



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

E. N. E. P. ZARAGOZA

Efecto de la Respuesta Inmune Mediada por
Linfocitos T Citotoxicos In Vitro sobre el
Complejo Liposoma-H-2^d-gp160

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIATURA EN
QUIMICO FARMACOBIOLOGO
P R E S E N T A
IRMA JOSEFINA SANCHEZ VARGAS

MEXICO, D. F.

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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
INTRODUCCION	1
I. Características de las Celulas Tumorales	1
I.1. Carcinogenesis	3
II. Respuesta Inmune antitumoral	6
II.1. Complejo mayor de histocompatibilidad	6
II.2. Respuesta inmune antitumoral	10
III. Mecanismo de Escape de la Célula	20
IV. Antecedentes	22
OBJETIVOS	28
HIPOTESIS	29
MATERIALES Y METODOS	30
I. Métodos Generales	30
I.1 Animales	30
I.2 Líneas tumorales	31
I.3 Medios de cultivos para células	31
I.3.1 Medio C	31
I.3.2 Medio K	31
I.4 Radioionidación (^{125}I) de los componentes de la superficie celular	32
I.4.1 Marcaje de la superficie celular	32
I.4.2 Solubilización y obtención del extracto celular	33
I.4.3 Precipitación de proteínas celulares por TCA	33
I.5 Determinación de proteínas por el método de Lowry	34

	Página
I.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida- SDS	35
I.6.1 Tinción de Coomasie	36
I.6.2 Tinción de Schiff	36
I.6.3 Tinción de plata	36
I.6.4 Autorradiografía en placa de Rayos X	37
I.6.5 Transferencia a papel de nitrocelu- losa (EITB)	37
I.7 Purificación de membranas plasmáticas	38
II. Purificación de Antígenos H-2 ^d	40
II.1 Producción de suero hiperinmune anti-H-2 ^d	40
II.2 Ensayo de citotoxicidad con anticuerpos y complemento	41
II.3 Aislamiento de inmunoglobulinas por proteína A acoplada a Sepharosa 4B	42
II.4 Polimerización e inmovilización de proteínas	43
II.4.1 Formación de un polímero	43
II.4.2 Purificación de anticuerpos específicos	44
II.5 Purificación de antígenos H-2 ^d por cromatogra- fía de afinidad	45
II.5.1 Preparación de la columna inmunoadsor- bente	45
III. Purificación de la Glicoproteína Tumoral gp160	47
IV. Inducción de Linfocitos T Citotóxicos	48
IV.1 Estimulación <u>in vivo</u>	48
IV.2 Estimulación <u>in vitro</u>	48
IV.2.1 Estimulación primaria	48
IV.2.2 Estimulación secundaria	48
IV.3 Tratamiento de células estimuladoras con Mitomicina C	49
IV.4 Ensayo de citotoxicidad	49
V. Preparación del Complejo Liposoma-H-2 ^d -gp160	49
RESULTADOS	52
I. Purificación de Antígenos H-2 ^d	52
I.1 Especificidad del suero hiperinmune anti-H-2 ^d	52
I.2 Purificación de inmunoglobulinas anti-H-2 ^d	52
I.2.1 Por Sepharosa 4B- Proteína A	52
I.2.2 Por proteína inmovilizada (polímero)	52

	Página
I.3 Especificidad de las inmunoglobulinas purificadas	55
I.4 Purificación de antígenos H-2 ^d	55
II. Purificación de la Glicoproteína Tumoral gp160	60
III. Incorporación de gp160 y Antígenos H-2 ^d a liposomas	60
IV. Inducción de Linfocitos T Citotóxicos	65
IV.1 Tratamiento de las células tumorales con Mitomicina C	65
IV.2 Inducción de linfocitos T citotóxicos con liposomas	66
DISCUSION	71
I. Purificación de Antígenos H-2 ^d y gp160	71
II. Dosis/respuesta de LTCs generados por fracciones subcelulares	73
III. Incorporación de Antígenos H-2 ^d y gp160 a liposomas	74
IV. Inducción de una Respuesta de LTCs con Liposomas, Liposomas-H-2 ^d , liposomas H-2 ^d -gp160	75
ANEXO	80
I. Lista de Reactivos	80
II. Lista de Equipo	82
BIBLIOGRAFIA	83

LISTA DE ABREVIATURAS

Acido Tricloroacético	TCA
- Complejo Mayor de Histocompatibilidad	CMH
- Deoxicolato de Sodio	DOC Na
- Equivalentes celulares	ceq
- Inmunoglobulinas	Ig
- Lauril Sulfato de Sodio	SDS
- Linfocitos T citotóxicos	LTCs
- Nonidet-P40	NP 40
- Seroalbumina Bovina	SAB
- Solución Amortiguadora de Fosfatos	SAF
- Suero Fetal Bovino	SFB

INTRODUCCION

I. Características de las Células Tumorales

Una célula tumoral es una célula que adquiere la capacidad de escapar de los mecanismos de regulación, adquiriendo un potencial de crecimiento incoordinado y un alto grado de autonomía. El crecimiento exagerado de las células ocasiona la formación de masas celulares denominadas neoplasias, cuyo significado literal es crecimiento nuevo. La célula tumoral compite por los nutrientes y energía de la célula normal, ocasionando su muerte. Presentan cambios fenotípicos entre los cuales se incluyen: (66)

- A. Un menor o mayor grado de alteraciones morfológicas en su tamaño celular y nuclear. Estas alteraciones se traducen en la pérdida del fenómeno de inhibición por contacto, la posibilidad de ser introducidas y reproducidas indefinidamente en hospederos singénicos, ó de ser mantenidas en -- condiciones de cultivo apropiadas (crecimiento in vitro). Un ejemplo de esto son las células de ascitis de Ehrlich.

- B. Cambios membranales y antigénicos. La célula tumoral sufre alteraciones en su superficie celular, que incluyen - aparición de estructuras nuevas que se conocen como antígenos tumorales (Prehn, Floey, Main y Klein; 1960). Es-- tos cambios pueden ser de origen viral, o bien ser el resultado de una mutación producida por agentes químicos o

físicos o ser de origen embrionario.

- Los antígenos de origen viral son moléculas codificadas por genes del virus que se encuentran incorporados al genoma celular y son los mismos en cualquier tejido o tipo celular en el que aparecen.

- Los antígenos pueden ser modificados por alguna mutación inducida por agentes químicos ó físicos tales como compuestos inorgánicos que contienen cromatos, arsénico y níquel; hidrocarburos policíclicos; compuestos aromáticos, aminas, nitrosaminas, nitrosoureas, hidrazina, algunos antibióticos y aflatoxinas, así como radiaciones. Se cree que inicialmente estos compuestos no son carcinogénicos sino procarcinogénicos y que al entrar al organismo, por efecto de enzimas celulares o por la flora microbiana se vuelven carcinogénicos y tienen la capacidad de enlazar y alterar estructuralmente el DNA celular, siendo este el mecanismo central para inducir la transformación de la célula (66). Estos antígenos son característicos de cada tumor.

- Algunas formas tumorales como los carcinomas de hígado se caracterizan por presentar antígenos de origen embrionario que son macromoléculas que se expresan normalmente en el embrión y que no se reconocen como propias en el animal adulto debido a su desaparición antes del desarrollo del sistema inmune (10,22).

C. Cambios bioquímicos. La célula normal transformada sufre alteraciones bioquímicas en el metabolismo de la glucosa, que en condiciones aerobias o anaerobias produce lactatos en cantida-

des más altas que en una célula normal. También sufre -- cambios en su actividad enzimática, que incluye la elaboración de proteasas y glucosidasas que ayudan a la célula -- transformada a invadir otras células y tejidos y en la cantidad de glicosaminoglicanos y proteínas.

I.1 Carcinogenesis

Los mecanismos por los cuales la célula se vuelve cancerosa -- (carcinogenesis) no se conocen, pero existen dos teorías principales para explicarlo y sostienen que el desarrollo preclínico del cáncer incluyen una progresión de transformaciones dando lugar a subclonas de mayor malignidad. La primera de estas, la teoría de la mutación somática sostiene que los cambios genéticos somáticos son los responsables de la -- transformación y que el desarrollo de un fenotipo maligno es consecuencia de una serie de mutaciones somáticas que conducen primero a un moderado aumento en la velocidad de duplicación y finalmente a una pérdida completa del control de crecimiento. La segunda teoría propone la activación selectiva de genes y afirma que la transformación es ocasionada por una expresión inapropiada de genes normales. Esta teoría sostiene que el fenotipo transformado puede ser reversible.

El crecimiento del tumor podría involucrar una activación - secuencial de genes diferentes y las mutaciones somáticas serían un fenómeno incidental más que causal en el desarrollo de subclonas de gran malignidad (66).

Con el descubrimiento de los oncogenes se ha visto que ambos procesos son capaces de generar células transformadas. Inicialmente los oncogenes fueron definidos como elementos genéticos de los retrovirus que provocan una transformación maligna de las células del huésped y son de origen eucariótico. Se han encontrado en numerosos tumores experimentales y humanos la existencia de protooncogenes que son un homólogo celular de los oncogenes virales, con el potencial de convertirse en oncogenes. Actualmente se considera que los oncogenes no son realmente de origen viral, sino que son genes de la célula normal que pueden ser incorporados al genoma viral en el momento en que la célula infectada produce nuevos viriones, y solamente cuando los protooncogenes son alterados ligeramente en la célula normal o en el retrovirus se convierten en oncogenes capaces de transformar a una célula susceptible. Se ha visto, por otra parte, que la inserción de los oncogenes en el retrovirus parece inhibir la replicación de éste ya que pierde el gen que codifica a la enzima transcriptasa reversa (62).

Existen dos hipótesis para explicar la activación de los protooncogenes convirtiéndolos en oncogenes:

- Hipótesis de la dosis. Sugiere que la oncogénesis ocurre ya sea:
 - cuando los protooncogenes celulares se amplifican genéticamente,
 - cuando se transcriben a altas velocidades, influenciados por promotores o activadores que aumentan la actividad del

promotor,

- Cuando están involucrados un rearrreglo cromosomal o una de lección como por ejemplo la posición de los promotores trans cripcionales fuertes del retrovirus que se encuentran inser tados cerca del protooncogen en el DNA. La posición adecua da del promotor ocasionaría un aumento en los productos de los protooncogenes, convirtiéndolos en oncogenes.
- Hipótesis del producto modificado. Sugiere que la oncogene sis resulta de la expresión de genes anormales producidos - por una mutación puntual, y que codifican para una proteína modificada. De acuerdo con esta hipótesis puede haber dos - tipos de protooncogenes: los protooncogenes susceptibles a una activación no vírica (rearrreglo cromosomal, mutación pun tual, etc.) y los protooncogenes susceptibles a una activa-- ción vírica por oncogenes (ocurre cuando el protooncogen se asocia a una región regulatoria del genoma viral).

Ninguna de estas hipótesis explica como un número aparen-- temente reducido de genes puede desarrollar una multitud de cambios -- pleiotrópicos en la apariencia y actividad celular. Coinciden sin em-- bargo con la observación clínica de que ocurren desequilibrios metabó-- licos, como un resultado de la expresión genética defectuosa. La hipó-- tesis de la dosis refleja el agotamiento de uno o más compuestos regu-- latorios vitales y la hipótesis del producto modificado generalmente - describe enzimas insensibles a la regulación cuya actividad se refleja de la misma manera (62).

II. Respuesta Inmune Antitumoral

El concepto de que un organismo posee cierta inmunidad que le proporciona una defensa en contra de la aparición de células malignas fue propuesto inicialmente por Ehrlich en 1909 (14) con su teoría de la "vigilancia inmunológica". Esta teoría propone esencialmente que durante el curso de la vida de un individuo están surgiendo constantemente células malignas, que manifiestan antígenos específicos, las cuales por lo general son detectadas y destruidas por el sistema inmunológico.

II.1 Complejo mayor de histocompatibilidad

El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) ha despertado un gran interés dentro del campo de la inmunología durante los últimos años debido en parte al creciente número de funciones ligadas a la respuesta inmune que le han sido atribuidas (41,44,69). El CMH llamado HLA (Human Leukocytes Antigens) en el humano, localizado en el cromosoma 6 y H-2 en el ratón, localizado en el cromosoma 17 (Fig. 1).

El CMH es un conglomerado de genes que determinan fenómenos tales como:

- La expresión de moléculas de la superficie celular (antígenos mayores de histocompatibilidad o antígenos Clase I) ubicuitarias y responsables de la definición de un individuo.
- La regulación de la capacidad de la respuesta inmune y de la intensidad de ésta.

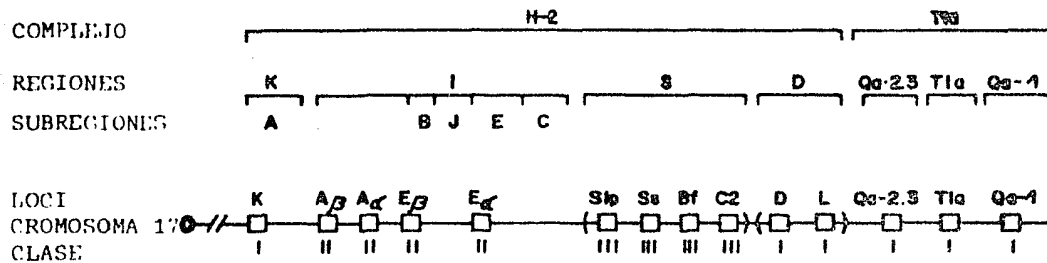


Fig. 1. Mapa genético del complejo H-2 del ratón localizado en el cromosoma 17. 0 representa el centrómero.

- La expresión de antígenos de superficie mediante los cuales las células involucradas en las complejas interacciones de la respuesta inmune modulan su efecto (antígenos Clase II).
- La producción de factores C2 y C4 y el factor B del complemento, así como de algunas enzimas (21-hidroxilasa).

