis consiste en la separación de las moléculas en base a su peso molecular y a su carga. Para impedir que la carga altere la migración de las proteínas en base a su peso molecular, la electroforesis se lleva a cabo en presencia de SDS, de tal manera que todas las proteínas estén cargadas negativamente.

La muestra en un máximo de 100 ul de solución para muestra (0.08 M Tris, pH=6.8 , glicerol 10% 5% SDS, 5% beta mercaptoetanol, 0.002% de azul de bromofenol), previamente

hervida durante 5 min, se aplica sobre geles de poliacrilamida al 10 ó 12.5% sobre los cuales se encuentra 1.5 cm de gel concentrador (5%). El gel concentrador se corre, en caso de geles en tubo a 3 mA/tubo y en el de gel en placa a 15 mA. Cuando el colorante entra al gel separador se aumenta el amperaje a 5 mA/tubo y a 30mA respectivamente.

Los geles se tiñen y se fijan durante 12 hrs en una solución de azul de coomasie al 0.6%, ácido acético al 10%, metanol al 30% y agua. Para quitar el exceso de colorante incorporado al gel, se hacen varios lavados con ácido acético al 10%.

10. Identificación de marca radioactiva

Con el fin de identificar las proteínas marcadas radioactivamente, los geles se someten a los siguientes métodos:

a) Cuantificación de marca radioactiva en rebanadas de gel:

Los geles en tubo se cortan en rebanadas de 2 mm, las cuales se ponen en tubos por separado. Se cuenta la radioactividad incorporada a cada rebanada, en el caso de ^{125}I en un contador de rayos gamma. En el caso de que los geles contengan proteína marcada con algún isótopo de radiaciones beta (^3H , ^{35}S ó ^{14}C) cada rebanada de gel se coloca en un vial con 0.5ml de H_2O_2 al 30%, se dejan 12 hrs a 60°C para que la rebanada de gel se disuelva. Posteriormente se les agrega 5 ml de líquido de centelleo y se cuenta la marca radioactiva de cada vial con un contador de radiaciones beta.

b) Autorradiografías y densitometría:

Cuando los geles en placa contienen ^{125}I , el gel desteñado se seca entre un papel filtro en un secador comercial con vacío y calor simultanea-

mente durante 4 hrs.

Cuando se utiliza un isótopo que emite radiaciones beta, el gel se somete a la técnica de fluorografía descrita por Bonner y colaboradores (1974) para incrementar la eficiencia de impresión sobre las placas fotográficas:

- Se sumerge el gel 30 min en 20 veces su volúmen de dimetilsulfóxido (DMSO). De esta manera se lava el gel 3 veces con DMSO limpio.

- Se sumerge el gel en 4 veces su volúmen de DMSO con PPO (22.2% p/v) por 3 hrs. El PPO al interaccionar con las emisiones beta produce fotones los cuales van a velar la placa en los lugares donde haya proteína marcada.

- Se lava el gel en 20 veces su volumen de agua destilada por una hora. Se seca el gel entre un papel celofán y un papel filtro con vacío y calor por 4 hrs.

- El gel se coloca en contacto con una placa de rayos X y se expone a -70°C , aumentándose así la sensibilidad de la placa a las radiaciones de 25 a 100 veces.

Para el revelado las placas se descubren en el cuarto oscuro, se sumergen en la solución reveladora (Kodak X GBX) durante 1 a 2 min, se enjuagan las placas con agua y se sumergen 3 min en fijador (Kodak para películas de rayos X). Por último se enjuaga la placa con agua y se deja secar.

Con el fin de cuantificar la marca en la autorradiografía, las placas fotográficas se someten a una densitometría, la cual se basa en la absorción de la banda oscura velada de la placa, comparada con la absorción ba-

sal de la placa. Esta relación se grafica y se calcula el área bajo la curva.

11. Ensayo de Citotoxicidad con Anticuerpos y Complemento:

Las células se marcan incubando 5×10^6 células con 250 uCi de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear, actividad específica: 350-600 mCi/mg) en 0.5 ml de DME con 10% de SFB durante 1 hr a 37°C. Las células marcadas se centrifugan 4 veces con PBS frío y se ajustan a la concentración deseada (1×10^6 células/ml).

Los ensayos de citotoxicidad se llevan a cabo de la siguiente manera:

Las células (5×10^4) previamente marcadas con ^{51}Cr se resuspenden en DME y se colocan en tubos de plástico Falcon (12 x 75 mm) con diferentes diluciones del antisuero, y complemento (este último, a una dilución final de 1:20) en un volumen final de 0.1ml. Se incuba 1 hr a 37°C en presencia de 7% de CO_2 , después de lo cual se le añade a cada muestra 0.9 ml de PBS frío para detener la reacción lítica. Los tubos se centrifugan a 100 x g por 5 min. El contenido de cada tubo se divide en dos partes, contándose por separado 0.5 ml del sobrenadante y los restantes 0.5ml y el botón celular en un contador de rayos gamma. La lisis específica mediada por la liberación de ^{51}Cr se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de lisis específica} = \frac{\text{cpm Sn Exp} \times 2}{\text{cpm Exp Tot}} - \frac{\text{cpm Sn Con} \times 2}{\text{cpm Con Tot}} \times 100$$

$$= \frac{1}{\text{cpm Con Tot}}$$

- Sn: sobrenadante
- Exp: experimental
- Tot: total (suma de cpm en el Sn y cpm en el tubo del precipitado)
- Con: control

RESULTADOS

1. Estudio de la expresión de gp160 in vivo, marcando las proteínas de la superficie celular por medio de la incorporación de ^{125}I :

Con el fin de conocer el momento en el que la concentración membranal de gp160 aumenta, se determinó la cinética de acumulación de gp160 en la superficie de las células LPC-1, para poder hacer, posteriormente, estudios de biosíntesis con estas células.

Como se puede observar en la figura 1, la cantidad de gp160 expresada en la superficie de la célula neoplásica oscila alrededor del 17% del total de la marca incorporada a las células durante los primeros 8 días después de haber sido trasplantado el mieloma. Después del décimo día aumenta notablemente la concentración de gp160 membranal, alcanzando un 35% del total de proteína marcada.

2. Estudio de la expresión de gp160 in vitro, marcando las proteínas de superficie de las células neoplásicas:

Una vez identificado el momento en el que las células LPC-1 comienzan a acumular gp160 en su superficie (10 días después del trasplante), se procedió a estudiar el comportamiento de estas células in vitro. Las células LPC-1 de 10 y 11 días se colocaron en cultivo y se midió la cantidad de gp160 expresada en la membrana celular, marcando con ^{125}I o con NaB^3H_4 . Se esperaba que en las primeras 24 hrs la concentración de gp160 aumentara siguiendo el ritmo que tenían las células in vivo, para después bajar los niveles de expre

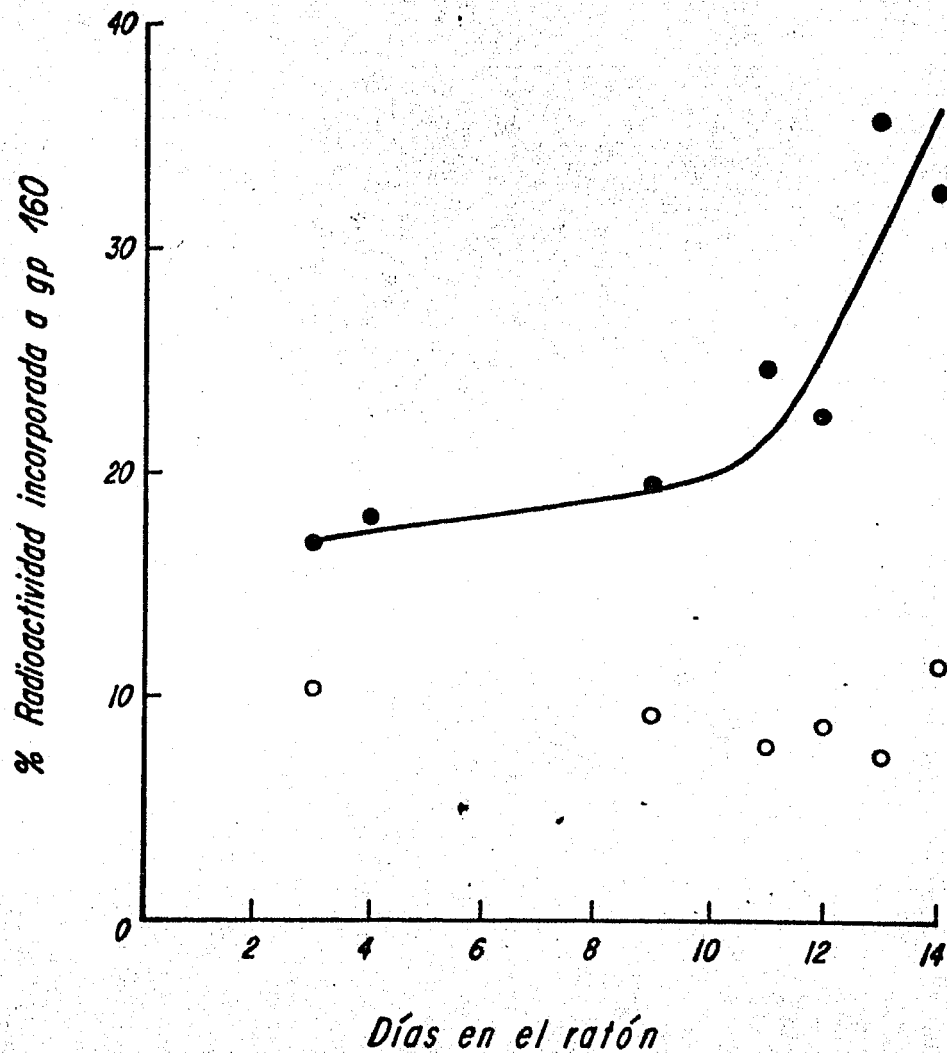


Fig. 1. Concentración de gp160 membranal de células LPC-1 a diferentes tiempos después de trasplantar el tumor - en ratones BALB/c. La superficie membranal de células LPC-1 se marcó con ^{125}I usando lactoperoxidasa. Las proteínas membranales se extrajeron con NP-40 al 0.5%, se identificaron y cuantificaron a partir de - geles de poliacrilamida-DSS en los que se colocaron equivalentes celulares. (1×10^6 células/carril)

- LPC-1
- LPC-1 tratadas con tripsina 0.025%

si3n.