Los genes del CMH se clasifican de la siguiente manera:

- Genes de la Clase I, que codifican para dos tipos de antígenos, los pertenecientes a las regiones K (H-2K), D (H-2D), L (H-2L) y los pertenecientes a las regiones Qa-2 y Tla. Los aloantígenos H-2K y H2D están presentes en la mayoría de las células del organismo y se encuentran codificados por genes extremadamente polimórficos, es decir que existe un gran número de distintas formas alélicas dentro de la misma especie. Son glicoproteínas membranales de 45 000 a 48 000 d que por lo general van asociadas en forma no covalente a una proteína de 12 000 d llamada -- beta-2-microglobulina (Fig. 2) (46,58,70,71).
- Genes de la Clase II, correspondientes a la región I del CMH -- que consta de 5 subregiones llamadas I-A, I-B, I-C, I-J e I-E (Fig. 2). Sus productos génicos son heterodímeros compuestos de una cadena alfa de 30 000 d y una cadena beta de 27 000 a -- 29 000 d. Estas moléculas están involucradas en la regulación de las funciones de las células T supresoras (Ts) y de ayuda -- (Th); y en el reconocimiento de un antígeno extraño en conjunto con la identificación de lo propio en la superficie de otras cé

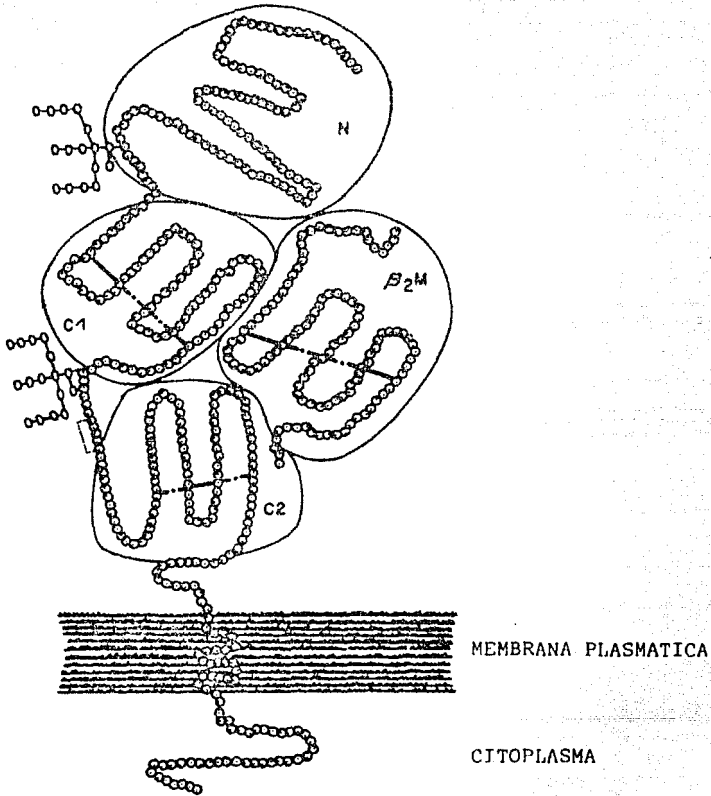


Fig. 2. Representación esquemática de los antígenos mayores de histocompatibilidad H-2, incluyendo la asociación con beta-2-microglobulina. En la molécula se consideran tres segmentos funcionales: el segmento extracelular (1-281), el segmento de unión a la membrana (282-308) y el segmento citoplasmático (309-346).

lulas T, macrófagos o células B (35,46).

- Genes de la Clase III, que codifican para algunos componentes del complemento (C4) y controlan la expresión de un marcador alotípico dependiente de la testosterona, presente en la proteína Ss (45,60).

II.2 Respuesta inmune celular antitumoral

En condiciones experimentales se ha podido demostrar que los antígenos tumorales son capaces de inducir una respuesta inmune -- celular que es llevada a cabo principalmente por células asesinas naturales (27), células asesinas (64), macrófagos activados (23), y linfocitos T citotóxicos (61).

Las células asesinas naturales (NKs) constituyen una población de las células linfoides con actividad citotóxica antitumoral independiente de anticuerpos y no restringida por antígenos de histocompatibilidad. Se caracterizan por carecer del antígeno de la superficie - Thy-1 de las células T y del receptor para inmunoglobulinas (Ig). Presentan macromoléculas de superficie como Ly6 y alonantígenos Qa-2. Se encuentran principalmente en el bazo y en la sangre, su actividad citotóxica puede aumentarse por interferón y por linfocinas principalmente IL2 (32,33).

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

Fc de las IgG y no requiere inmunización previa ni complemento (Fig. 3) (4,15).

Los macrófagos activados requieren de un proceso de activación para llevar a cabo su función citolítica. Este puede llevarse in vivo con estimulantes del sistema reticuloendotelial o in vitro con ciertas linfoquinas que ayudan a la actividad citotóxica y/o citolítica selectiva de los macrófagos en contra de ciertas células cancerosas. - Su actividad depende de la interacción de un factor lítico por el macrófago. Los macrófagos activados se diferencian de los macrófagos normales en que éstos presentan más receptores para el Fc de las inmunoglobulinas, su actividad microbiana también se encuentra aumentada así -- como su tamaño y su capacidad de diseminación (1,60,90).

Los linfocitos T citotóxicos (LTCs) son los responsables de la respuesta antitumoral más importante (59). Los LTCs son células -- efectoras con la capacidad de destruir otras células que manifiestan -- estructuras alteradas, ajenas o modificadas. Presentan aloantígenos -- membranales LyT 2, LyT 3, son sumamente específicas y solo lisan células -- semejantes a las que se utilizaron en su inducción (31).

La lisis celular por LTCs es el resultado de colisiones simples entre una célula efectora viable y una célula blanco, es una función lineal del tiempo de incidencia de la célula efectora. De los requerimientos metabólicos necesarios para que la célula efectora (LTCs) lleve a cabo su función lítica se conoce poco, algunos de estos requerimientos se enlistan en la Tabla I (31).

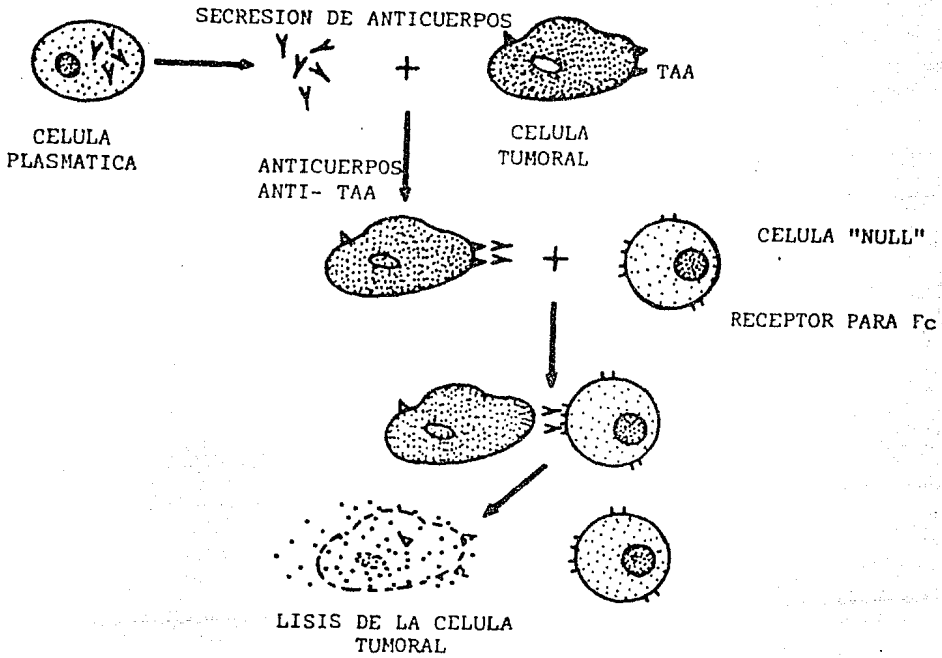


Fig. 3. Proceso de citólisis mediada por células dependientes de anticuerpos. Anticuerpos específicos secretados por células plasmáticas se unen al -- antígeno de la superficie celular de la célula tumoral (TAA). La célula "null" que tiene receptores para Fc enlaza a la porción Fc del anticuerpo que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

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

En la lisis por linfocitos T citotóxicos se reconocen tres etapas (Fig. 4):

I. Estado de reconocimiento y adhesión

Se le llama así a una serie de eventos encabezados por la adhesión de los LTCs a la célula blanco. Para que los LTCs se adhieran a la célula blanco reconocen específicamente a los antígenos virales u otros incluyendo haptenos sintéticos y a los antígenos de histocompatibilidad de la célula blanco (18,19,29,79). Este evento de reconocimiento es necesario para que se lleve a cabo la interacción célula efectora-célula blanco. Se han reportado dos modelos básicos para explicar esta especificidad denominada "restricción por CMH". El primero de estos propone un solo receptor de la célula T, que está dirigido -- contra moléculas codificadas por el CMH que ha sido modificado por su interacción física con los antígenos "extraños" de la célula blanco y se conoce como modelo del "yo modificado". El segundo modelo propone dos receptores para la célula T, uno para el antígeno "extraño" y otro para los productos del CMH y se le conoce como modelo del "receptor -- dual" (Fig. 5) (31).

TABLA I. REQUERIMIENTOS PARA LA CITOLISIS MEDIADA POR LTCs

Dependiente de	Independiente de
La viabilidad de la célula efectora.	La síntesis proteica, DNA o RNA
Del contacto célula efecto <u>ra</u> -célula blanco.	Anticuerpo
Un receptor de la célula T para el antígeno	Sistema de complemento
De una red de microfilamen <u>tos</u> y microtubulos de la célula efectora.	Síntesis de linfocinas
Cationes divalentes Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , glucosa	Metabolismo de la célula blanco
Los productos del MHC presentes en la célula blanco y linfocito	

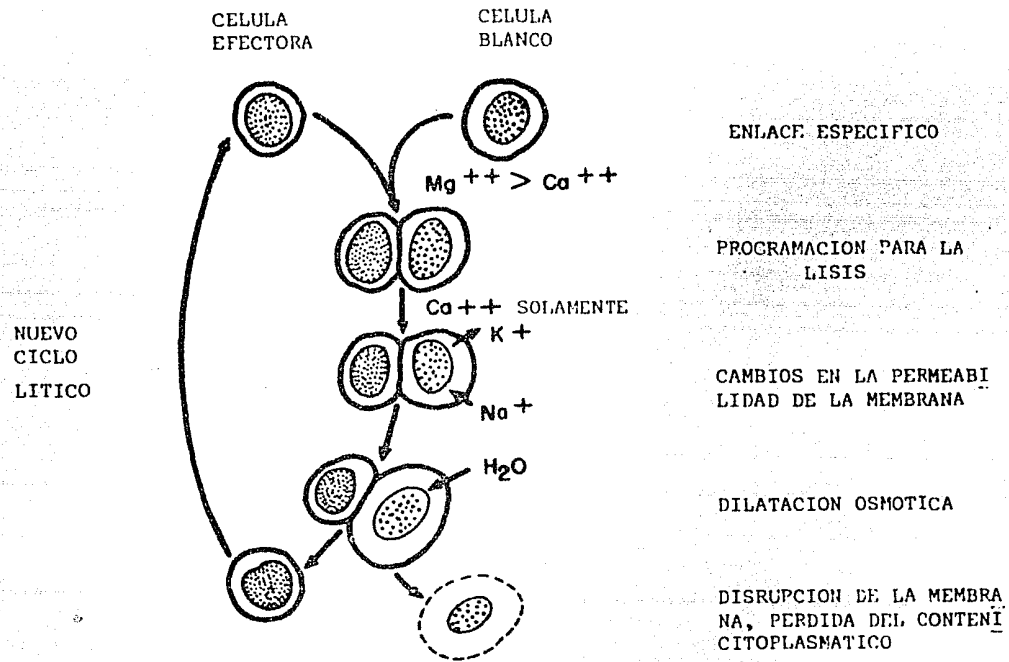


Fig. 4. Estados de la lisis celular de una célula blanco inducida por una célula T efectora.

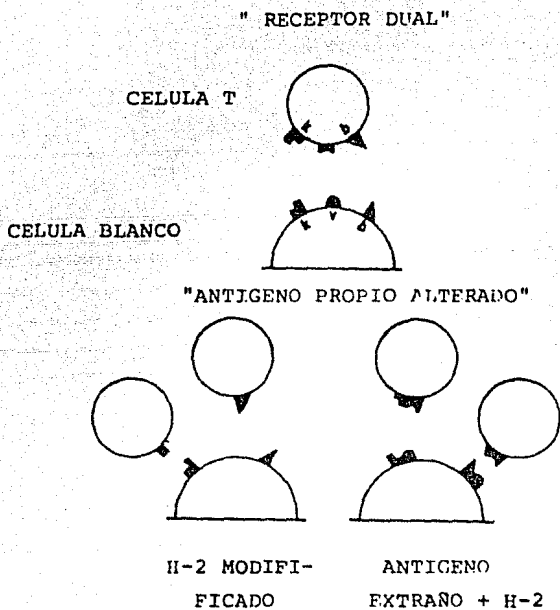


Fig. 5. Se postulan 2 modelos para explicar la interacción entre la célula T y la célula blanco. El modelo del "receptor dual" y el modelo del "yo alterado".

Los modelos parten de que la célula T citotóxica presenta un receptor que se ajusta específicamente al antígeno de la célula -- blanco, ocasionando el disparo de los procesos siguientes del ciclo -- lítico.

El proceso de adhesión es metabólicamente activo, es dependiente de la temperatura, se inhibe en presencia de azida de sodio, -- citocalasina B y colchicina, indicándonos tal vez un juego de algunas de las estructuras de microfilamentos y/o microtúbulos (63).

Recientes investigaciones han sugerido que la etapa de adhe sión célula-célula se divide en dos pasos (55):

- A. Paso independiente de cationes y sensible a citocalasina A y corresponde al reconocimiento celular.
- B. Un evento subsecuente dependiente de Mg^{2+} , que corresponde a un paso no específico, "reforzador" de la interacción -- célula-célula.

Esto lleva a la conclusión de que el receptor responsable -- del reconocimiento celular específico es débil o de baja afinidad y que sirve unicamente de "lectura" y no de enlace en la interacción célula-célula.

II. Programación para la lisis Y/o ataque letal

Es el siguiente paso al reconocimiento celular e incluye -- eventos dirigidos a la desintegración de la célula blanco. Esta etapa

se definió en base a resultados experimentales que mostraron que cuando se dejaban interaccionar a las células efectoras con las células blanco por solo 10 minutos, la inmediata remoción de las primeras ya no prevenían la lisis ulterior de las células blanco. Es decir que estas habían quedado programadas para una lisis subsecuente, proceso que toma varias horas y no requiere más de la presencia de los LTCs. Esta etapa es dependiente de Ca^{2+} , y se ha visto que un aumento en los niveles de AMPc (3',5'-monofosfato de adenosin cíclico) en el linfocito, durante esta etapa y la presencia de prostanglandinas principalmente E1 y E2, inhiben la citólisis (28,54,55).

Después de la adhesión específica entre célula efectora-célula blanco y concomitante a los eventos postacoplamiento de programación para la lisis, la célula efectora ejerce un efecto tóxico para la célula blanco, fenómeno conocido como Ataque Letal, que se caracteriza por ser unidireccional y localizado (47,78). El mecanismo de acción alérgica es prácticamente desconocido, pero se propone tres teorías para explicarlo:

- A. La primera de ellas, propone que se lleva a cabo mediante la secreción de factores solubles del tipo linfotoxina, que en su forma más compleja ocasiona la liberación de ciertos compuestos en forma inactiva por el linfocito T al momento de interaccionar con la célula blanco. Posteriormente estas moléculas procitotóxicas adquirirán su conformación activa al interaccionar con el complejo receptor-antígeno formado, destruyendo a la célula blanco en una forma polarizada. Aparentemente no es el caso, pues se -

ha demostrado que se puede abatir la actividad lítica de célula efectora sin alterar su capacidad de secretar media dores solubles (25,30).

B. La segunda, postula que a través de conexiones intercito-- plasmáticas entre la célula efectora y la célula blanco se establecerían canales de comunicación entre ambas sin contacto con el medio externo, por los cuales pasarían los -- componentes líticos (68,73). Sin embargo, este tipo de in ter con exi o ne s no han podido ser identificadas (5).

C. Por último, la tercera teoría postula la existencia de mecanismos que involucran moléculas citotóxicas enlazadas a la membrana. Estas moléculas adquirirían su posi ci o n acti va y orientada en la superficie de la membrana efectora, - justo en la zona de contacto específico con la célula blan co. Se ha postulado que podrían ser fosfolipasas (20), me til-transferasas y proteasas tipo tripsina producidas por la célula efectora. La evidencia más sugestiva e inespera da que apoya este modelo es la demostración de actividad - citotóxica mediada por membranas plasmáticas purificadas - de linfocitos T citotóxicos (Perluga et al., 1975).

III. Destrucción de la célula blanco

La destrucción de la célula blanco es la última etapa del - ciclo y es el resultado de la colisión de una célula efectora con una - célula blanco. Durante esta etapa la célula blanco sufre una serie de

cambios en la permeabilidad de su membrana que terminan con la ruptura de la membrana celular.

Inicialmente la lesión solo permite un rápido intercambio de iones inorgánicos y pequeñas moléculas, poco después tiene lugar la salida de macromoléculas como consecuencia de una regulación osmótica alterada (Martz et al., 1974). La destrucción final de la célula será ocasionada por las fuerzas osmóticas coloidales resultantes de la entrada de agua (29).

III. Mecanismos de Escape de las Células Tumorales

Las células tumorales utilizan diferentes tipos de mecanismos de escape, para descontrolar al sistema inmunológico del huésped y poder crecer, desarrollarse y diseminarse tales como:

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 específicos dirigidos contra ellas (43), ya sea desprendiéndolos en forma de complejos inmunes o internalizándolos (16). De esta manera, al disminuir o desaparecer los antígenos tumorales de su superficie, las células neoplásicas pueden evadir la respuesta inmune del huésped (Elitterswijk et al., 1975; Hilgers et al., 1980).

B. Desprendimiento antigénico

Ciertas neoplasias pueden desprender espontáneamente y en cantidades considerables antígenos tumorales de superficie al medio sin

requerir de interaccionar directamente con anticuerpos (13). Estos antígenos desprendidos tienen la capacidad de reaccionar con los LTCs y anticuerpos dirigidos en contra del tumor e inhibir su actividad lítica (11).

C. Otros factores séricos solubles

A partir de los primeros reportes indicativos de que el suero de huéspedes portadores de tumor bloqueaban la actividad de linfocitos T y anticuerpos in vitro en contra del mismo tumor (Hellestrom et al., 1970; Hellstrom et al., 1969) muchos trabajos se abocaron a determinar la naturaleza de estos factores, que resultaron ser un tipo de anticuerpos no citotóxicos denominados ("bloqueadores o facilitadores", que tienen la capacidad de inhibir la migración de las células del exudado peritoneal y bloquear la reacción de inhibición de adherencia de linfocitos -- por extractos solubles del tumor.

D. Escasa antigenicidad

Cuando un tumor se encuentra en sus primeras etapas de desarrollo puede expresar cantidades muy pequeñas de antígenos tumorales para que el sistema inmune sea capaz de reconocerlo. Para el tiempo en que estos antígenos son finalmente detectados, el tumor ha crecido en tal magnitud que aún la mejor respuesta inmunológica de rechazo es insuficiente para controlarlo (43).

E. Estados de inmunosupresión inducidos en el huésped por el tumor

Ciertos tumores son capaces de inducir y producir estados de inmunosupresión en sus huéspedes (2), mediante la secreción de moléculas farmacológicamente activas a través de la estimulación de células T supresoras que abaten la respuesta inmune en su contra (42).

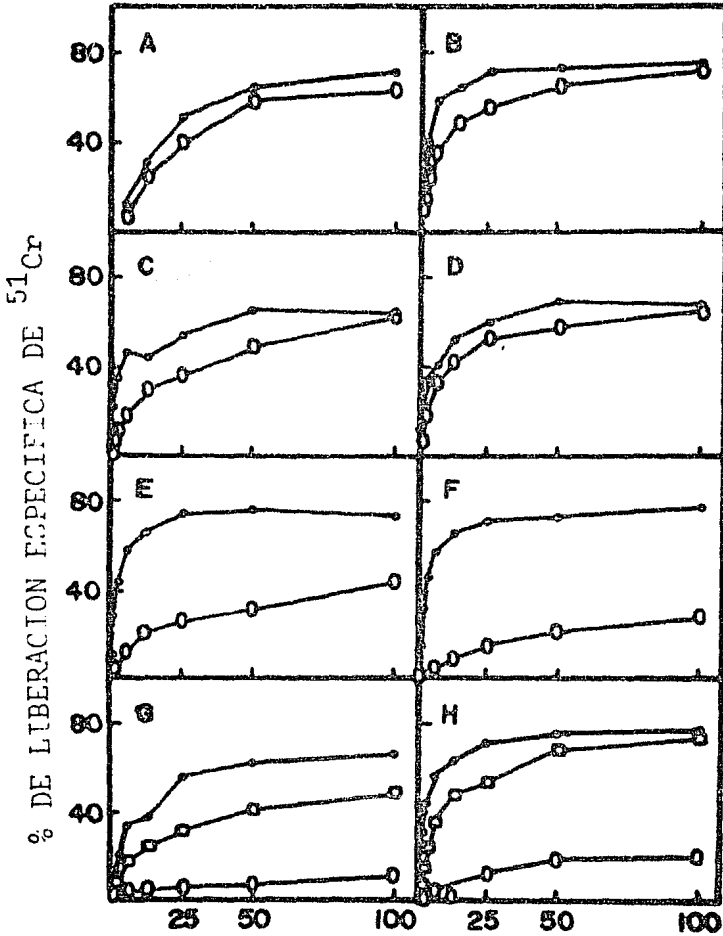
F. Enmascaramiento de los antígenos de histocompatibilidad

Algunos tipos de tumores son capaces de producir glicoproteínas de alto peso molecular que enmascaran a los antígenos mayores de histocompatibilidad propios impidiendo el reconocimiento de estos -- por los LTCs, como es el caso del tumor TA3 mamario que produce una -- glicoproteína de 500 000 d, denominada epiglicanina y del tumor LPC-1 murino que produce una de 160 000 d denominada gp160 (9).

IV. Antecedentes

El mieloma murino LPC-1 que crece en forma de ascitis se -- caracteriza por presentar cambios cíclicos en su susceptibilidad al ata -- que por LTCs, de tal modo que al ser transplantado en la cavidad perito -- neal de ratones BALB/c, durante los primeros cuatro días las células -- (células tempranas) son susceptibles al ataque por LTCs, pero si las cé -- las permanecen en la cavidad peritoneal hasta 10 - 14 días (células tar -- días) se vuelven resistentes a la lisis por LTCs (Fig. 6) (7).

Si las células tardías son sacadas y transplantadas a un -- nuevo hospedero, son cultivadas in vitro o tratadas con proteasas las -



RELACION EFECTORAS:BLANCO

Fig. 6. Cambios con el tiempo en la susceptibilidad de las células LPC-1 a la lisis por LTCs anti-H-2^d medida por la liberación de ^{51}Cr . Las células tumorales son cosechadas e inyectadas a un hospedero nuevo. Las células LPC-1 son cosechadas cada dos días (0,2,4,6,8,10,12,14 mostradas en los paneles A,B,C,D,E,F,G,H, respectivamente. Células LPC-1 ○—○, Blastos H-2^d ●—●, Células LPC-1 retransplantadas □—□.

células se vuelven susceptibles al ataque por LTCs (Fig. 7) (8).

La resistencia de las células al ataque por LTCs se ha -- correlacionado con la acumulación de una glicoproteína membranal de pe so molecular de aproximadamente 160 000 d, constituida por una sola - cadena polipeptídica, rica en ácido siálico, denominada gpl60 (Fig. 8) (6,7,26).

Se ha observado que la resistencia de estas células a la - lisis por LTCs va acompañada, paralelamente con una disminución de 6 a 10 veces en la capacidad de reaccionar con anticuerpos anti-H-2^d en -- comparación con las células LPC-1 tempranas ó LPC-1 tratadas con pro-- teasas. Otros antígenos de la superficie celular no relacionados con el CMH, no se encuentran afectados, ya que tanto las células tempranas como las tardías, reaccionan de igual manera con anticuerpos dirigidos contra antígenos como PC-1, B220 (8).

Se ha observado también que aunque las células LPC-1 tar-- días son resistentes a la lisis celular, estas pueden ser rechazadas - al ser introducidas a otras cepas alogénicas de ratón (8). Esto sugie re que otros mecanismos estan involucrados en el rechazo inmunológico, tales como reconocimiento de sus antígenos de histocompatibilidad meno res o la producción de complejos inmunes que activen la vía de comple- mento.

Con estos conocimientos se pueden plantear dos alternativas principales: que las células tardías dejen de expresar sus antígenos - de histocompatibilidad o éstos de alguna manera son enmascarados por --

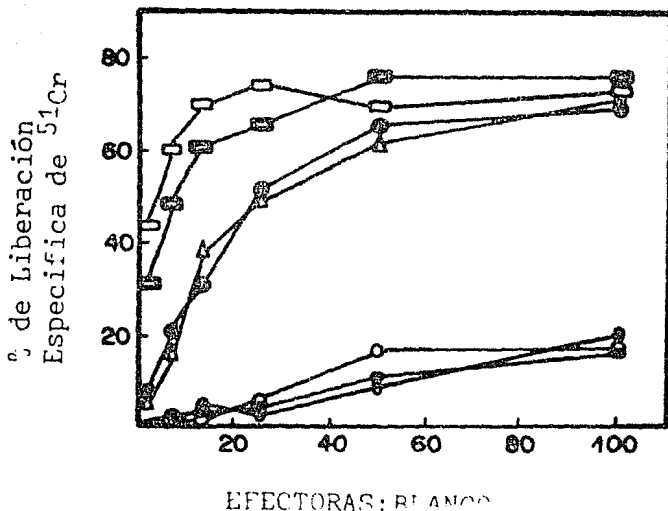


Fig. 7. Efecto de diferentes proteasas sobre la susceptibilidad de las células LPC-1 tardías a la lisis por LRCs anti-H-2^d. Las células LPC-1 tardías son tratadas con -- tripsina (○-○), quimotripsina (■-■), -- subtilisina (□-□) proteasa de Staphylococcus (○-○) y trombina (△-△). Las células LPC-1 tempranas no tratadas (○-○) y tardías (●-●) están incluidas.

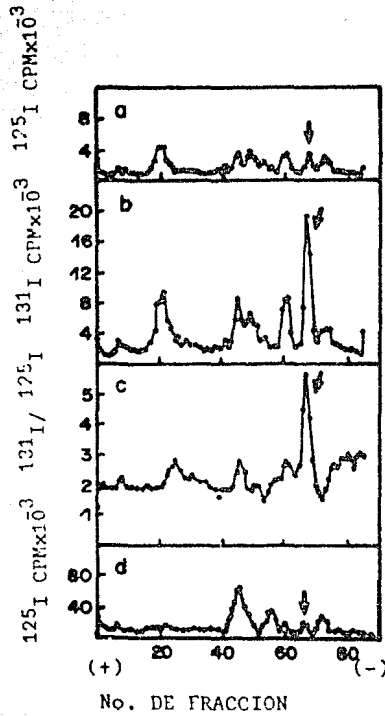


Fig. 8. Electroforesis en SDS-PAGE de los componentes radioiodinados de la superficie celular de células LPC-1 tempranas (a), tardías, (b) y tempranas más tardías -- (c). La mayor diferencia reside en la fracción 65, indicando el aumento en la cantidad de una proteína de P.M. 160 000d en las células LPC-1 tardías y es eliminada esta proteína cuando las células -- son tratadas con tripsina (d).

gp160 siendo inaccesibles para interactuar con los anticuerpos anti-H-2 y con LTCs.

OBJETIVOS

Estudiar la inducción de una respuesta secundaria in vitro de LTCs por liposomas que contengan la glicoproteína de origen tumoral gpl60 y los antígenos mayores de histocompatibilidad H-2^d.

1. Purificación de la glicoproteína tumoral gpl60 a partir de membranas plasmáticas de células LPC-1, tardías solubilizadas en detergente no iónico DOC Na 0.5% por medio de cromatografía de afinidad en Sepharosa 6B- aglutinina de germen de trigo.
2. Purificación de antígenos H-2^d a partir de membranas plasmáticas de células del mieloma P815 solubilizadas en detergente no iónico NP 40 0.5% por medio de cromatografía de afinidad en Sepharosa 4B- anti-H-2^d.
3. Incorporación de moléculas gpl60 y antígenos H-2^d a membranas sintéticas (liposomas) proporcionando un sistema simple, definido y con menos restricciones, facilitando el estudio.
4. Probar la capacidad de los liposomas, liposomas-H-2^d y liposomas-H-2^d-gpl60 de estimular una respuesta inmune celular secundaria (LTCs).