Como se puede observar en la figura 2 la cantidad total de gp160 expresada en la superficie de las c3lulas de mieloma en cultivo, marcada con ^{125}I , baja paulatinamente. En las primeras 48 hrs alcanza los niveles de expresi3n caracteristicos de una c3lula temprana. Todas las c3lulas tardias (9, 12, 13 y 14 d3as) siguen el mismo comportamiento. En cambio en las c3lulas tardias tratadas con tripsina para remover a gp160 de la superficie celular, antes de cultivarlas, los niveles de expresi3n de esta glicoproteina aumentan en las primeras 24 hrs de cultivo, para despu3s mantenerse constantes.

Las c3lulas tempranas (3 d3as), tienen valores muy comparables a los de las c3lulas LPC-1 tardias cultivadas, aunque la amplitud de las desviaciones estandar deja percibir una mayor heterogeneidad celular.

Como puede observarse en la figura 3, las t3cnicas de marcaje usadas para incorporar tritio a residuos de 3cido si3lico y de galactosa marcan a gp160. El efecto anteriormente mencionado vuelve a presentarse. Tanto las c3lulas marcadas con tritio en los residuos de 3cido si3lico como los de galactosa presentan una disminuci3n en la concentraci3n de gp160, mientras que en las c3lulas que no contienen esta glicoproteina (debido al tratamiento con tripsina) se incrementa la expresi3n de gp160 en las primeras 24 hrs de cultivo para despu3s mantenerse en un nivel estable.

3. Estudios de la expresi3n de gp160 in vitro marcando metab3licamente con ^3H -az3cares o ^{14}C -amino3cidos:

La disminuci3n de la concentraci3n de gp160 membranal de las c3lulas en cultivo se puede deber a una inhibici3n de la s3ntesis proteica. Con el fin

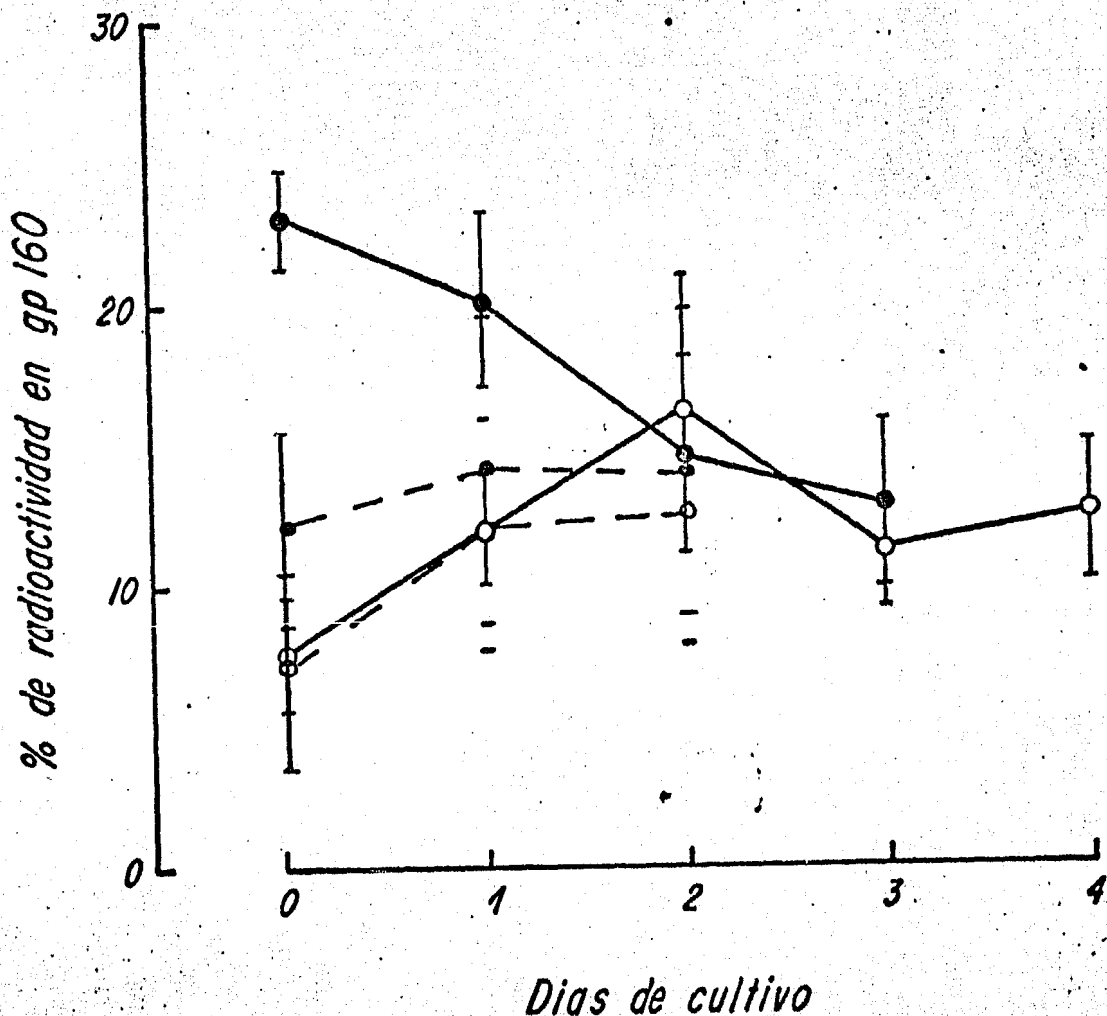


Fig. 2. Cinética de la cantidad de gp160 membranal expresada en células LPC-1 cultivadas por 72 hrs. Se midió la cantidad de gp160 en la superficie de células tardías y de células tardías tripsinizadas a intervalos de 24 hrs, tomando cada vez 5×10^6 células que se marcaron con ^{125}I y se sometieron a una electroforesis de poliacrilamida DSS. La marca se cuantificó en cada rebanada de gel y el porcentaje de marca incorporada a gp160 se calculó en base al total (100%) de cuentas del gel completo.

- LPC-1 tardías (11 días)
- LPC-1 tardías tripsinizadas
- LPC-1 tempranas (3 días)
- LPC-1 tempranas tripsinizadas

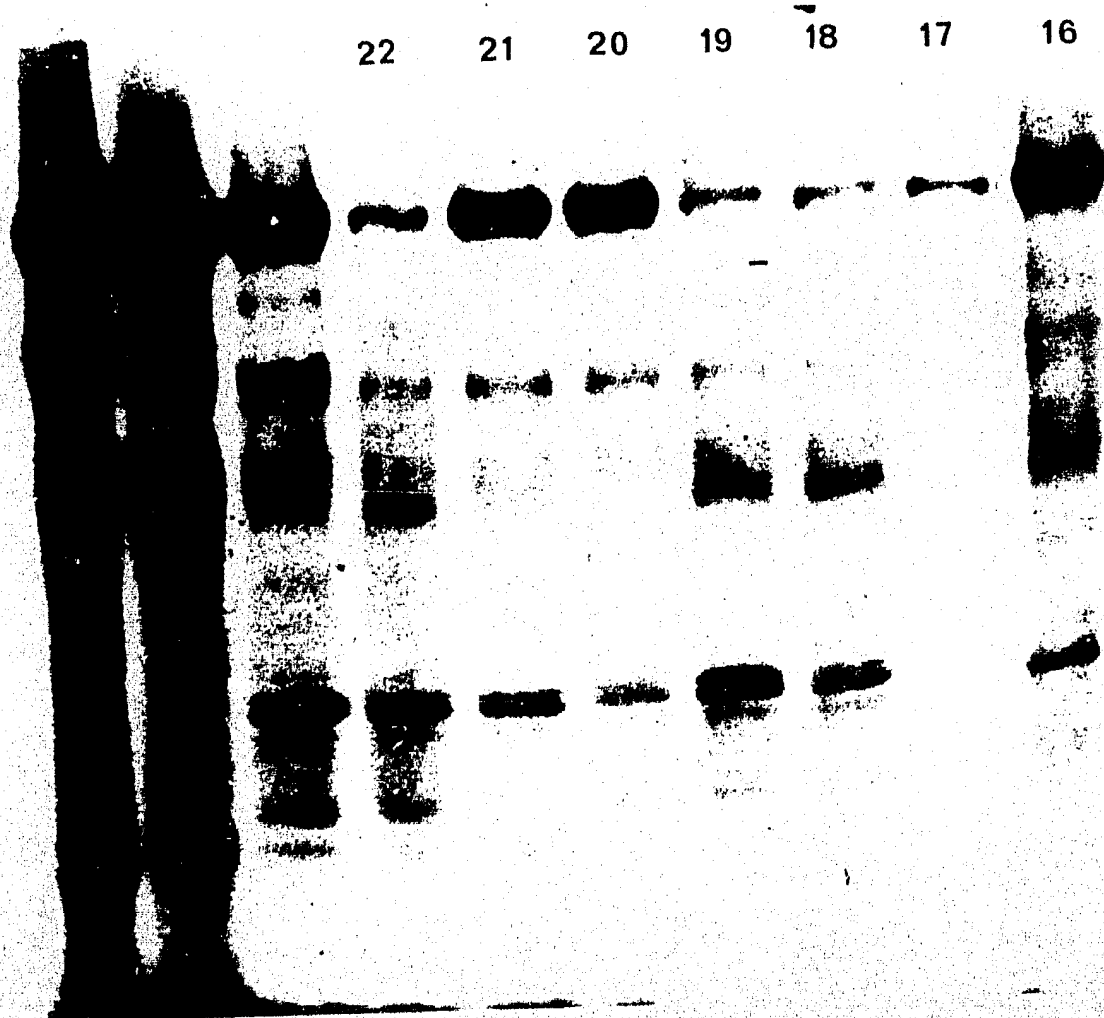
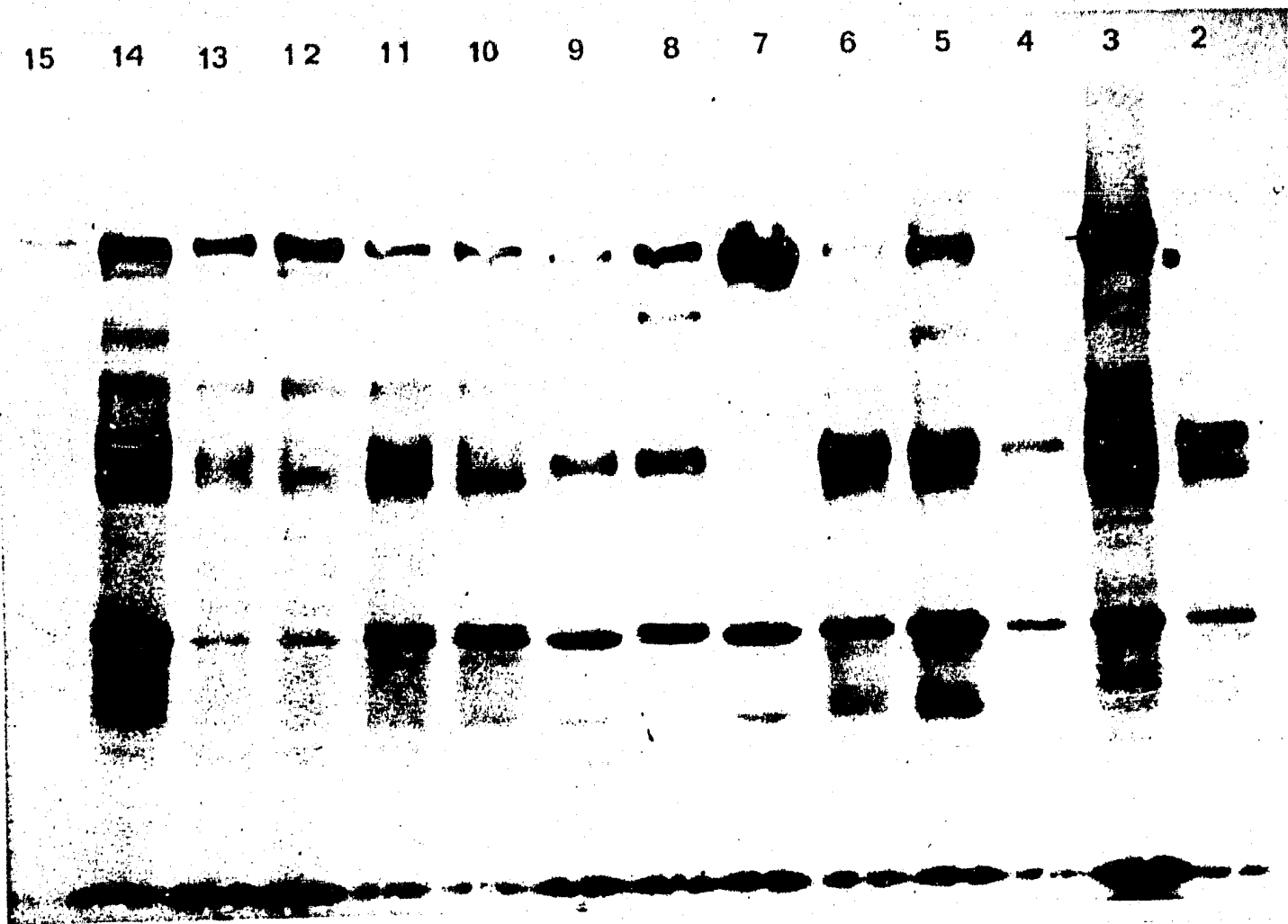


Fig. 3. Extractos de células LPC-1 tempranas (3 días) y tardías (11 días) marcadas con NaB^3H_4 en los residuos de ácido siálico y de galactosa. Las células se cultivaron por tres días y cada 24 hrs se marcaron 5×10^6 células cuyos extractos celulares se corrieron en electroforesis. (Datos cuantitativos: Tabla 1).

	0		24 hrs		48 hrs	
	Gal	NaNa	Gal	NaNa	Gal	NaNa
Células tempranas	ND	2*	9	11	17	19
Células tempranas trip.	1	3	10	12	18	20
Células tardías	4	6	13	15	21	ND
Células tardías trip.	5	7	14	16	ND	22

*# de carril

TABLA I. CANTIDAD DE gpl60 DE EXTRACTOS CELULARES MARCADOS CON DIFERENTES ISOTOPOS (EN CADA CASO EL 100% CORRESPONDE A LA CANTIDAD DE gpl60 DE CELULAS TARDIAS)

Isótopos	Tipo de célula	Tiempo de cultivo					
		0 h		24 hrs		48 hrs	
		N (a)	T (b)	N	T	N	T
^{125}I	Tempranas (3 d)	51.8%	29.52%	61.59%	55.31%	59.86%	53.97%
	Tardías (11 d)	100%	32.16%	86.73%	52.23%	62.63%	69.48%
NaB^3H_4 Acido siálico (c)	Tempranas (3 d)	46.58%	11.66%	34.49%	28.73%	113.37%	99.05%
	Tardías (10 d)	100%	28.86%	66.7%	43.1%	N.D.	84.55%
Galactosa (d)	Tempranas (3 d)		34.9%	100%	69.54%	88.39%	83.68%
	Tardías (10 d)	100%	52.04%	137.5%	155.85%	113.42%	N.D.

(a) Células normales

(b) Células tripsinizadas

(c) Carriles 2,3,6,7; 11,12,15,16; 19,20 y 22 de la Fig. 3

(d) Carriles 1,4,5; 9,10,13,14; 17,18,21 de la Fig. 3

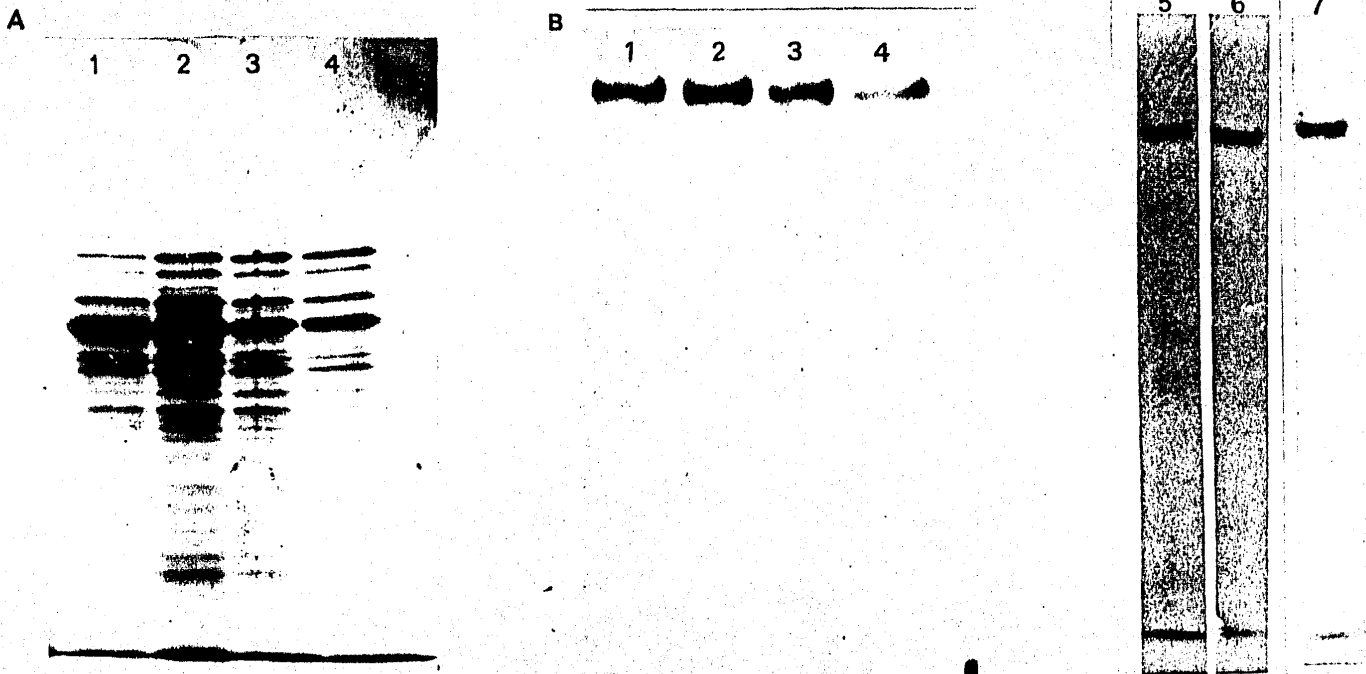
de estudiar si las células tumorales continúan sintetizando gp160 en cultivo se hicieron experimentos en los cuales se marcan metabólicamente células LPC-1 con ^3H -azúcares o una mezcla de ^{14}C -aminoácidos, aislando en este último caso gp160 por inmunoprecipitación.

En la figura 4 se muestran los perfiles electroforéticos de células cultivadas durante 18 y 24 hrs en presencia de ^3H -galactosa o una mezcla de ^{14}C -aminoácidos. Gp160 es la glicoproteína que mayor cantidad de marca incorpora tanto después de 18 como de 24 hrs, lo cual demuestra que la síntesis peptídica y la glicosilación proteica siguen activas en las células LPC-1 cultivadas.

Por otra parte se hicieron incubaciones de las células neoplásicas con el azúcar radioactivo a 3,6,9,18 y 24 hrs con el fin de obtener una cinética de glicosilación de las células LPC-1 en cultivo.

Los resultados obtenidos de extractos de células muestran que después de 3 hrs de cultivo en presencia de ^3H -galactosa, el 18% de la marca se encuentra en una glicoproteína que comigra a la altura de gp160. Este porcentaje aumenta progresivamente hasta alcanzar un valor constante, alrededor de 38% a las 6 hrs de cultivo, manteniéndose constante hasta las 24 hrs (Fig.5).

Con el objeto de conocer la composición de carbohidratos de gp160 se incubaron las células tumorales con otros azúcares radioactivos como la ^3H -fucosa, la ^3H -glucosamina y la ^3H -manosamina. Los resultados de estos experimentos se muestran en las siguientes figuras. Las figuras 6 y 7 muestran las autoradiografías de las glicoproteínas marcadas, al incubar células LPC-1 con -



Area correspondiente a gp160 (%)

18 hrs	24 hrs
60.53	56.15
57.17	37.52
\bar{x} : 58.85 \pm 2.37	46.83 \pm 13.17

Fig. 4. Perfil electroforético de extractos de células LPC-1 de 11 días cultivadas en presencia de ^3H -gal. 5×10^6 células se cultivaron con 5 uCi de ^3H -gal. A) Tinción con azul de Coomasie, B) Autorradiografía; Las células se incubaron 18 hrs (carriles 1 y 2) y 24 hrs (carriles 3 y 4). Carriles 5, 6 Immunoprecipitados del extracto de células LPC-1 marcadas con una mezcla de ^{14}C -aminoácidos. Carril 7: control de células LPC-1 marcadas con NaB^3H_4 .