HIPOTESIS

Si la glicoproteína tumoral gp160 del mieloma murino LPC-1 interacciona específicamente con los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad H-2 (H-2K y H-2D), y si se incorporan cada una de estas proteínas en membranas sintéticas o liposomas, entonces es de esperarse que aquellos liposomas que contengan ambas proteínas no serán capaces de inducir una respuesta secundaria in vitro por parte de los linfocitos T citotóxicos.

MATERIALES Y METODOS

I. Métodos Generales

I.1 Animales

Se utilizaron ratones de varias cepas considerando el haplotipo de su complejo mayor de histocompatibilidad H-2: BALB/c (H-2^d), DBA/2 (H-2^d), BALB.k (H-2^k), CD2 (BALB/c x DBA/2 F1) (H-2^d), C57BL/6 (H-2^b). Estas cepas son mantenidas y conservadas en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.

I.2 Líneas tumorales

Los tumores LPC-1 (mieloma, H-2^d), P815 (mastocitoma, H-2^d) y EL4 (timoma, H-2^b), son mantenidos en ascitis en la cepa de ratón correspondiente (BALB/c, CD2, C56BL/6 respectivamente), transfiriendo semanalmente por vía intraperitoneal 1×10^7 células. Para llevar a cabo el trasplante, las células tumorales se cosechan de ascitis y se lavan 3 veces con solución amortiguadora de fosfatos ($1 \text{ mM PO}_4^{=}$, 0.15 M NaCl , pH 7.4 (SAF)) centrifugando a 400 g durante 10 minutos. Posteriormente se resuspenden en 25 - 30 ml de SAF y se cuentan en un hematocitómetro. El número de células por mililitro se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula (12):

$$\text{células/mm}^3 = \text{cc} \times \text{d} \times 10^4$$

donde:

cc = No. de células contadas

d = factor de dilución.

I.3 Medios de Cultivo para Células

I.3.1 Medio C.

Todas las células crecidas in vitro se cultivaron en medio RPMI 1640 adicionado con 2 g de bicarbonato de sodio por litro.

cada 100 ml de medio se complementan con:

- 1 ml de solución de antibióticos: penicilina 100 ug/ml, estreptomycinina 100 ug/ml (100 X).
- 1 ml de solución antimicótica: anfotericina B, 250 ug/ml (100 x)
- 1 ml de solución L-glutamina 200 mM (100 X).
- 1 ml de suero fetal bovino (SFB)

I.3.2 Medio K

El cultivo de linfocitos T citotóxicos se lleva a cabo en medio RPMI 1640 adicionado con 2 g de bicarbonato de sodio por litro:

Cada 100 ml de medio se complementa con:

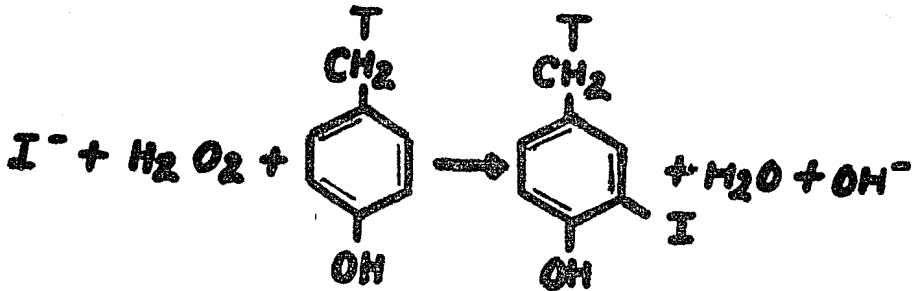
- 1 ml de solución de antibióticos: Penicilina 100 g/ml, streptomycinina 100 ug/ml (100x).
- 5 ml de suero fetal bovino (SFB).

- 1 ml de aminoácidos no esenciales 10 mM (100x)
- 1 ml de buffer HEPES 10 mM (100x)
- beta-mercaptoetanol a una concentración final de 50 uM.

I.4 Radioiodinación (^{125}I) de los componentes superficiales de las células tumorales

I.4.1 Marcaje de la superficie celular

Las moléculas de la superficie celular se marcan por la técnica de iodinación descrita por Marchalonis (53). En esta reacción los iones iodo son oxidados en presencia de lactoperoxidasa y peróxido de hidrógeno para dar lugar a un complejo enzimático con capacidad para convertir las tirosinas de las proteínas superficiales a derivados monoiodados. La histidina puede también ser iodinada aunque en menor grado (38).



El gran tamaño de la lactoperoxidasa (78 000 d) excluye su penetración a las células, de tal manera que proporciona un sistema -- particularmente útil para el marcaje de las proteínas superficiales de las células. Las células tumorales (10^7) cosechadas de ascitis del ra tón (con una viabilidad del 95 - 100%), lavadas con SAF son colocadas

en presencia de 10 μ l de lactoperoxidasa (4 mg/ml SAF) y un mCi de NaI (^{125}I , New England Nuclear, actividad específica 350 - 500 mCi). Se agrega 10 μ l de una solución fresca de H_2O_2 al 0.03% preparada en SAF y las células son incubadas 5 minutos a 30°C. Esto se repite 3 veces y al finalizar, las células son lavadas 3 veces con 10 ml de SAF-KI - 5 mM centrifugando cada vez a 450 g durante 5 minutos, para que el KI compita con el ^{125}I por los sitios activados.

I.4.2 Solubilización y obtención del extracto celular

Una vez marcadas las células, se hace un extracto celular solubilizando 10^7 células en 100 μ l de detergente no iónico (NP 40 ó DOC Na 0.5% en SAF) en presencia de inhibidores de proteasas (PMSF-fenilmetilsulfonilfluoruro, 17 mg/ml de metanol para 100 ml) durante 30 minutos a 4°C. Se separa la fracción soluble de los restos celulares por centrifugación (centrífuga Eppendorf) a 14 000 g por 10 minutos.

I.4.3 Precipitación de proteínas celulares por TCA

Cuando las proteínas son llevadas a su punto isoeléctrico por la adición de H^+ (TCA), su carga neta es cero de tal modo que precipitan y se separa el isótopo libre de la marca incorporada a las proteínas (3).

A 10 μ l (10^6 ceq) de extracto celular en NP 40 0.5% se le añaden 10 μ l de SFB (para aumentar la cantidad de proteínas y que el precipitado sea visible) y 3 ml de TCA 10%. Se incuba 10 minutos a --

4°C y se centrifuga a 500 g por 5 minutos, el sobrenadante se desecha y el precipitado se vuelve a lavar 2 veces más con 3 ml de TCA al 10% dejando nuevamente incubar 10 minutos y centrifugando en las mismas condiciones. El precipitado resultante que contiene la marca incorporada a las proteínas, se resuspende en 1 ml de SAF y se cuenta en un contador Autologic Abbot para radiaciones gamma.

1.5 Determinación de proteína por el método de Lowry (52)

La determinación de proteína por el reactivo de Folin se lleva a cabo en 2 pasos:

- a. La reacción de la proteína con el cobre en alcali formando el complejo Cu-proteína.
- b. La reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotungstico -- (reactivo de Folin) por el complejo Cu-proteína, y aminoácidos aromáticos, dando diferentes grados de coloración azul proporcional a la concentración de proteína presente (la relación es lineal en un rango determinado de proteína 10 - 100 µg).

A diferentes cantidades de una solución patrón de seroalbúmina bovina (SAB, 100 µg/ml) y muestra problema aforados a 1 ml 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 deja incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agrega 0.4 ml de reactivo de Folin (diluído 1:2 con agua) y se deja incubando 30 minutos más

a temperatura ambiente. Terminando este período, se lee la D.O. --
600 nm.

1.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

La separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS por el método de Laemmli (77), es una técnica rápida y sensible para analizar mezclas de proteínas, verificar la pureza de proteínas o determinar su peso molecular. La concentración de -- acrilamida del gel superior es del 5% con un pH de 6.8 y la del gel inferior de 7.5 al 20% (dependiendo del peso molecular de la proteína) con un pH de 8.7. Esta discontinuidad ayuda a concentrar la muestra en el gel superior y así obtener una mejor resolución en el gel inferior o separador. La solución de corrida utilizada es Tris 0.1 M, -- Glicina 0.04 M, pH 8.8.

Una vez montada la cámara de electroforesis se añade a las muestras un volumen equivalente de una solución compuesta de 0.08 M - Tris, 5% SDS, 5% β -mercaptoetanol, 0.002% azul de bromofenol, y son calentadas en un baño de agua en ebullición durante 3 minutos y colocadas en los carriles del gel.

Se aplica una corriente de 15 mA por gel en placa ó 3 mA por gel en tubo hasta que las muestras rebasen el gel concentrador y se continúa a 30 mA por gel en placa ó 5 mA por gel en tubo hasta que la muestra llegue a la parte inferior del gel (visible por el colorante azul de bromofenol contenido en la muestra).

Los geles son procesados de diferentes maneras dependiendo de las características y concentraciones de la muestra.

I.6.1 Tinción de Coomasie

El gel es puesto en colorante de Coomasie (Coomasie Brilliant Blue 0.06%, Metanol 30%, ácido acético 10%) durante 20 minutos con calentamiento y posteriormente es desteñido con varios cambios de una solución de ácido acético 10%, metanol 5%. Esta tinción detecta hasta 1 μ g de proteína (49).

I.6.2 Tinción de Schiff

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

I.6.3 Tinción de Plata (56)

Esta tinción es muy sensible, detecta cantidades de proteínas del orden de nanogramos. El gel es puesto en una solución de alcohol metílico al 50%, en ácido acético al 12% por 30 minutos, es sacado y pasado a una solución de alcohol etílico 10%, ácido acético 5% por 45 minutos y después a una solución de dicromato de potasio 3.4 mM, en ácido nítrico 3.2 mM por 10 minutos. El gel es lavado exhaustivamente

con agua bidestilada y a continuación se le agrega una solución de nitrato de plata 20 mM y se deja incubar por 30 minutos. El gel es revelado con una solución de carbonato de sodio anhidro 0.28 M, en formaldehído (100 µg/100 ml). El proceso de revelado es parado con ácido acético 1%.

I.6.4 Autorradiografía en placas de Rayos X

Los geles conteniendo muestras marcadas con ¹²⁵I son secados y puestos sobre una placa de Rayos X, que se deja a -70°C por diferentes intervalos de tiempo, dependiendo de la cantidad de marca incorporada a la muestra (cinco días con 20 000 c.p.m. por muestra).

I.6.5 Transferencia a papel de nitrocelulosa (EITB)

El procedimiento de transferencia a papel de nitrocelulosa es simple, rápido y muy sensible. Detecta cantidades de antígeno del orden de 100 pg o menos. Se puede transferir proteínas de geles de poliacrilamida-SDS a papel de nitrocelulosa que presenten un peso molecular de 18 000 a 94 000 d, a pH altos (pH 9.2) y fuerzas iónicas bajas, lo que ocasiona que las proteínas se acoplen covalentemente con el papel de nitrocelulosa (65).

El gel de poliacrilamida-SDS es lavado exhaustivamente con agua bidestilada para quitar el SDS y es colocado sobre el papel de nitrocelulosa que ha sido previamente remojado durante 30 minutos en el buffer de transferencia (Tris 0.025M, glicina 0.193 M, metanol 20% v/v pH 8.35).

Se coloca en las placas de la cámara de transferencia en el orden representado en la figura 9.

Las proteínas inmobilizadas en el papel de nitrocelulosa son detectadas por métodos inmunológicos. La capacidad enlazante del papel de nitrocelulosa es bloqueada con un exceso de proteína (SAB) y con la adición de un anticuerpo específico, la reacción antígeno-anticuerpo es detectado por la adición de un segundo anticuerpo dirigido contra el primero, conjugado a peroxidasa (76).

Cuando las proteínas del gel han sido transferidas al papel de nitrocelulosa, este se bloquea con SAB 3% en SAF por 3 horas. Terminado el período de bloqueo se lava el papel de nitrocelulosa 3 veces con Tween 20 0.3% en SAF dejando incubar 10 minutos en cada lavado. Se aplica el primer anticuerpo (1:500 en SAB 3% SAF) y se deja incubando por 6 horas ó toda la noche, con agitación continua y se lava 3 veces con Tween 20 0.3%, en SAF. Se aplica el segundo anticuerpo (un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa, 1:1 000 en SAB 3%-SAF) y se deja incubar por 6 horas más con agitación continua. Se lava nuevamente con Tween 20 0.3% en SAF 3 veces.

La reacción antígeno-anticuerpo es revelada con diaminobenzidina 50 mg/100 ml de SAF, 0.0015% de H_2O_2 (concentración final, 50 μ l de H_2O_2 al 33%/100 ml). La reacción de revelado es parada con agua bidestilada, azida de sodio 0.2%.

I.7 Purificación de membranas plasmáticas (37)

La sedimentación de equilibrio o colchón de densidad tiene

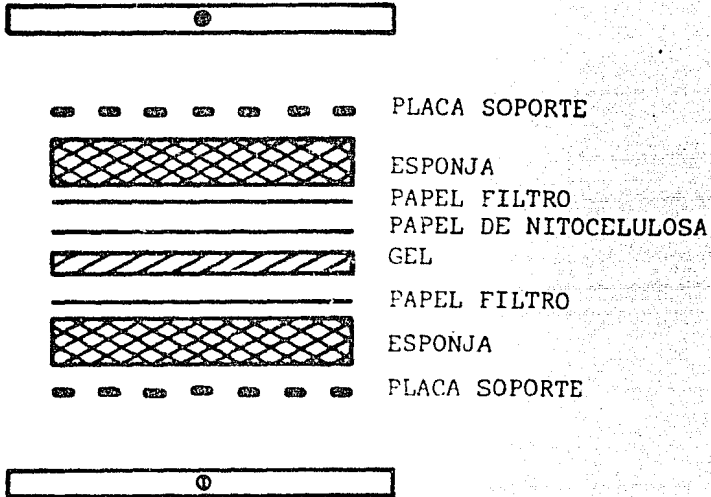


Fig. 9. Transferencia electroforética a papel de - nitrocelulosa. Siempre el papel de transfe - rencia debe de quedar del lado del polo po - sitivo y la transferencia de proteínas se - lleva a cabo a 200 mA por 1.5 horas.

la capacidad de separar sustancias o partículas de acuerdo con sus densidades.