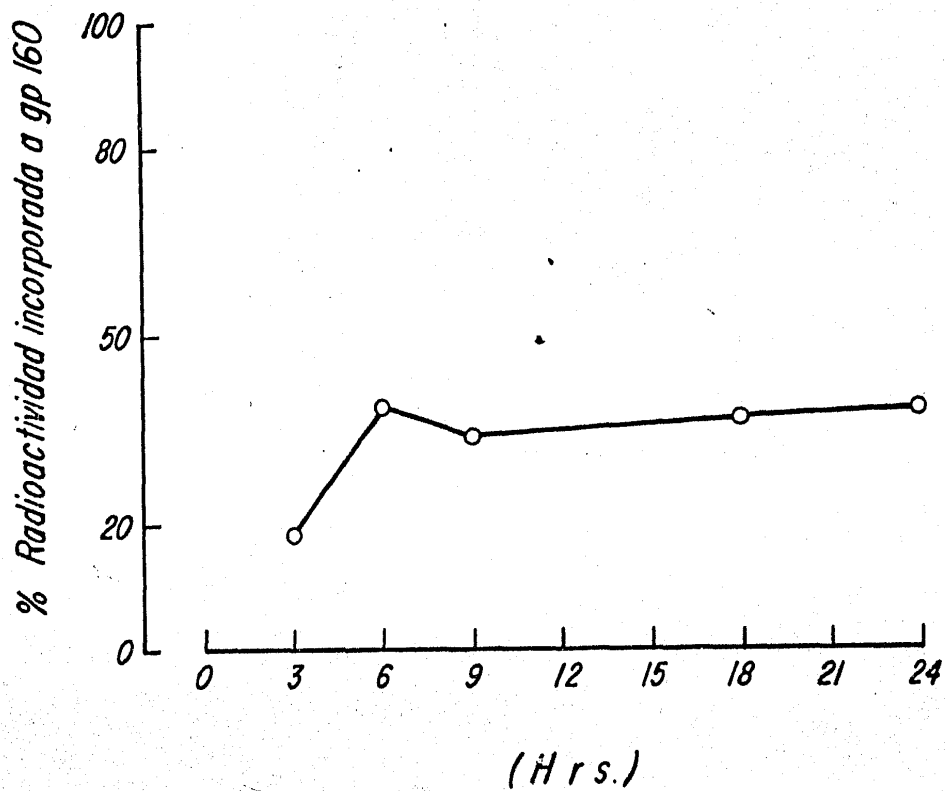


Fig. 5. Marcaje metabólico de gp160 con ^3H -gal. Células LPC-1 (13 días) se incubaron en presencia de 5 uCi de ^3H -gal y se sacaron 5×10^6 células a intervalos de 3 hrs. Los extractos celulares en NP-40 al 0.5% se corrieron en geles de poliacrilamida SDS al 10% y se cuantificó gp160 por densitometría.
 o—o Células cultivadas con ^3H -gal.



Fig. 6. Perfil electroforético de extractos celulares marcados con ^3H -gal, y ^3H -glcNac. Células marcadas con NaB^3H_4 en ácido siálico (carril:1); Células LPC-1 incubadas durante 3, 6, 9, 18 y 24 hrs. con ^3H -gal (carriles: 2, 3, 4, 5, 6); Células LPC-1 cultivadas por 6 y 9 hrs con ^3H -glcNac (carriles: 9, 10).

³H-glucosamina y ³H-fucosa. La ³H-glucosamina es bien incorporada a las células desde las primeras horas y utilizada en la síntesis de gp160 (3,6 hrs), mientras que solo se encuentra marca de ³H-fucosa a las 18 y 24 hrs de incubación, en unas glicoproteínas de menor peso molecular al de gp160 (Fig.7). La ³H-manosamina no se incorpora a glicoproteínas celulares en los tiempos y concentraciones experimentados.

4. Estimulación de la biosíntesis de gp160 in vitro:

Las condiciones de cultivo provocan que las células tardías reviertan su fenotipo a células tempranas, es decir con bajos niveles de gp160. Con el fin de probar si la síntesis de gp160 puede ser estimulada in vitro, se suplementó el medio de cultivo con líquido de ascitis o con células de bazo de los animales con o sin tumor.

En la figura 8 se observa que el líquido de ascitis no tiene ningún efecto apreciable sobre el aumento o disminución de la cantidad de esta glicoproteína en la superficie celular. La concentración de gp160 expresada en la superficie de las células LPC-1 después de 48 hrs en presencia de líquido de ascitis es del 17%, o sea similar a la que se encuentra en la superficie de las células que fueron previamente tratadas con tripsina (15%), o simplemente puestas en cultivo solas.

En las células cocultivadas durante 3 días en presencia de células de bazo de ratón normal o portador del tumor, se observa que la cantidad de gp160 aumenta hasta alcanzar aproximadamente la mitad de lo que tenían las mismas células, en el momento en que se obtuvieron del ratón. En cambio, la concentración de gp160 membranal de las células LPC-1 cultivadas solo en medio de

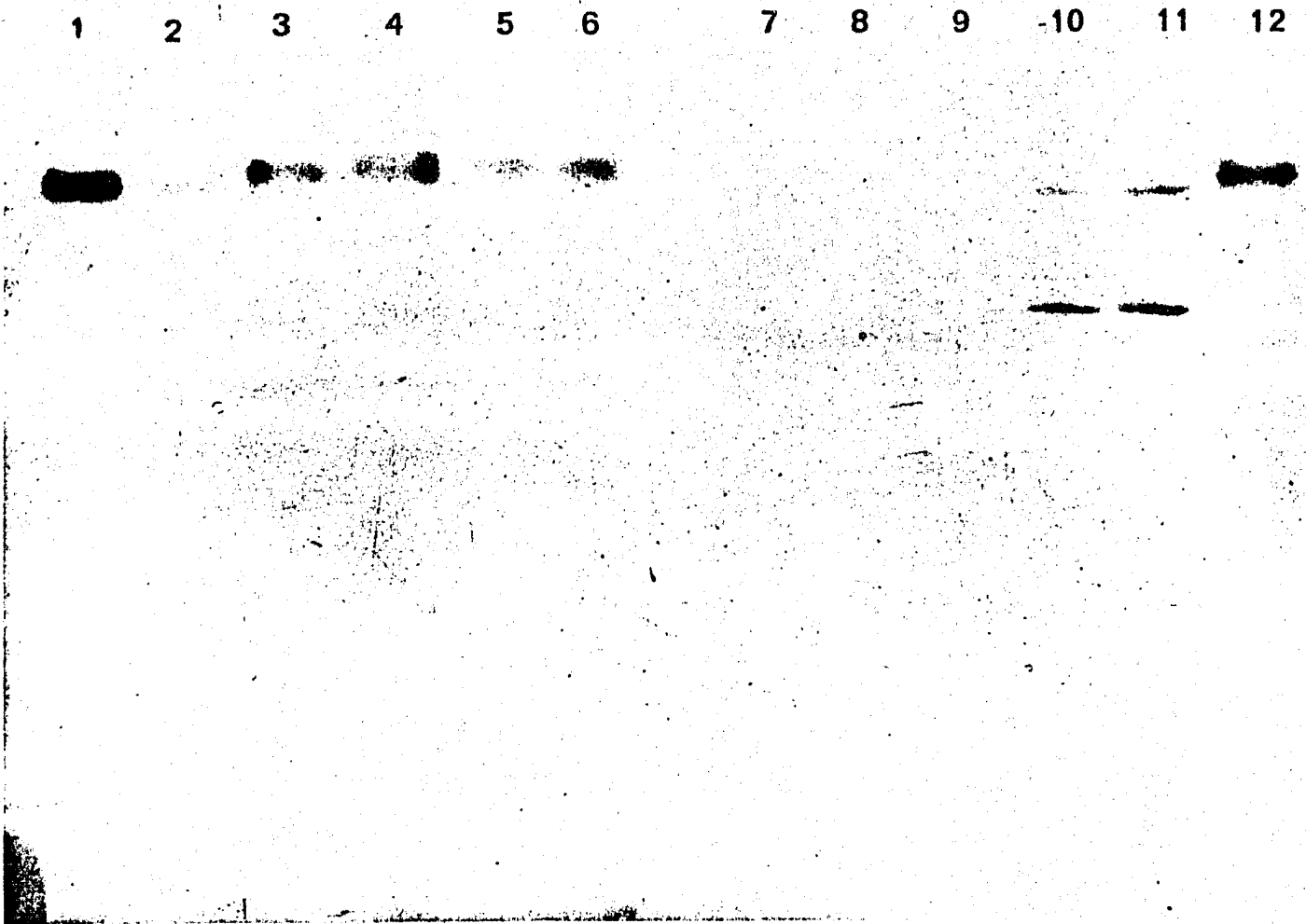


Fig. 7. Perfil electroforético de extractos de células LPC-1 --
 marcadas con ^3H -gal y ^3H -fuc: Células marcadas con --
 NaB^3H_4 en ácido siálico (carriles 1 y 12); Células incu-
 badas 3, 6, 9, 18 y 24 hrs respectivamente con ^3H -gal --
 (carriles 2, 3, 4, 5, 6) y con ^3H -fuc (carriles 7, 8, 9,
 10,11).

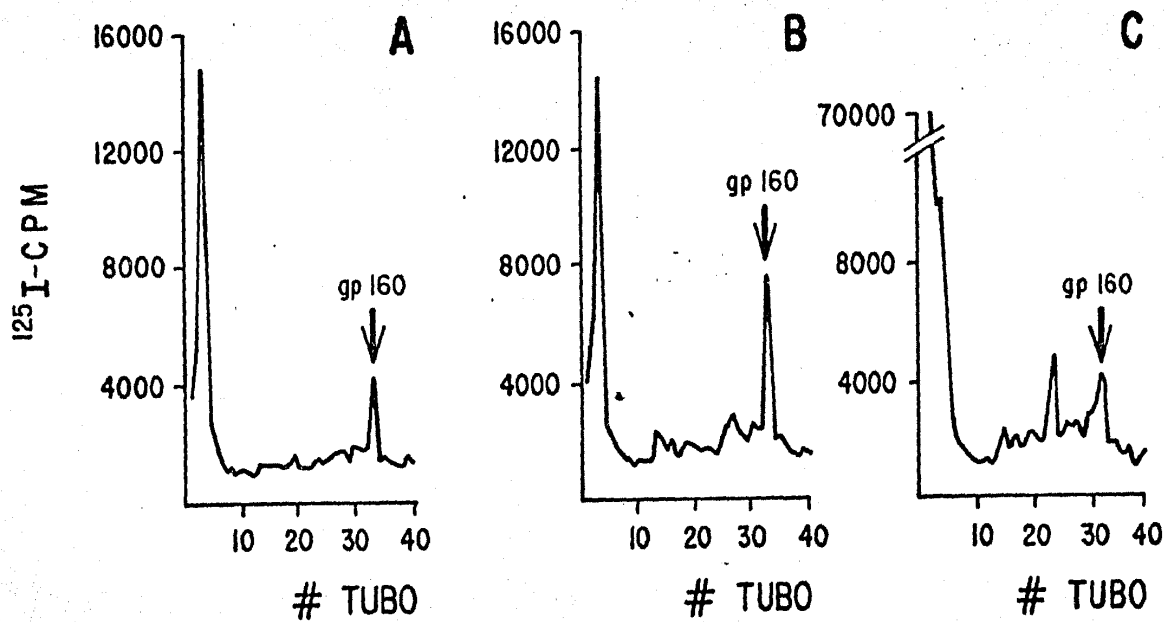


Fig. 8. Efecto del líquido de ascitis sobre la expresión de gp160 de células LPC-1 en cultivo. Células LPC-1 (11 días) se cultivaron en presencia de 10% de líquido de ascitis, se iodinaron a las 48 hrs de cultivo y se cuantificó la marca incorporada a gp160. A) Células tardías, B) Células tardías tratadas con tripsina antes de cultivar, C) Células tardías cultivadas con -- líquido de ascitis.

cultivo durante 72 hrs disminuyó hasta llegar al 10% de la cantidad original (Fig. 9a y 9b).

5. Susceptibilidad a la lisis mediada por anticuerpos anti-H-2 y complemento de células LPC-1 co-cultivadas en presencia de células de bazo:

En base a lo anterior se hizo un ensayo de citotoxicidad mediado por anticuerpos anti H-2^d y complemento, en el que se probó la capacidad de células cultivadas durante 48 hrs en presencia y en ausencia de células de bazo a resistir a la lisis inmune. Como control se usó el mieloma AgX63 (H-2^d) el cual, es susceptible a la lisis por anticuerpos anti H-2^d y complemento.

En la figura 10 se observa que las células tumorales que fueron cultivadas en presencia de células de bazo muestran una leve resistencia a la lisis por anticuerpos anti H-2^d y complemento, a partir de la dilución 1/200 del anticuerpo. En el punto 1/400 se observa que la lisis de las células neoplásicas cultivadas solas así como las células AgX63 tienen un 35% de lisis, mientras que las que son cultivadas en presencia de células de bazo son más resistentes: dan un 18% de lisis específica. Esta proporción se mantiene en las siguientes diluciones del anticuerpo.

6. Estudios sobre la síntesis de inmunoglobulinas (Ig) en células LPC-1 y Litton y su posible relación con la expresión de gp160:

Se ha propuesto la intervención de algunas moléculas de superficie tales como PC-1 en la secreción de Ig. (Goding, 1982). En base a esto y al

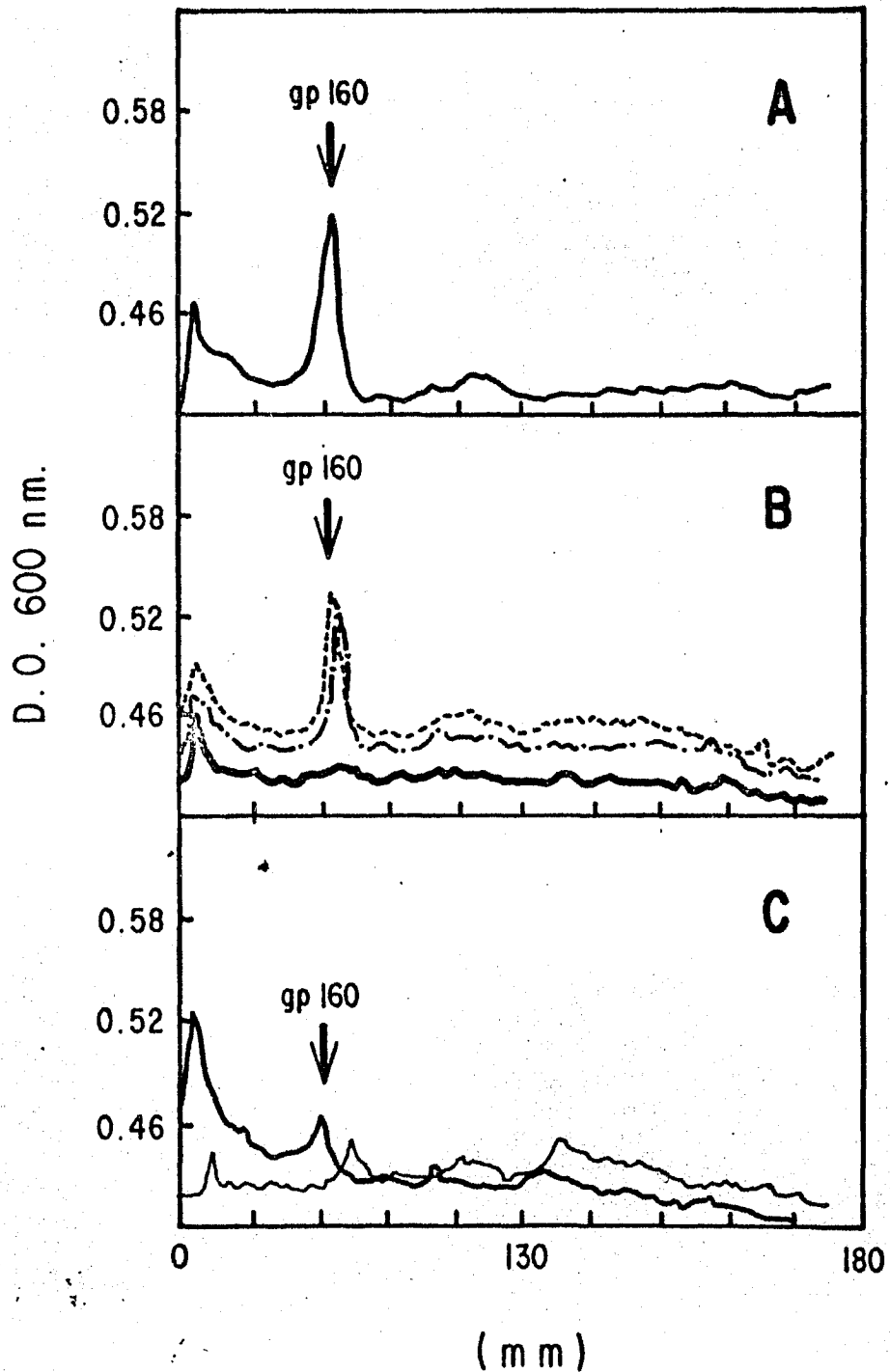


Fig. 9. Densitometría de las autorradiografías de los perfiles electroforéticos de extractos de células LPC-1 cultivadas con o sin células de bazo. A) Células cultivadas 24 hrs y marcadas con ^{125}I ; B) Células cultivadas por 3 días — so-las; ---- en presencia de células de bazo del animal con tumor; -.-.- de células de bazo normal; C) Perfil electroforético de las células de bazo marcadas con ^{125}I , — células de bazo normal; ---- células de bazo del animal con tumor.

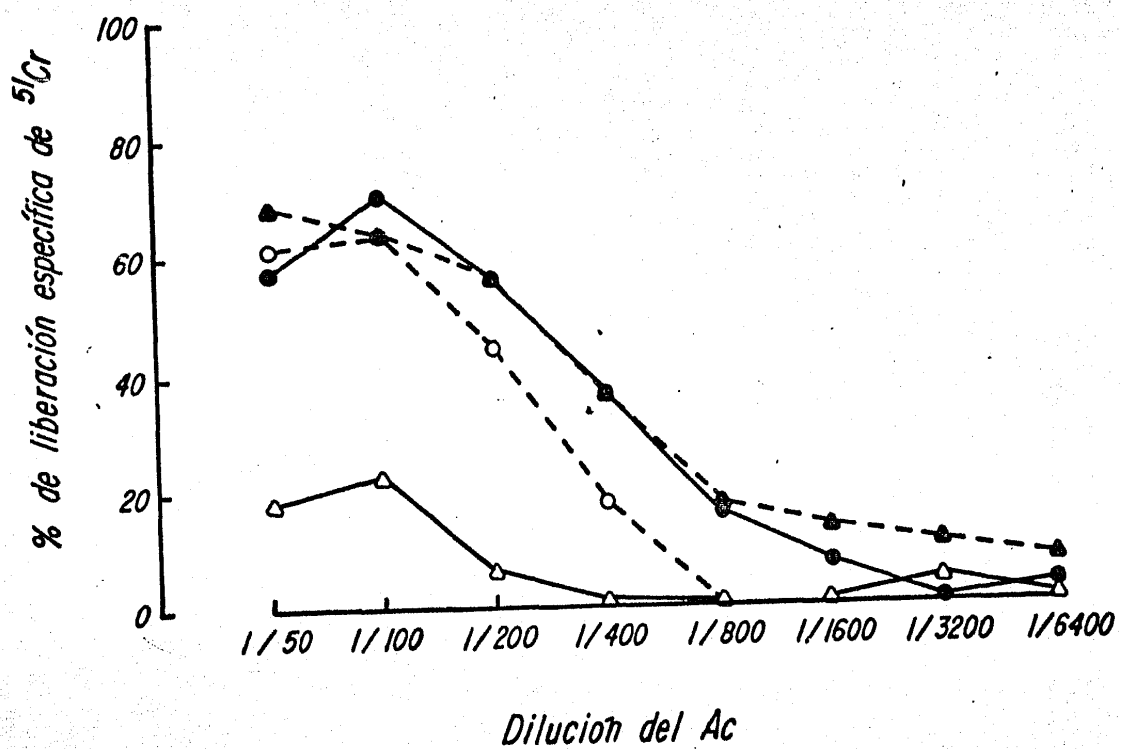


Fig. 10. Susceptibilidad a la lisis por anticuerpos anti H-2^d:
 o - - - LPC-1 (11 días) cultivadas en presencia de células de bazo
 ▲ - - - LPC-1 (11 días) cultivadas 48 hrs
 ● - - - Células Ag x 63
 △ - - - Células de bazo

hecho de que las células LPC-1 han perdido la capacidad de secretar Ig, pero no de sintetizar PC-1, mientras que la línea Litton continúa secretando Ig se pensó en alguna correlación entre la expresión de gp160 y la pérdida de la capacidad de sintetizar moléculas de IgG_{2k}.