Las células tumorales a una concentración de 6×10^7 células por mililitro de solución hipotónica (100 mM $MgCl_2$, 1 M NaCl, PMSF 0.1 mM, 0.02% azida de sodio) son rotas con un homogenizador de tejidos (Wheaton 357544) 20 veces a 4°C. El homogenizado es puesto sobre un colchón de sacarosa al 41% en tubos de nitrocelulosa y centrifugado a 95 000 g por 2 horas. Se separan las membranas plasmáticas que forman una banda blanca en la interfase del homogenizado y el colchón de sacarosa y se lavan una vez con solución hipotónica y dos veces con SAF a 95 000 g por 20 minutos cada vez. El precipitado es almacenado hasta su uso a -70°C o en nitrógeno líquido.

II Purificación de Antígenos H-2^d

II.1 Producción de suero hiperinmune anti-H-2^d

A ratones BALB/c (H-2^d) se les inoculan seriadamente por vía intraperitoneal, 1×10^7 células de bazo de ratones BALB/c (H-2^d). Después de la cuarta, quinta y sexta inmunización los ratones son sangrados por la cola y a la séptima los ratones son sangrados a blanco por punción cardíaca. Se obtiene el suero y se verifica la presencia de anticuerpos anti-H-2^d por un ensayo de citotoxicidad, utilizando como blanco células P815 (H-2^d) (17).

II.2 Ensayo de citotoxicidad con anticuerpo y complemento

Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo para comprobar la presencia de anticuerpo contra un antígeno determinado en un suero hiperinmune.

Las células blanco son incubadas en presencia de un anticuerpo dirigido contra sus antígenos de histocompatibilidad presentes en su membrana, en presencia de complemento de conejo. Si existe una reacción antígeno-anticuerpo, el complemento es activado, ocasionando alteraciones en la membrana de las células que resulta en aumento de su permeabilidad. Este efecto se puede medir incubando previamente las células blanco con ^{51}Cr , el cual es internalizado y unido a proteínas intracelulares cambiando su valencia impidiendo su salida hasta que la célula sea lisada.

Las células blanco son marcadas con ^{51}Cr incubando 5×10^6 células con 250 μCi de $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear, actividad específica 10 - 35 mCi), en medio C durante una hora a $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$. Las células marcadas son lavadas 4 veces con SAF frío (17).

Se resuspenden en complemento 1:10 (suero de conejo, 5×10^4 células/50 μl) en medio C y se colocan en tubos de plástico (12 x 75 mm, Falcon) con diferentes concentraciones de antisuero (50 μl) en un volumen final de 0.1 ml. Después de una hora de incubación a $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$, se añaden 0.9 ml de SAF frío por tubo para parar la reacción lítica. Se centrifugan los tubos a 450 g por 7 minutos y

el porcentaje de lisis específica o liberación específica de ^{51}Cr se calcula en base a la siguiente fórmula:

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

donde:

Lex = Liberación experimental de las células blanco en presencia de anticuerpo y complemento.

Les = Liberación espontánea de las células blanco en presencia únicamente de complemento

II.3 Aislamiento de inmunoglobulinas por proteína A acoplada a Sepharosa-4B (39)

La proteína A está unida covalentemente a la porción peptidoglicano de la pared celular del Staphylococcus aureus cepa Cowan I y pueden ser aislada de las células por digestión enzimática con lisostafina (Sjoquist et al., 1972). Esta proteína tiene la propiedad de reaccionar fuertemente con el fragmento Fc de algunas clases de inmunoglobulinas de diferentes especies (Forsgren and Sjoquist, 1966, Sjoquist et al., 1977). Una molécula de proteína A puede enlazar al menos 2 moléculas de inmunoglobulinas. La proteína A es acoplada a Sepharosa 4B (Hjem et al., 1972) y el inmunoabsorbente resultante, conteniendo 4 mg/ml de gel empacado puede enlazar 20 mg de IgG/ml de gel. El inmunoabsorbente es lavado con Tris-HCl 0.1 M pH 7.95 a una velocidad de flujo de 20 a 40 ml por hora. Posteriormente se aplican 2 ml de suero hiperinmune anti-H-2^d a la columna, se deja incubar una hora a tempera-

tura ambiente, y al finalizar este período la columna es lavada con Tris-HCl 0.1 M pH 7.95 hasta que la D.O. 280 nm sea cero, para eliminar la proteína no adsorbida.

Las inmunoglobulinas son eluidas a continuación con glicina HCl 0.1 M pH 3 a la misma velocidad de flujo. El eluido es recolectado en fracciones de 1 ml en tubos que contienen 0.1 ml de Tris-HCl 1 M pH 7.95 para neutralizar el pH. Las fracciones ricas en proteínas (D.O. 280 nm) son almacenadas a -70° hasta ser usadas.

II.4 Polimerización e inmovilización de proteínas (75)

II.4.1 Formación de un polímero

Se pueden formar polímeros de proteínas insolubles en agua usando agentes entrecruzadores como glutaraldehído y etil-cloroformato y emplearse como inmunoabsorbentes muy efectivos, específicos y estables.

El glutaraldehído es un dialdehído que reacciona principalmente con grupos ϵ -amino de péptidos, especialmente lisina. La adición de glutaraldehído a una solución de altas concentraciones de proteínas, ocasiona la producción de un polímero proteico de alto peso molecular insoluble en agua. Esta insolubilización es óptima alrededor del punto isoelectrico de cada proteína y la capacidad enlazante del anticuerpo o antígeno es mejor cuando la insolubilización es a pH 5. Por lo tanto como no todas las proteínas tienen el mismo punto isoelectrico de 5, se añade SAB como una proteína auxiliar que es elegida por que su punto isoelectrico es 4.9 y posee muchos² residuos de lisina.

A 1×10^9 células tumorales P815 (20 mg de proteína) en 8 ml de SAF, son añadidos a 80 mg de SAB en 2 ml de buffer de acetatos 2 M pH 5 (1 ml por cada 50 mg de proteína). La solución es agitada lentamente y se le agrega 2 ml de glutaraldehído 2.5% gota a gota. Un gel que empieza a polimerizar de abajo hacia arriba se forma en 10 minutos. Se deja de 2 a 3 horas a temperatura ambiente y posteriormente la reacción es parada cortando en pedazos el gel formado y agregándole 2 a 3 veces su volumen de SAF, con 0.002% azida de sodio. Se deja a 4°C toda la noche. Terminado este período el polímero es lavado con SAF -- para quitar la proteína que no se polimerizó.

II.4.2 Purificación de anticuerpos específicos

Al polímero previamente formado con células tumorales P815 se le añaden 5 ml de suero hiperinmune anti-H-2^d y se deja incubar 1 hora a temperatura ambiente, agitando ligeramente. Se lava con SAF 3 ó 4 veces dejando incubar 10 minutos antes de cada lavado y se centrifuga a 450 g por 10 minutos a 4°C. Se guardan los sobrenadantes y se filtran con una membrana milipore de 0.45 μ y se lee la D.O. 280 nm para determinar la cantidad de proteína no adsorbida.

Se desprenden las inmunoglobulinas lavando el polímero 3 ó 4 veces (o hasta que la D.O. 280 nm sea cero) con 5 ml de glicina-HCl 0.2 M pH 2.8 dejando un período de 10 minutos de incubación antes de cada lavado. Al sobrenadante recuperado se le adiciona 1 ml de -- K_2HPO_4 1 M que neutraliza el pH para que las inmunoglobulinas no se --

desnaturalicen, se filtra con una membrana milipore 0.45 μ y se lee la D.O. 280 nm. Las fracciones ricas en proteínas se concentran, dializan y se determina la concentración de proteína por el método de Lowry.

El polímero es reconstituido con K_2HPO_4 0.2 M, lavado y almacenado en SAF, azida de sodio 0.002%.

II.5 Purificación de antígenos H-2^d por cromatografía de afinidad

II.5.1 Preparación de la columna inmunoabsorbente

A. Activación de Sepharosa 4B. Se suspenden 10 g de sepharosa 4B en 10 ml de Na_2CO_3 2 M y 6 ml de agua y se lleva a una temperatura de 5 - 7°C. Una solución de 400 mg de CNBr en 4 ml de agua a la misma temperatura es añadida poco a poco, manteniendo el pH entre 9 y 11, con NaOH 4 N. La mezcla es agitada por 10 minutos, y se filtra por succión. La sepharosa activada se lava exhaustivamente con agua (300 ml) y 0.1 M $NaHCO_3$ (100 ml). El gel se usa inmediatamente en el siguiente paso.

B. Acoplamiento con los anticuerpos anti-H-2^d. La sepharosa 4B (1 g) activada con CNBr es agitada fuertemente en 150 ml de 1 mM HCl por 15 minutos a temperatura ambiente. La suspensión se filtra por succión y es lavada con 200 ml de agua. El gel húmedo es suspendido en 10 ml de 0.1 M $NaHCO_3$, 0.5 M NaCl conteniendo 10 mg de inmunoglobulinas anti-H-2^d purificadas por proteína A o por el polímero. La mezcla es agitada a temperatura ambiente por 2 horas y 12 horas más a 4°C. Posteriormente, la mezcla se lava por succión con 200 ml de --

0.1 M NaHCO_3 100 ml de agua y 100 ml con 0.05 M glicina-HCl pH 2.9, -- 100 ml de agua y 100 ml de 0.1 M Tris-HCl pH 7.95, sucesivamente.

El gel húmedo es suspendido en buffer Tris-HCl 0.1 M y colocado en una columna (5 x 0.9 cm). La columna es lavada por 30 minutos con el buffer inicial (Tris-HCl pH 7.95) con una velocidad de flujo de 30 ml por hora antes de usarse.

C. Purificación de antígenos H-2^d. La columna de Sepharosa 4B anti-H-2^d es lavada con SAF, NP 40 0.25% a una velocidad de flujo de 10 a 40 ml por hora.

Las membranas plasmáticas de células P815 solubilizadas en NP 40 0.5% (1×10^9 ceq/ml) son aplicadas a la columna que se deja incubar 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente, la columna es lavada con SAF-NP 40 0.25% hasta que la D.O. 280 nm ó c.p.m. sean cero, -- para eliminar la proteína no adsorbida.

El antígeno específico del anticuerpo es eluído a continuación con 0.05 M glicina-HCl, NP 40 0.25% pH 2.9 a la misma velocidad de flujo. El eluído es recolectado en fracciones de 1 ml en tubos que -- contienen 0.5 ml de 0.2 M Tris, 0.02 M HCl pH 7.9 para neutralizar el pH. Las fracciones ricas en proteínas se concentran, dializan contra SAF y se determina concentración de proteínas por el método de Lowry.

La pureza de los antígenos eluídos es comprobada por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS del 7.5 al 15% y teñidos con nitrato de plata.

III. Purificación de la Glicoproteína Tumoral gp160

Las células, partículas subcelulares y moléculas conteniendo carbohidratos solubles pueden ser purificados por cromatografía de - afinidad con aglutinina de germen de trigo acoplada a Sepharosa 6B, ya que está lectina tiene la capacidad de enlazar selectivamente porciones de carbohidratos conteniendo residuos de N-acetilglucosamina y ácido -- siálico.

Un mililitro de gel contiene 5 mg de aglutinina de germen - de trigo (WGA) y enlaza aproximadamente 1 mg de glicoproteína por mili- litro de gel.

La WGA se acopla a la sepharosa 6B como se describe anterior- mente (ver sección II.5.1), y una vez acoplada se lava con SAF, deoxico- lato de sodio 0.25% (DOC Na) con una velocidad de flujo de 30 a 40 ml - por hora. Las membranas plasmáticas de células tumorales LPC-1 tardías solubilizadas en SAF-DOC Na 0.5% (1×10^9 ceq/ml) son aplicadas a la coluna, se deja incubar 30 minutos a temperatura ambiente y se lava la - columna con SAF-DOC Na 0.25% hasta que la D.O. o c.p.m. sea cero, para eliminar las proteínas no enlazadas.

La glicoproteína tumoral gp160 es eluída de la columna por competición con N-acetilglucosamina 10%, SAF-DOC Na 0.25%. El eluído - rico en proteína es concentrado, dializado y la concentración de protefí- na determinada por el método de Lowry.

La pureza de la glicoproteína eluída es determinada por elec- troforesis en geles de poliacrilamida-SDS 10% y teñidos con Schiff y -- Coomassie.

IV. Inducción de Linfocitos T Citotóxicos

IV.1. Estimulación in vivo

Los linfocitos T citotóxicos (LTCs) son inducidos inyectando intraperitonealmente 1×10^7 células tumorales P815 (H-2^d) a ratones C57BL/6 (H-2^b). Después de 15 días se cosechan las células de bazo de los ratones C57BL/6 (células efectoras), y se prueba su actividad citotóxica.

IV.2. Estimulación in vitro

IV.2.1. Estimulación primaria

Se cultivan 7×10^6 células de bazo de ratones C57BL/6 (células efectoras) junto con 3×10^6 células tumorales (pretratadas con mitomicina C) o membranas plasmáticas de células tumorales en 1 ml de medio K fresco, a 37°C, 5% CO₂ y se cosechan al quinto día para el ensayo de citotoxicidad.

IV.2.2. Estimulación secundaria

Las células de bazo de ratones C57BL/6 (7×10^6) previamente inmunizados con 1×10^7 células tumorales (células efectoras) son cultivadas con 3×10^6 células tumorales (pretratadas con mitomicina C) o membranas plasmáticas de células tumorales en 1 ml de medio a 37°C, 5% CO₂. Se alimentan al tercer día y son cosechadas al quinto día para el ensayo de citotoxicidad.

IV.3. Tratamiento de células estimuladoras con mitomicina C

El tratamiento de una población de células estimuladoras con mitomicina C por el método de Bach & Boynow (28), permite que las células respondedoras reaccionen unidireccionalmente, porque la mitomicina C bloquea la capacidad de replicación del DNA.