Se comparó la capacidad de las células LPC-1 y Litton de secretar al medio de cultivo Ig o cadenas de Ig marcadas con ³⁵S-met, con la expresión de gp160 en la membrana de ambos tipos celulares.

Los resultados (Fig.11) muestran que tanto las células LPC-1 como Litton secretan cadenas pesadas y ligeras de IgG, al medio de cultivo. En el sobrenadante de células Litton el 42% del total de cuentas radioactivas inmunoprecipitadas corresponden a moléculas de IgG completas y un 7% a cadenas ligeras. En células LPC-1 tempranas no se detecta secreción de moléculas de IgG completas y en células LPC-1 tardías solo hay un 10% de moléculas completas y un exceso de cadenas ligeras.

Por otra parte tanto LPC-1 como Litton producen gp160, lo cual puede implicar que no habría una relación directa entre la pérdida de la capacidad secretora de IgG por células LPC-1 y la síntesis de gp160.

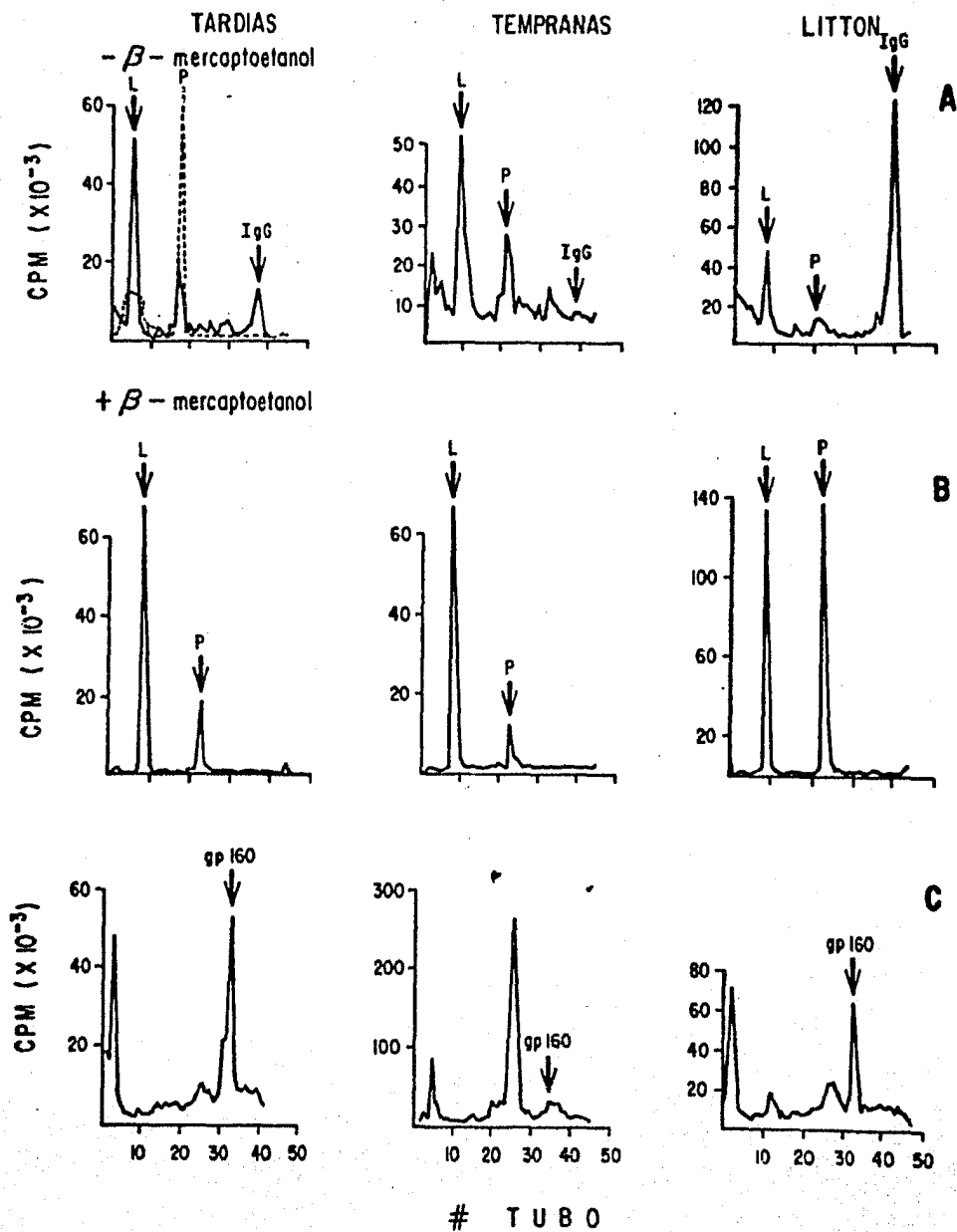


Fig. 11. Correlación entre la síntesis y la secreción de IgG y la síntesis de gp160: A) Perfil electroforético, obtenido en condiciones no reductoras, del sobrenadante de células marcadas con ^{35}S -met e inmunoprecipitadas con IgG de conejo anti IgG de ratón (●—●) ^{35}S -IgG; como marcadores de peso molecular se usaron las cadenas pesadas y ligeras de ^{125}I -IgG de conejo (---); B) Perfil electroforético de los inmunoprecipitados, en condiciones reductoras; C) Perfil electroforético de las membranas celulares marcadas con ^{125}I .

DISCUSION

Las alteraciones en las glicoproteínas membranales de células neoplásicas es un fenómeno general (Atkinson, 1980), aunque, a pesar de los numerosos estudios bioquímicos y de biología celular no ha sido posible encontrar una tendencia definida en los cambios observados. Entre estos cambios, se ha reportado la capacidad que tienen ciertas células tumorales de producir glicoproteínas que enmascaran a los antígenos de superficie necesarios para que la destrucción inmune se lleva a cabo. Además de gp160 se han reportado otras dos glicoproteínas involucradas en la evasión de la respuesta inmune por el enmascaramiento de antígenos de superficie. Una de ellas es la epiglicanina que se encuentra en células de un adenocarcinoma mamario denominado TA-3 (Codington, 1975, 1981) y la otra que es una glicoproteína encontrada en el plasmocitoma 58-8 que crece en ratones BALB/c (Tokuyama, 1978). En el caso de estas dos glicoproteínas, a diferencia de gp160, su concentración membranal aumenta después de cada trasplante (Codington, 1981) y las células nunca revierten del fenotipo resistente a sensible.

La glicoproteína encontrada en las células del plasmocitoma 58-8 pesa alrededor de 120 000 daltones y aún no se sabe mucho sobre su biosíntesis ni sobre su composición bioquímica. La epiglicanina es una glicoproteína de 500 000 daltones que está compuesta de los siguientes carbohidratos: N-acetilgalactosamina, galactosa, N-acetilglucosamina, ácido siálico y manosa (Codington, 1975).

Gp-160 es una glicoproteína que no contiene residuos de fucosa. Esto se observó al marcar metabólicamente las células LPC-1 con este azúcar; ya

que solo se obtuvieron bandas radioactivas de menor peso molecular al de gp160 en el electroferograma. La fucosa no es metabolizada para dar lugar a otros carbohidratos (Sturgess, 1973; Schachter, 1978), por lo que si gp160 no aparece radioactiva, al marcar las células con ^3H -fucosa, es probable que no haya residuos de fucosa dentro de la molécula.

Gp160 es una glicoproteína rica en ácido siálico (entre 25 y 40 residuos por molécula de gp160, Rosenstein, 1984), por lo que también se hicieron marcajes usando azúcares como la N-acetil-manosamina o la glucosamina para marcar a gp160. A pesar de que la N-acetil-manosamina es el precursor más cercano del ácido siálico (Kornfeld, 1980), las células LPC-1 no internalizaron el azúcar, en los tiempos tomados (3,6, y 9 hrs) y a la concentración probada (5 uCi). Esto se puede deber a algún defecto que tengan las células LPC-1 tardías en el mecanismo de reconocimiento y transporte de la N-acetil-manosamina o a que éste azúcar no lo obtiene del medio sino que la célula procesa la glucosamina u otro precursor para su obtención. Quizá habría que usar la manosa para observar si este azúcar es internalizado por la célula y se utiliza para la glicosilación de gp160. La glucosamina tampoco se convierte a otras hexosas aún cuando la administración de glucosamina radioactiva si provoca la aparición de marca en ácido siálico y glucosamina unidas a proteínas (Schachter, 1978). En los experimentos en los que se prueba la ^3H -glucosamina se observa que marca bien a gp160, lo cual implica ya sea que gp160 contiene en las cadenas de carbohidratos glucosamina, que la marca que se identifica está presente tanto en glucosamina como en ácido siálico o a que la glucosamina se metaboliza para formar el ácido siálico de gp160.

Los resultados obtenidos a partir de experimentos de marcaje metabólico usando ^3H -galactosa, muestran que gp160 es una glicoproteína que se sintetiza a una velocidad constante (Fig. 5). Estos datos concuerdan con las observaciones que hicieron Warren (1968) y Hughes (1972) en la línea L de fibroblastos y en las células TA-3 respectivamente: la síntesis de glicoproteínas es un proceso contínuo que sigue a una velocidad constante independientemente de la velocidad de división celular o de la cantidad de ácido siálico que se remueva de la superficie celular. Si las glicoproteínas recién sintetizadas son necesarias, se incorporan a la membrana celular si no, se metabolizan.

Si la velocidad de síntesis y de degradación de gp160 en la célula LPC-1 fuera constante, entonces la expresión de esta glicoproteína no cambiaría a lo largo del tiempo. Sin embargo estudiando la concentración membranal de gp160 en la superficie de las células obtenidas de ratones BALB/c a diferentes tiempos y marcadas con ^{125}I , se observa que en los primeros días el 18% de la proteína membranal total marcada corresponde a gp160 (estas células son susceptibles a la lisis por LTCs o por anticuerpos y complemento). Este porcentaje varía muy poco en los primeros días para después aumentar rápidamente en el décimo día, continuando así hasta alcanzar una concentración alrededor de 35% a los 14 días (día en el cual generalmente se mueren los ratones a causa del crecimiento desmesurado del mieloma Fig. 1). Este aumento en la concentración de gp160 en la superficie de células tardías podría deberse a que la velocidad de degradación disminuye o a que se secreta en menor cantidad al medio.