A 2×10^6 células/ml de medio C se le adiciona 25 μg de mitomicina C por ml y la suspensión es incubada por 30 minutos a $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$. Al terminar este período las células son centrifugadas y lavadas 2 veces con SAF frío. Las células mitomizadas son diluídas a una concentración final de 10^6 células/ml en medio K.

IV.4. Ensayo de citotoxicidad

Las células blanco (2×10^4) previamente marcadas con ^{51}Cr (ver II.2), son colocadas en tubos de plástico 12 x 75 mm que contienen diferentes números de células efectoras en presencia de medio C en un volumen final de 100 μl y se incuban 4 horas a 37°C , $5\% \text{CO}_2$.

La reacción lítica es parada por la adición de 90 μl de SAF frío por tubo. Las células son centrifugadas a 100 g por 5 minutos y se toman 0.5 ml del sobrenadante del tubo y se cuenta (sobrenadante y precipitado) en un contador gamma. El porcentaje de lisis específica se calcula como en el ensayo de lisis por anticuerpo y complemento (II.2)..

V. Preparación del Complejo Liposoma-gpl60-H-2^d

Los liposomas o vesículas lipídicas son usados como modelos

de membranas en los cuales se pueden incorporar moléculas proteicas de la superficie membranal para facilitar su estudio.

Estas vesículas son hechas de diferentes tipos de lípidos o mezcla de lípidos. Un diagrama esquemático del proceso que puede ocurrir durante su formación se muestra en la figura 10 (74).

A 10 mg de fosfatidilcolina, 5 mg de fosfatidiletanolamina son disueltos en 2 ml de cloroformo:metanol 2:1 y posteriormente son secados en presencia de una atmósfera de nitrógeno, se le añaden 150 µg de antígenos H-2D y 300 µg de proteína tumoral gp160 que se encuentran disueltos en SAF detergente no iónico (DOC-Na 0.5%, NP 40 0.5%).

La mezcla se dializa contra 2 000 veces su volumen de SAF, con cambios cada 6 horas, durante 5 días o hasta que el detergente sea eliminado y se formen los liposomas.

Una vez formados los liposomas se centrifugan a 100 000 g - por 3 horas y determina la cantidad de proteína que no se incorporó a los liposomas, en el sobrenadante y el precipitado (liposomas) se resuspende en 3 ml de SAF y se almacena a 4°C hasta su uso (21,34).

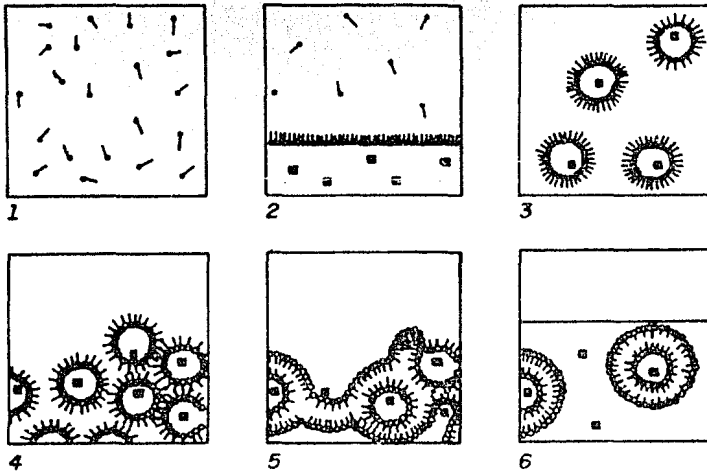


Fig. 10. Panel 1, fosfolípido disuelto en un disolvente orgánico. Panel 2, el fosfolípido es secado bajo una atmósfera de nitrógeno. Panel 3, iniciación de la formación de los liposomas - cuando se le añade agua al fosfolípido seco. Paneles 4,5,6, la formación de los liposomas conforme se va eliminando el detergente por medio de una dialisis, presente en las proteínas que se van a incorporar (74).

RESULTADOS

I. Purificación de Antígenos H-2^d

I.1. Especificidad del suero hiperinmune anti-H-2^d

La especificidad del suero hiperinmune se determinó por medio de un ensayo de citotoxicidad con complemento, utilizando diferentes tipos de células blanco: EL4 (H-2^b), LPC-1 tardías (H-2^d, gp160⁺), X63 (H-2^d), P815 (H-2^d).

Los resultados obtenidos, expresados en porcentaje de liberación específica de ⁵¹Cr fueron: del 22% con células EL4, del 18% con células LPC-1 tardías, del 72% con células X63 (control positivo) y del 90% con células P815 (Fig. 11).

Estos resultados nos indicaron que los anticuerpos presentes en el suero hiperinmune reconocían un solo haplotipo del complejo mayor de histocompatibilidad, H-2^d.

I. 2. Purificación de inmunoglobulinas anti-H-2^d

I.2.1. Por Sepharosa-4B-Proteína A

Se obtuvieron 10 mg de inmunoglobulinas totales de 5 ml de suero hiperinmune anti-H-2^d (Fig. 12).

I.2.2. Por proteínas inmobilizadas (polímero)

Se obtuvieron 696 µg de inmunoglobulinas anti-H-2^d de 4 ml

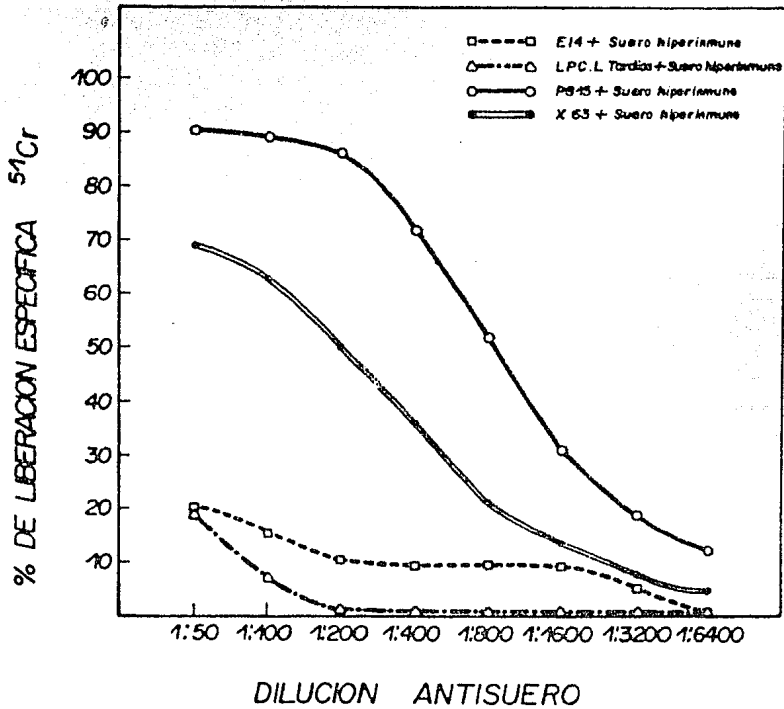


Fig. 11. Ensayo de citotoxicidad utilizando suero hiperinmune anti-H-2^d más complemento con diferentes tipos de células blanco: □ - - □ células EL4, - △ - - △ células LPC-1 tardías, ○ - ○ células P815, ● - ● células X 63.

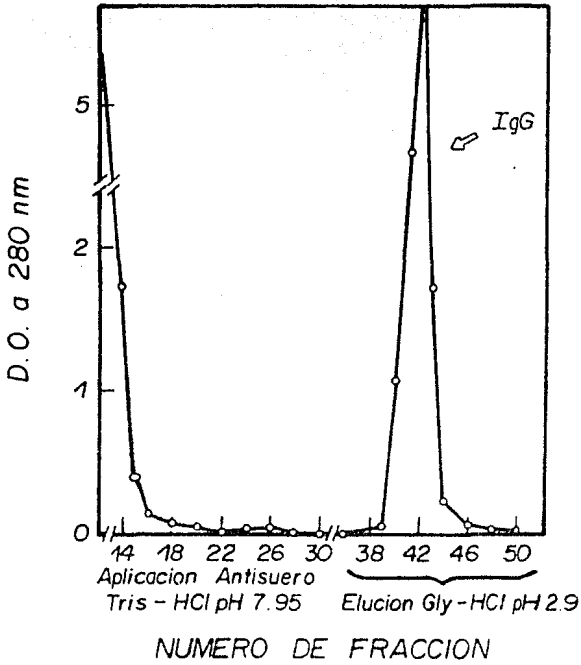


Fig. 12. Perfil de elución de la cromatografía de afinidad en Sepharosa 4B-Proteína A para la purificación de inmunoglobulinas de un suero hiperinmune anti-H-2^d.

de suero hiperinmune anti-H-2^d (Fig. 13).

I.3 Especificidad de las inmunoglobulinas purificadas

Para determinar que proteína de la superficie celular del mastocitoma P815 estaba siendo reconocida por las inmunoglobulinas purificadas, se llevó a cabo una transferencia a papel de nitrocelulosa de membranas plasmáticas de células P815 solubilizadas con NP 40 0.5% (Fig. 14).

Los resultados nos indicaron que tanto las inmunoglobulinas purificadas por Proteína A (carril 1 y 2), como las purificadas por el polímero (carril 3 y 4) reconocían específicamente dos bandas proteicas: una de peso molecular de aproximadamente 45 000 d y otra de bajo peso molecular 15 000 d aproximadamente, que podría corresponder a los antígenos H-2 que presentan un peso molecular de 43 000 d y a la beta-2 microglobulina que pesa aproximadamente 15 000 d.

Comprobada la especificidad de las inmunoglobulinas purificadas, estas se acoplaron a Sepharosa 4B, obteniendo un inmunoadsorbente específico para antígenos H-2^d.

I.4. Purificación de antígenos H-2^d

Se obtuvieron 157.5 µg de antígenos H-2^d (0.58%) de 447 µg de membranas plasmáticas equivalentes a 1×10^9 células P815 (Tabla II).

Para comprobar la pureza de los antígenos obtenidos por el inmunoadsorbente Sepharosa 4B-anti-H-2^d (Fig. 15), se llevó a cabo una

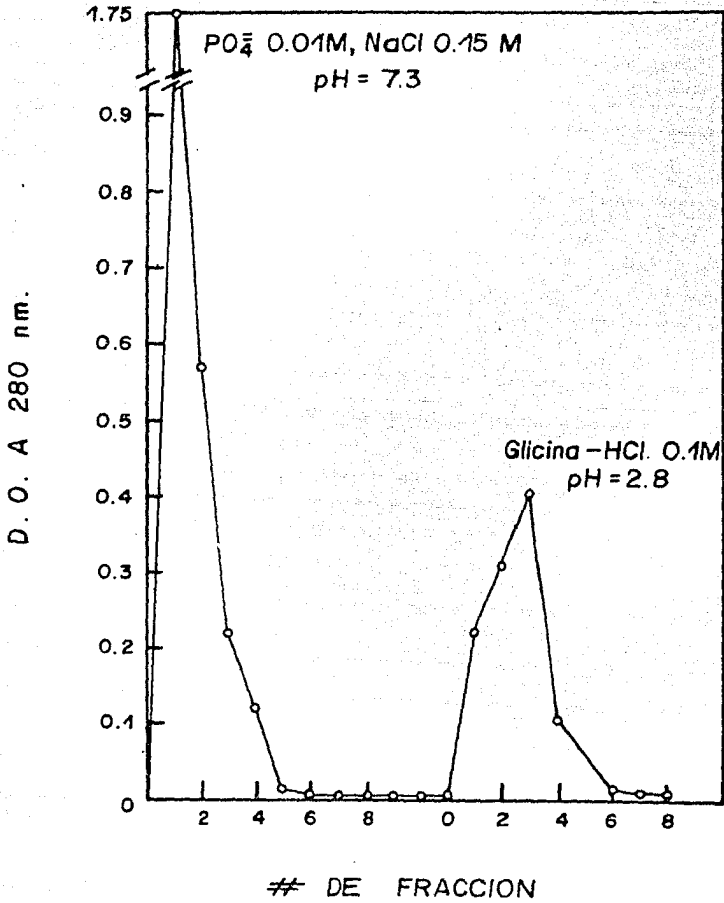


Fig. 13. Purificación de inmunoglobulinas por medio de un polímero formado por inmovilización de proteínas de células P815 con glutaraldehído y SAB. Las inmunoglobulinas adsorbidas con glicina-HCl 0.1 M pH 2.8.

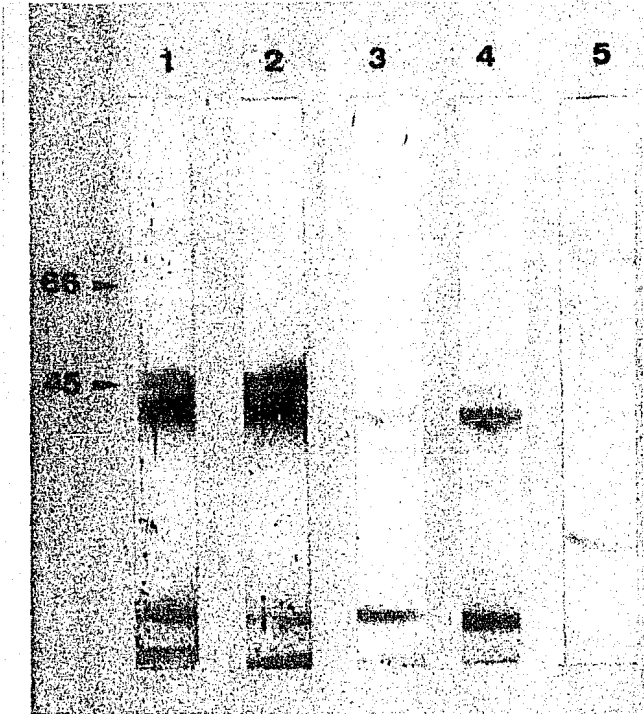


Fig. 14. Inmunotransferencia a papel de nitrocelulosa de membranas plasmáticas de células P815. Carril 1 y 2, inmunoglobulinas purificadas por Proteína A del suero hiperinmune anti-H-2^d. Carril 3 y 4, inmunoglobulinas purificadas por el polímero hecho de la inmovilización de proteínas de células P815 + glutaraldehído y SAB.