Sin embargo, las células LPC-1 tardías puestas en cultivo pierden progresivamente gp160. Gp160 corresponde al 23% del total de proteína marcada al inicio del cultivo (tiempo 0) y va disminuyendo hasta mantenerse a una concentración constante de alrededor de la mitad de la cantidad original presente al tiempo 0. Esta cantidad de gp160 es la que se encuentra en las células tempranas, que son susceptibles a la lisis inmune (Fig. 9, 10). Este fenómeno se observó tanto en las células tardías como en las células tempranas cultivadas, habiéndose una mayor variabilidad en los resultados de las células tempranas probablemente debida a la heterogeneidad de estas células.

Tomando en cuenta los resultados de los experimentos en los que se incubaron las células LPC-1 en presencia de ^3H -galactosa, en los que se muestra que la biosíntesis de gp160 es un proceso constante, se podría pensar que los cambios de concentración de gp160 en la membrana celular se deben a variaciones en la velocidad de degradación o de secreción de esta glicoproteína. En la figura 12 se muestra que gp160 es secretada al medio en forma completa aún después de 12 hrs de cultivo.

El aumento de la concentración de gp160 membranar que se observa en las células LPC-1 crecidas in vivo, se podría deber a un estímulo que inhibe la degradación o secreción de gp160 en el ratón y que, al no estar presente en los cultivos, provoca la disminución de la concentración membranar de gp160.

Buscando ese estímulo y debido a que se ha descrito que las células de bazo estimulado son capaces de inducir la expresión de ciertos antígenos de superficie (McNicholas et al, 1983) se incubaron las células LPC-1 en presen

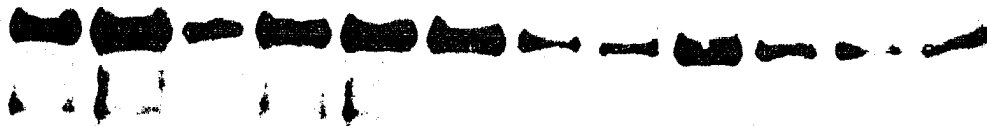
5

4

3

2

1



5

4

3

2

1

Fig. 12. Perfil electroforético de A) extractos de células LPC-1 marcadas con ^3H -galactosa durante 3, 6, 9, 18 y 24 hrs., B) sobrenadante de éstos cultivos. Carriles: 1. 3 hrs en cultivo, 2. 6 hrs en cultivo, 3. 9 hrs en cultivo, 4. 18 hrs en cultivo, 5. 24 hrs en cultivo.

cia de células de bazo y de líquido de ascitis esperando que el factor estimulante estuviera en alguno de éstos.

El líquido de ascitis no tuvo ningún efecto sobre la concentración de gp160 membranar de células LPC-1 en cultivo ya que esta disminuye siguiendo el mismo patrón que las células incubadas en medio solo (Fib. 8).

En cambio cuando las células LPC-1 se cultivan en presencia de células de bazo, gp160 se mantiene en la superficie de las células: síntesis de no vo o menor degradación? Este efecto se observa tanto utilizando células de bazo de ratón BALB/c normal como de uno portador del tumor LPC-1. Tal parece que en presencia de células de bazo, la velocidad de degradación o de secreción de gp160 de las células LPC-1 cultivadas disminuye. En base a esto y a los resultados anteriores (en los que se observa que la biosíntesis de gp160 es constante), se observa una acumulación de gp160 en la superficie celular (Fig. 8), resultante de una menor degradación y de una síntesis constante.

La concentración de gp160 obtenida por densitometría, de las células LPC-1 cocultivadas con células esplénicas es mayor que la concentración de gp160 en las células LPC-1 cultivadas en ausencia de éstas, que coincide con una leve resistencia de las células neoplásicas a la lisis por anticuerpos anti-H-2^d y complemento, aunque es probable que la cantidad de gp160 que las células LPC-1 acumularon en su superficie no corresponda al número óptimo de moléculas necesarias para conferir resistencia (Fib.10). Esto se puede deber a que el factor estimulante o inhibidor no se encuentre suficientemente

concentrado.

Por otra parte se trató de relacionar la falta de secreción de IgGs de las células LPC-1 con la expresión de gp160. Esta hipótesis estaba basada en el hecho propuesto por Goding (1982) que hay moléculas que podrían tener un papel en la secreción de Ig. Sin embargo, en el caso de las células Litton, se encontró que son capaces tanto de producir y secretar Igs como de sintetizar y acumular gp160 en su superficie, por lo cual no parece haber relación directa posible entre una función y otra.

La incapacidad de las células LPC-1 de ensamblar las cadenas de Ig se podría deber a que la célula solo comienza a formar IgG completa cuando alcanza cierta concentración de cadenas pesadas; mientras esto no suceda las cadenas ligeras de IgG se secretan al medio. También se puede deber a un defecto en el mecanismo de ensamble, debido a alteraciones en las cadenas de IgG (que no sean detectables por electroforesis o por el anticuerpo) o por algún error en la regulación del acoplamiento de IgG.

CONCLUSIONES

Las células del mieloma LPC-1 sintetizan una glicoproteína de membrana de 160 kd que les confiere una resistencia a la destrucción inmune.

Gp160 está siempre presente en la célula tumoral: empieza a concentrarse en la superficie celular del tumor después del décimo día de haber sido trasplantado el mieloma LPC-1. Por otro lado estas células tumorales pierden esta "sobreproducción" de gp160 cuando se colocan en cultivo. Estos cambios no se deben a cambios de la velocidad de síntesis ya que ésta se mantiene constante. Por lo tanto debe de haber algún estímulo que se encargue de regular la degradación o secreción de gp160 y que sea responsable de la acumulación de gp160 en la superficie celular.

Buscando ese estímulo y debido a que se ha descrito que células de bazo estimulado (McNicholas et al, 1983) son capaces de inducir la expresión de ciertos antígenos de superficie, se incubaron las células tumorales en presencia de células de bazo.

En presencia de células de bazo la concentración membranal de gp160 no baja tan rápidamente en comparación con los que se cultivaron en ausencia de células de bazo. Asimismo también se observa un ligero incremento en la resistencia a la destrucción inmune de las células tumorales incubadas con células de bazo. Queda por buscar realmente el factor responsable de la síntesis de gp160. Quizá es algún factor que produce el bazo que tiene este efecto y que para poder ser observado tenga que estar concentrado o siendo secretado al medio en donde se encuentra la célula LPC-1.

BIBLIOGRAFIA

- Abelev, G.I., (1971) Alpha fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors. *Adv. Cancer Res.* 14: 295.
- Acuto, O., Hussey, R.E., Fitzgerald, K.A., Protentis, J.P., Mever, S.C., Schlossman, S.F., y Reinherz, E.L. (1983) The human T cell receptor: Appearance in ontogeny and biochemical relationship of α and β subunits on IL-2 dependent clones and T cells tumors. *Cell* 34: 717.
- Adams, D.O. y Marino, P.A. (1981) Evidence for a multistep mechanism of cytolysis by BCG-activated macrophages: the interrelationship between the capacity for cytolysis, target binding and secretion of cytolytic factor. *J. Immunol.* 126, 3: 981.
- Ahmed, A. y Smith, A.H. (1982) Surface markers, antigens and receptors on murine T and B cells: Part 1. *CRC Crit. Rev. Immunol.* June 1982: 331-369.
- Atkinson, P.H. y Hakini, J. (1980) Alterations in glycoproteins of the cell surface. *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans.* Ed. Lennarz, W.J. Plenum Press, N.Y. y Lond. pp. 191-239.
- Benacerraf, B., y Unanue, E.R. (1979) Tumor Immunity. *Textbook of Immunology*, Ed: Benacerraf, B., Unanue, E.R., Williams y Wilkins, Baltimore, Lond. p. 196.
- Bevan, M.J. y Fink, J.P. (1978) The influence of thymus H-2 antigens on the specificity of maturing killer and helper cells. *Immunol. Rev.* 42: 3.

- Boyse, E.A. y Old, L.J. (1969) Some aspects of normal and abnormal cell surface genetics. *Ann. Rev. Genet.* 3: 269.
- Burnet, F.M. (1970) The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* 13: 1.
- Burnet, F.M. (1971) Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant. Rev.* 7: 3.
- Celis, B., y Celis, E. (1983) Complement-mediated killing of myeloma tumor cells: differences in susceptibility to lysis by antibodies and complement are independent of antigen expression and antibody binding. *Immunology* 49: 321.
- Celis, E., Chang, T.W., y Eisen, H.N. (1979b) Cyclical changes in susceptibility of a myeloma tumor (LPC-1) to immune destruction. III Periodic production of a cell surface glycoprotein and changes in reactivity with cytotoxic T cells and anti H-2^d sera. *J. Immunol.* Vol. 122, No. 6: 2245.
- Celis, E., Hale, A.H., Russell, J.H. y Eisen, H.N. (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, No. 3: 954.
- Celis, E. y Eisen, H.N. (1980) Interactions between a novel surface glycoprotein and the H-2K and H-2 D antigens on myeloma tumor cells. *Eur. J. Immunol.* 10: 455.
- Codington, J.F. (1981) The masking of cancer cell surface antigens. *The Handbook of Cancer Immunology* Vol. 8: Tumor Antigens: Structure and Function. Ed. Harold Waters, Garland STPM Press, New York.