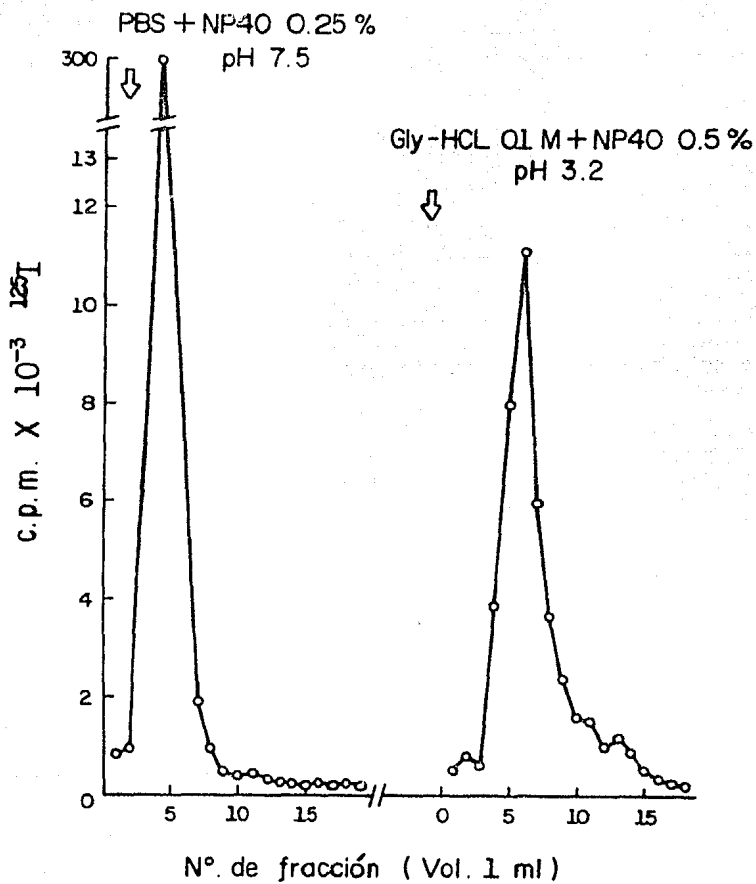


Fig. 15. Perfil de elución de la cromatografía de afinidad en Sepharosa 4B-anti-H-2^d para la purificación de antígenos H-2^d a partir de membranas plasmáticas de células P815 solubilizadas en NP 40 0.5%-SAF.

TABLA II. RENDIMIENTO EN LA PURIFICACION DE LOS ANTIGENOS H-2^d
A PARTIR DE CELULAS P815

Purificación de Ag H-2 ^d	µg Totales (1 X 10 ⁹ ceq)	%
Células rotas	27 000 + 19.09	100
Membranas plasmáticas	447 + 19.8	1.68
Antígenos H-2 ^d	157.5 + 10.6	0.58



electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS del 7.5 al 15%, en la --
cual aparece unicamente una banda proteica de peso molecular aproxima-
do de 45 000 d, con un ligero contaminante de alto peso molecular --
(160 000 aproximadamente) que podria corresponder a agregados de anti-
genos H-2^d (Fig. 16, carril 2).

II. Purificación de la Glicoproteína Tumoral gp160

Se obtuvieron 187.4 µg de la glicoproteína tumoral gp160 -
(0.4%) de 777.3 µg de membranas plasmáticas equivalentes a 1×10^9 cé-
lulas tumorales LPC-1 tardías (Tabla III).

Para comprobar la pureza de la glicoproteína tumoral gp160
obtenida a partir del inmunoadsorbente Sepharosa 6B- aglutinina de ger-
men de trigo (Fig. 17), se llevó a cabo una electroforesis en geles de
poliacrilamida-SDS al 10%. Al teñir el gel con azul de Coomasie o con
tinción de plata, no aparecen bandas proteicas. Sin embargo al teñir-
los con tinción de Schiff aparece una banda proteica de alto peso mole-
cular, 160 000 d(carril 2, Fig. 18), por lo tanto la pureza de gp160
obtenida es más del 90%.

III. Incorporación de gp160 y Antígenos H-2^d a Liposomas

La incorporación de las proteínas a los liposomas se lle-
va a cabo al momento de preparar los liposomas. Se añadió gp160 y an-
tígenos H-2^d puros en una relación de 2 moléculas de gp160 por 1 molé-
cula de H-2^d en relación a datos anteriores obtenidos en el laborato--
rio (67).

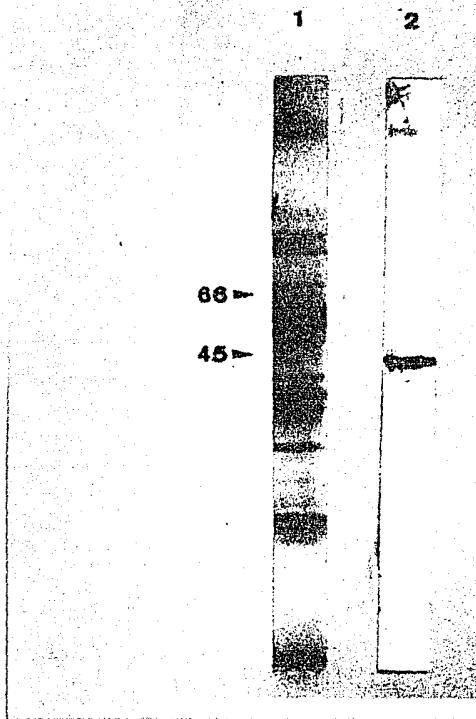


Fig. 16. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS del 7.5 -15%. Carril 1, membranas plasmáticas de células P815 solubilizadas con NP 40 0.5%. Carril 2, antígenos H-2^d purificadas por cromatografía de afinidad en Sepharosa 4B-anti-H-2^d.

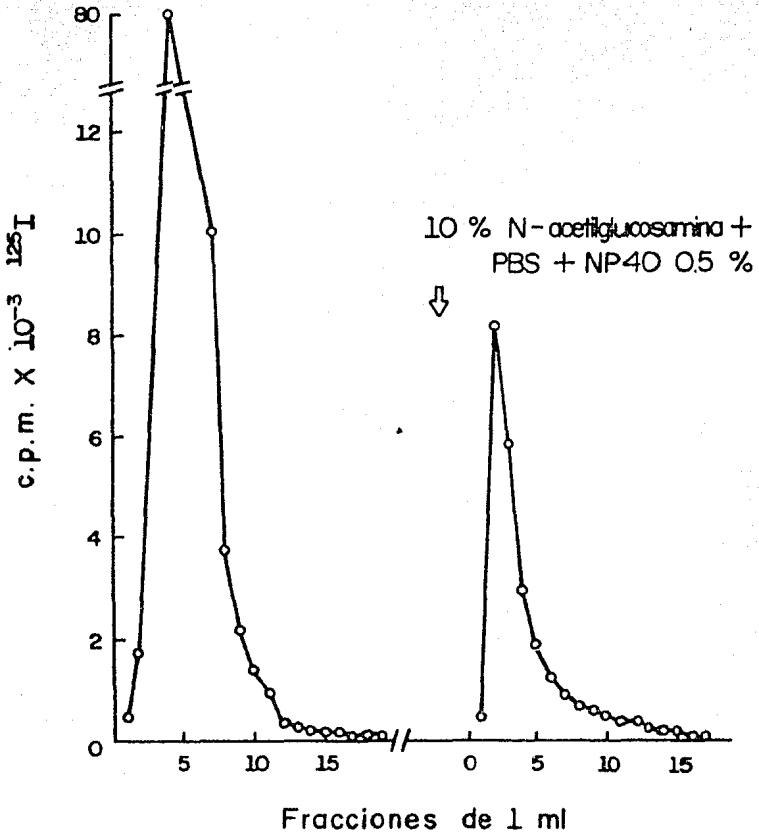


Fig. 17. Perfil de elución de la cromatografía de afinidad en Sepharosa 6B-WGA para la purificación de gp160 a partir de membranas plasmáticas de células LPC-1 solubilizadas en DOC-Na 0.5%.

TABLA III. RENDIMIENTO EN LA PURIFICACION DE LA GLICOPROTEINA TUMORAL gp160 A PARTIR DE CELULAS LPC-1 TARDIAS

Purificación de gp160	μg totales (1×10^6 ceq)	%
Células rotas	$47\,000 \pm 0.0$	100
Membranas plasmáticas	777.3 ± 0.07	1.65
Glicoproteína tumoral gp160	187.4 ± 69	0.4

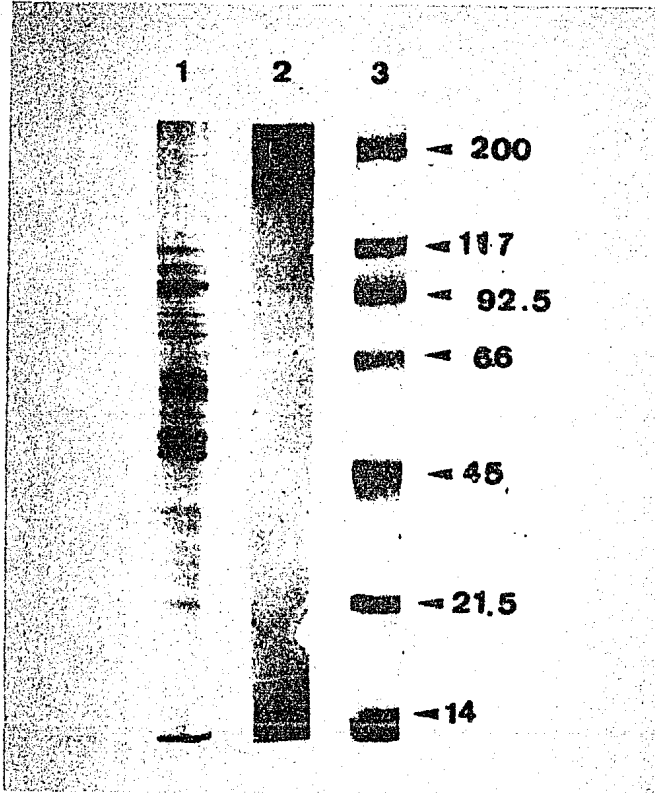


Fig. 18. Verificación de la pureza de la glicoproteína tumoral gpl60 por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Carril 1, membranas plasmáticas de células LPC-1 tardías solubilizadas con DOC-Na 0.5%. Carril 2, glicoproteína tumoral gpl60 purificada por cromatografía de afinidad en Sepharosa 6B-WGA (tinción de Schiff). Carril 3, marcadores de peso molecular: 14 000 d lisosima, 21 500 d --inhibidor de tripsina, 45 000 d ovalbumina, 66 000 d SAB, 92 500 d fosforilasa B, 117 000d β -galactosidasa, 200 000d miosina.

La incorporación de la proteína se siguió por c.p.m. y fue de aproximadamente el 60% del total de proteína. Considerando que la mitad de la proteína al momento de formarse el liposoma, queda orientada hacia el interior de este y la otra mitad hacia el exterior, solamente un 30% de la proteína queda expuesta para ser reconocida por los linfocitos T citotóxicos.

Para comprobar la homogeneidad de distribución de las proteínas en el liposoma, se llevó a cabo una prueba de inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos específicos contra antígenos H-2^d y gp160 más un anticuerpo anti-ratón acoplado a fluoresceína. Se observó que la fluorescencia producida por los liposomas conteniendo antígenos H-2^d incubados con anticuerpos anti-H-2^d es homogénea alrededor del liposoma, lo que nos indica que la proteína está distribuida a través de toda la superficie del liposoma. En los liposomas con gp160 incubados con anticuerpos anti-gp160 se observó también una fluorescencia homogénea en todo el liposoma, indicándonos que la glicoproteína está homogéneamente distribuida.

Los liposomas que no contienen ninguna de las dos proteínas no fluorescen.

IV. Inducción de Linfocitos T Citotóxicos

IV.1 Tratamiento de células tumorales con Mitomicina C

Las células tumorales P815 y LPC-1 tardías fueron tratadas con mitomicina C a diferentes tiempos, para determinar el tratamiento

Óptimo para que las células no se mueran, pero que dejen de reproducirse.

De acuerdo a los resultados obtenidos a partir de la viabilidad e incorporación de timidina tritiada de las células, 30 minutos de tratamiento con mitomicina C son suficientes (Tabla IV).

IV.2 Inducción de linfocitos T citotóxicos

Se indujo una respuesta de linfocitos T citotóxicos usando como estímulo células tumorales P815, LPC-1 tardías y células de bazo tratadas con mitomicina C. En la Fig. 19 se observa que tanto las células de bazo (control positivo) como las células P815 ($gp160^-$) son capaces de inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos mientras que las células LPC-1 tardías ($gp160^+$) no son capaces de inducir una respuesta inmune celular dirigida contra los antígenos H-2^d.

Posteriormente se indujo una respuesta de LTCs con membranas plasmáticas de células LPC-1 tardías y P815, donde se observó que las membranas plasmáticas de células P815 son capaces de inducir una respuesta de LTCs específicas, mientras que las de células LPC-1 tardías no (Fig. 19).