- Codington, J.F., Linsley, K.B., Jeanloz, R.W., Irimura, T. y Osawa, T. (1975) Immunochemical and chemical investigations of the structure of glycoprotein fragments obtained from epiglycanin, a glycoprotein at the surface of the TA-3Ha cancer cell. Carbohydr. Res. 40: 171.
- Coggin, J.H., y Anderson, N.G. (1974) Cancer, differentiation and embrionic antigens: some central problems. Adv. Cancer Res. 19: 105.
- Cullen, S.E. y Schwartz, B.D. (1976) An improved method for isolation of H-2 and Ia alloantigens with immunoprecipitation by protein A-bearing staphilococci. J. Immunol. 117: 136.
- Eisen, H.: Cell surface antigens: transfusion, transplantation and tumor immunity. Immunology 2nd. Ed. Eisen, H., Harper Row. Publishers, Philadelphia. . (1980).
- Esmon, N.L. y Little, J.R. (1976) Different mechanisms for the modulation of TL antigens on murine lymphoid cells. J. Immunol. 117: 919.
- Fast, L.D., Beatty, P., Hansen, J.A., y Newman, W. (1983) T cell nature and heterogeneity of recognition structures of human natural killer (NK) cells. J. Immunol. 131, 5: 2404.
- Fidler, I.J. (1975) Mechanisms of Cancer Invasion and Metastasis. En: Cancer Vol. 4: Biology of tumors: Surfaces, Immunology and Comparative Pathology. Ed. Becker, F.F., Plenum Press, N.Y., Lond. p: 101.
- Fidler, I.J., Darnell, J.H., y Budmen, M. B. (1976) In vitro activation of mouse macrophages by rat lymphocyte mediators. J. Immunol. 117,2: 666.

- Flowers, H. y Glick, M.C. (1980) Surface labeling of sialic acid residues in BHK cells and viral transformants. *Cancer Res.* 40: 1550.
- Gahmberg, C.G., Häyry, P., y Andersson, L.C. (1976) Characterization of surface glycoproteins of mouse lymphoid cells. *J. Cell. Biol.* 68: 642.
- Goding, J.W. y Shen, F.W. (1982) Structure of the murine plasma cell alloantigen PC-1: comparison with the receptor for transferrin. *J. Immun.* Vol. 129: No. 6: 2636.
- Gold, P. y Freedman, S.O. (1965) Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* 122: 467.
- Hale, A., Celis, E., Russell, J.H. y Eisen, H. (1979) Cyclical changes in susceptibility of a myeloma tumor (LPC-1) to immune destruction. II Periodic fluctuation during growth in normal and nude mice and in culture. *J. Immunol.* Vol. 122, No. 3: 959.
- Hellström, K.E., y Hellström, I. (1974) Lymphocyte-mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumor antigens. *Adv. Immunol.* 18: 209.
- Hellström, I., Hellström, K.E. y Sjörgen, H.O. (1970) Serum mediated inhibition of cellular immunity to methylcolantrene induced sarcomas. *Cell. Immunol.* 1: 18.
- Herberman, R.B. y Aoki, T. (1972) Immune and natural antibodies to syngeneic murine plasma cell tumors. *J. Exp. Med.* 136: 94.
- Herberman, R.B. y Holden, H.T. (1979a) Natural killer cells as antitumor effector cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 62: 441.

- Herberman, R.B., Sjeu, J.Y., Kay, D.H., Ortaldo, J.R., Riccardi, C., Bonnard, G.D., Holden, H.T., Fagnani, R., Santoli, A., y Puccetti, P. (1979b) Natural killer cells: characteristics and regulation of activity. *Immunol. Rev.* 44: 43-70.
- Hiserodt, J.C., Britvan, L. y Targan, S.R., (1983) Studies on the mechanism of the human natural killer cell lethal hit: analysis of the mechanism of protease inhibition of the lethal hit. *J. Immunol.* 131, 6: 2705.
- Hood, L., Steinmetz, M. y Malissen, B. (1983) Genes of the major histocompatibility complex of the mouse. *Ann. Rev. Immunol.* 1: 529.
- Howard, M.C. (1982) Antigen-induced B lymphocyte differentiation. *CRC Critical Reviews in Immunology.* 181. Feb:
- Hubbard, A.L. y Cohn, Z.A. (1976) Specific labels for cell surfaces. En: *Biochemical Analysis of Membranes.* Maddy, A. H. (Edit) Chapman and Hall, London. p. 427.
- Hughes, R.C., Sanford, B. y Jeanloz, R.W. (1972) Regeneration of the surface glycoproteins of a transplantable mouse tumor cell after treatment with neuraminidase. *PNAS. USA* 69, No. 4: 942.
- Johnson, W.J., Whisnant, C.C. y Adams, D.O. (1981) The binding of BCG-activated macrophages to tumor targets stimulates secretion of cytolytic factor. *J. Immunol.* 127, 5: 1787.
- Kappler, J., Kubo, R., Haskins, K., Hannum, C., Marrack, P., Pigeon, M., McIntyre, B., Allison, J. y Trowbridge, I.: The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells in mouse and man: Identification of constant and variable peptides. *Cell.* 35: 295.

- Klein, J. (1973) Immunological surveillance against neoplasia. Harvey Lect. 69: 71.
- Klein, J. (1979) The major histocompatibility complex of the mouse. Science 203, 9: 516.
- Klein, J., Juretic, A., Baxevanis, C.N., Nagy, Z.A. (1981) The traditional and a new version of the mouse H-2 complex. Nature 291: 455.
- Kornfeld, R. y Kornfeld, S. (1980) Structure of glycoproteins and their oligosaccharide units en The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, Ed. Lennarz, W.J., Plenum Press, N.Y. y Lond: p. 1.
- Marchalonis, J.J., Cone, R.E. y Sauter, V. (1971) Enzymatic iodination aprobe for accesible surface proteins of normal and neoplastic lymphocytes. Bioch. J. 124: 921.
- McKearn, J., Baum, C.H., Davie, J.M. (1984) Cell surface antigens expressed by subsets of pre-B cells and B cells. J. Immunol. 132, 1: 332.
- McKenzie, I.F., Potter, T. (1979) Murine lymphocyte surface antigens. Adv. Immunol. 27: 179.
- McNicholas, J.M., King, D. P. y Jones, P.P. (1983) Biosynthesis and expression of Ia and H-2 antigens on a macrophage cell line are stimulated by products of activated spleen cells. J. Immunol. 130, No. 1: 449.
- Melchers, F. (1970). Biosynthesis of the carbohydrate portion of immunoglobulins. Kinetics of synthesis and secretion of ³H leucine - ³H Galactose- and ³H Mannose-labelled myeloma protein by plasma cell tumours. Biochem. J. 119: 765.

- Melchers, F. (1971) Biosynthesis of the carbohydrate portion of immunoglobulin. Radiochemical and chemical analysis of the carbohydrate moieties of two myeloma proteins purified from different intracellular fractions of plasma cells. *Biochemistry*, 10 No. 4: 653.
- Muramatsu, T. y Nathenson, S.G. (1970) Studies on the carbohydrate portion of membrane-located mouse H-2 alloantigens. *Biochemistry* 9, No. 25: 4875.
- Natori, T., Law, L.W. y Appella, E. (1977) Biological and biochemical properties of nonidet-P40-solubilized and partially purified tumor specific antigens of the transplantation type from plasma membranes of a methylcolanthrene - induced sarcoma. *Cancer. Res.* 37: 3406.
- Old, L.J. y Boyse, E.A. (1965) Antigens of tumors and leukemias induced by viruses. *Fed. Proc.* 24: 1009.
- Ponten, J. (1975) Contact Inhibition. En: *Cancer 4: Biology of Tumors: Surfaces, Immunology and Comparative Pathology*. Ed. Frederick F., Becker, Plenum Press, New York and London. p: 55.
- Rosenstein, Y., Theelen, M., Sanchez, I., y Celis, E. (1984) Isolation, Purification and characterization of a plasmacytoma cell surface glycoprotein involved in the resistance of the tumor cell to immune destruction. *Sometido a J.N.C.I.*
- Russell, J.H., Ginns, L.C., Terres, G., Eisen, H.N. (1979) Tumor antigens as inappropriately expressed normal alloantigens. *PNAS* 122: 912.
- Schachter, H. (1978) Glycoprotein biosynthesis. En: *The Glycoconjugates*. Vol. II. Ed. Lennarz, W.J. Academic Press, N.Y. y Lond: p. 87.

- Schwartz, B.D. y Nathenson, S.G. (1971) Isolation of H-2 alloantigens solubilized by the detergent NP-40. *J. Immunol.* 107: 1363.
- Shearer, W.T., Gottlieb, C. y Kornfeld, S. (1977) Sialic acid masks antigenic sites on an antibody selected cell line. *J. Immunol.* 119: 614.
- Shearer, G.M. y Schmitt-Verhulst, A.M. (1977) Major histocompatibility complex restricted-cell-mediated immunity. *Adv. Immunol.* 25: 55.
- Shively, J.E. y Todd, C.W. (1981) The Assay and Structure of Carcinoembryonic Antigens. *The Handbook of Cancer Immunology. Vol. 8. Tumor Antigen: structure and function* Ed. Harold Waters, Garland STPM Press. New York.
- Shreffler, D.C. y David, S.C. (1975) The H-2 Major histocompatibility complex and the I immune response region: genetic variation, function and organization. *Adv. Immunol.* 20: 125.
- Soloski, M.J., Uhr, J.W., Flaherty, L., Vitetta, E.S. (1981) Qa-2, H-2K y H-2D alloantigens evolved from a common ancestral gene. *J. Exp. Med.* 153: 1080.
- Sturgess, J.M., Minaker, E., Mitranic, M.M. y Moscarello, M.A. (1973) The incorporation of L-fucose into glycoproteins in the golgi apparatus of rat liver and in serum. *Biochem. Biophys. Acta* 320: 123.
- Takahasi, T., Old, L.J. y Boyse, E.A. (1970) Surface alloantigens of plasma cells. *J. Exp. Med.* 131: 1325.
- Tokuyama, H., y Migitar, S. (1978) Cell surface major glycoprotein of BALB/c mouse plasmacytoma 58-8 cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 61: 203.

Tung, J.S. y Boyse, E.A. (1980) Biochemical comparison of PC-1 from neuronal cells and from B cells. Immunogenetics 11: 417.

Tung, J.S., Shen, F.W., Boyse, E.A. y Fléissner, E. (1978) Properties of the PC-1 Molecule. Immunogenetics 6: 101.

Van Beek, W.P., Smets, L.A., y Emelot, P. (1973) Increased sialic acid density in surface glycoprotein of transformed and malignant cells - a general phenomenon?. Cancer Res. 33: 2913.

Warren, L. y Glick, M.C. (1968) Membranes of animal cells. II The metabolism and turnover of the surface membrane. J. Cell Biol. 37: 729.

Zinkernagel, R.M., Althage, A., Callahan, G.M., Cooper, S., Klein, P.A. y Klein, J. (1978) On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: evidence for dual recognition? J. of Exp. Med. 147: 882.

Zinkernagel, R.M., Doherty, P.C. (1979) MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function and responsiveness. Adv. Immunol. 27: 51.