Estos resultados nos indicaban la actividad biológica de las proteínas de la superficie celular después de su purificación no se había perdido. Se probaron varias concentraciones de membranas a fin de determinar las condiciones óptimas para inducir una respuesta de LTCs con fragmentos subcelulares y se observa que 1 μ g de membranas, que

TABLA IV. TRATAMIENTO CON 100 μ g DE MITOMICINA C/1 X 10⁷ CELULAS TUMORALES

	30'	45'	60'	Normales
No. de células viables	5.3 X 10 ⁴	9 X 10 ³	2 X 10 ³	3.5 X 10 ⁵
c.p.m. ³ HTdR	5505 \pm 546	5149 \pm 287	5158 \pm 811	117260 \pm 9734

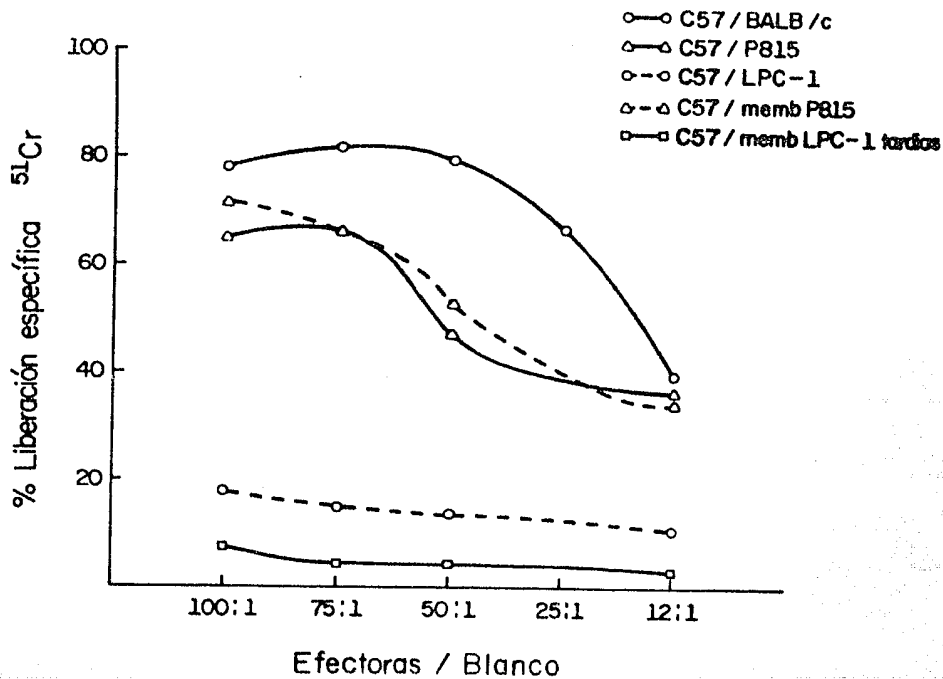


Fig. 19. Ensayo de citotoxicidad célula-célula de: ○—○ células de bazo de ratones C57BL/6 (H-2^b) estimuladas con células de bazo de ratones BALB/c (H-2^d), ○- - ○ células de bazo de ratones C57BL/6 estimuladas con células tumorales LPC-1 tardías. △—△ células de bazo de ratones C56BL/6 estimuladas con células P815 mitomícidas. △- - △ células de bazo de C57BL/6 estimuladas con membranas P815. □—□ células de bazo de C57BL/6 estimuladas con membranas plasmáticas de células LPC-1 tardías.

corresponde a 2.5×10^6 células es la concentración óptima para la inducción de la respuesta de LTCs.

Utilizando las mismas condiciones experimentales en lo que se refiere a cantidad de antígenos H-2, se indujo posteriormente una -- respuesta de LTC-anti-H-2^d con liposomas en los que se incorporaron los antígenos H-2^d.

El complejo liposoma-H-2^d es capaz de inducir una respuesta de LTCs relativamente poco eficiente que libera del 20 al 40% de ⁵¹Cr de las células blanco, pero si al momento de preparar los liposomas se le añade una matriz insoluble de membranas P815 (35) la respuesta aumenta hasta un 50% (Tabla V).

Resultados preliminares con liposomas a los que se han incorporado los antígenos H-2^d y la glicoproteína tumoral gp160 indican -- que en este caso no hay una inducción de linfocitos T citotóxicos dirigidos en contra de antígenos H-2^d.

TABLA V. INDUCCION DE LINFOCITOS T CITOTOXICOS POR LIPOSOMAS

	μg de H-2 ^d	μg de gp160	% liberación espe- cífica de ⁵¹ Cr
Liposomas-H-2 ^d	1	-	21
	4	-	36
Liposomas-H-2 ^d + matriz insoluble	1	-	32
	4	-	63
Liposomas-H-2 ^d gp160	1	4	10

DISCUSION

I. Purificación de Antígenos H-2^d y gp160

Se comprobó la pureza de las membranas plasmáticas utilizadas en la purificación de ambas proteínas, por microscopía electrónica, mostrandonos que la mayoría del material se encontraba en forma de vesículas de tamaño relativamente heterogéneo (Fig. 20). El grado de contaminación es pequeña y la cantidad de membranas obtenidas fue del 1.66% (157.5 ug) de la proteína celular total determinado por Lowry. Estos datos son comparables a los reportados por Burakoff (50), donde la cantidad de membranas plasmáticas obtenidas a partir de gradiente de sacarosa fue del 1 al 3%, presentando una ligera contaminación con retículo endoplásmico.

A las membranas plasmáticas purificadas se les agregó una alícuota de un extracto de células P815 o LPC-1 tardías marcadas con ¹²⁵I (5 x 10⁶ ceq del extracto de células marcadas por cada 10⁹ ceq de membranas plasmáticas), para poder seguir la purificación de los antígenos H-2^d y de la glicoproteína tumoral gp160 así como su incorporación a los liposomas.

La cantidad de antígenos obtenidos por cromatografía de afinidad en Sepharosa 4B-anti-H-2^d fue de 0.58% de la proteína celular total de 10⁹ células y la pureza de los antígenos obtenidos como se muestra en la figura 14 es alta (aproximadamente del 90%). Estos resultados son comparables a los reportados por Herrman y Mescher (34) en donde ellos -



Fig. 20. Microscopía electrónica de membranas plasmáticas purificadas por un colchón de sacarosa al - 41%. (30 000X).

obtienen 15 μg de antígenos H-2^d por cada 10^8 ceq a partir de cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales. En nuestro caso los antígenos H-2^d se purificaron de células del mieloma P815 debido a que este mieloma presenta de 2 a 6 veces más antígenos H-2^d en su superficie que una célula normal (34).

Por otro lado, la glicoproteína tumoral obtenida a partir de membranas plasmáticas de células LPC-1 tardías por cromatografía de afinidad en Sepharosa 6B-WGA fue del 0.4% (187.4 μg) por cada 10^9 células. Su pureza también es de aproximadamente un 90% ya que los geles en SDS-PAGE teñidos con Coomassie y plata no aparecen ninguna banda proteica contaminante. Datos anteriores encontrados en el laboratorio de la cantidad de gpl60 obtenida a partir de extracción con urea (67) fue de 40 μg de 57 mg de proteína total equivalente a aproximadamente 10^9 células. Es probable que la gpl60 obtenida por este procedimiento no sea biológicamente activa, ya que no posee su porción hidrófica debido a que la urea solamente extrae la porción extramembranal, de aquí el motivo de purificar la gpl60 por otros métodos. Se escogió el de cromatografía de afinidad en WGA, ya que está lectina es afín a residuos de N-acetilglucosamina y ácido siálico y como gpl60 es rica en ácido siálico (20 - 40 moles por molécula) era un procedimiento práctico.

II. Dosis/Respuesta de LTCs Generados por Fracciones Subcelulares

La dosis respuesta de LTCs in vitro por fracciones subcelulares de células P815 y LPC-1 tardías fué determinada con células de bazo de ratones C57Bl/6 inmunes y no inmunes. Se observó que la máxima

respuesta fue obtenida cuando las células se estimulaban con 1 µg de proteína equivalente a 2×10^6 células. Estos resultados nos indicaron que aún a través de los diferentes pasos de purificación de las membranas plasmáticas las proteínas de la superficie celular se mantienen biológicamente activas. También se puede observar que las membranas plasmáticas, en comparación con las células intactas, son menos inmunogénicas debido a que no generan una respuesta primaria de LTCs, pero si una respuesta secundaria. Resultados similares son reportados por Burakoff (50).

Probablemente está pérdida en la actividad podría ser el resultado de una desnaturalización parcial de la proteína, no necesariamente de toda la fracción, durante la purificación o debido a una inaccesibilidad de las moléculas de la superficie, como un resultado de que algunas membranas presentes se encuentren en forma de vesículas invertidas (inside-out). Esta pérdida en la capacidad de generar LTCs es una propiedad de las mismas membranas purificadas ya que al disminuir el número de determinantes moleculares se altera la presentación tridimensional del antígeno o se pierden algunos determinantes normalmente involucrados en la generación de LTCs (50).

III. Incorporación de Antígenos H-2^d y gp160 a Liposomas

La incorporación de las proteínas a los liposomas se hace al momento de prepararse los liposomas. Las glicoproteínas H-2^d son fácilmente incorporadas a las vesículas lipídicas por medio de diálisis del detergente que resulta en la formación de vesículas unilamelares en las

cuales la mayor parte del antígeno se encuentra expuesto en la superficie del liposoma (Fig. 21). La relación de antígeno H-2^d y gp160 incorporada a los liposomas fue de una molécula de antígenos H-2^d por dos moléculas de gp160. Esta relación es la misma que guarda una célula LPC-1 tardía y se obtuvo a partir de los µg de glicoproteína tumoral gp160 obtenida de un número conocido de células LPC-1 tardías solubilizadas con NP 40 0.5% y los µg de antígenos H-2^d obtenidos por Muratmatsu (57) de diferentes tipos de células normales y tumorales.

El número de moléculas de antígenos H-2^d y gp160 obtenidas con el número de Avogadro (6.023×10^{23} moléculas/mol) y el peso molecular de las proteínas, obteniéndose que por cada 157.5 µg de antígenos H-2^d se tienen 21.04×10^{14} moléculas y que 187 µg de gp160 corresponden a 7.03×10^{14} moléculas. La cantidad de antígeno H-2^d y gp160 incorporada fue de un 30%. Otro parámetro utilizado para comprobar la incorporación de los antígenos H-2^d a los liposomas fue una transferencia a papel de nitrocelulosa de liposomas con antígenos H-2^d y gp160 utilizando el mismo procedimiento que en la sección I.6.5 de materiales y métodos. Se observó que anticuerpos anti-H-2^d reconocen una banda proteica de peso molecular aproximado de 45 000 d que se encuentra incorporada a los liposomas que corresponderían a los antígenos H-2^d (Fig. 22).

VI. Inducción de una Respuesta de LTCs con Liposomas, Liposomas-H-2^d y Liposomas-H-2^d-gp160

La inducción de LTCs in vitro fue llevada a cabo utilizando células de bazo de ratones C57BL/6 inmunes estimuladas con el complejo liposomas, liposomas-H-2^d y liposomas-H-2^d-gp160. Se observa en los re-

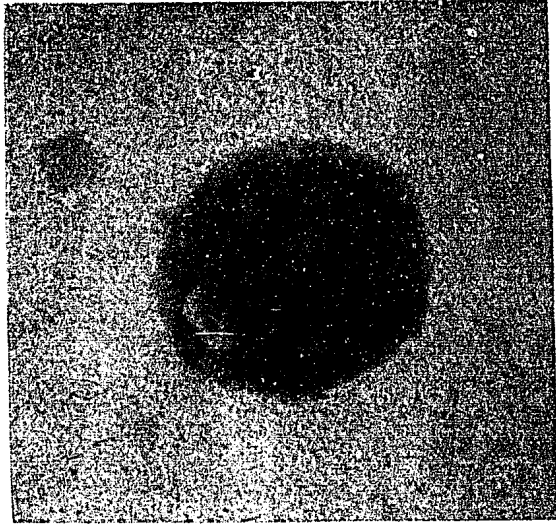


Fig. 21. Microscopía electrónica de li
posomas obtenidos por el mét
do de diálisis de detergente.
(50 000X).

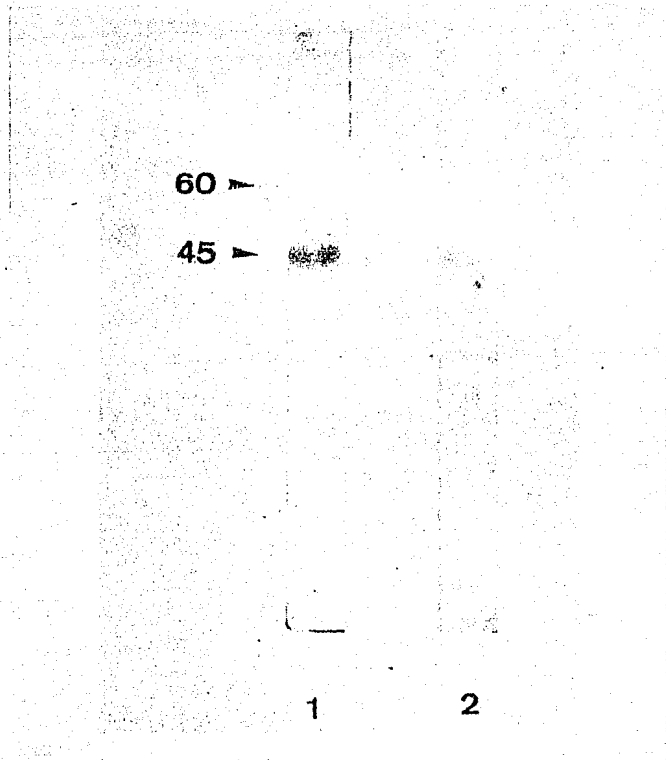


Fig. 22. Inmunotransferencia a papel de nitrocelulosa de liposomas con antígenos H-2^d y gp160 incorporados. Carril 1. antígenos H-2^d incubados con anticuerpos anti-H-2^d (control positivo). -- Carril 2. liposomas-H-2^d-gp160 incubados con anticuerpos anti-H-2^d.

sultados (Tabla V) que los liposomas por si solos no son capaces de inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos, y que los liposomas con los antígenos H-2^d incorporados son poco eficientes para inducir la respuesta de LTCs (20 - 40% de liberación específica de ⁵¹Cr). Esto se debe probablemente a las causas ya mencionadas anteriormente, o sea, que al disminuir el número de determinantes moleculares se altera la presentación tridimensional de los antígenos H-2^d además de la pérdida de algunos determinantes normalmente involucrados en la generación de LTCs. -- Herrman y Mescher (35) reportan que al incorporar una matriz de membranas plasmáticas insoluble en detergente no iónico, la capacidad de inducir una respuesta de LTCs secundaria aumenta al doble. Está matriz está compuesta principalmente de actina y un número pequeño de proteínas membranales de diferentes pesos moleculares que van desde 70 000 hasta -- 30 000 d y es probable que estas proteínas ayuden a que los antígenos -- H-2^d adquieran una conformación tridimensional parecida o igual a la que presentan en la superficie membranar de células intactas.

Nuestros resultados preliminares indican que los liposomas -- formados con antígenos H-2^d y matriz insoluble (150 ug por cada 300 nm-- les de fosfolípidos) son capaces de producir un 60% de lisis, mientras -- que el complejo liposoma-H-2^d-gpl60 no es capaz de inducir una respuesta de LTCs.

Esto nos sugiere que gpl60 se encuentra enmascarando a los -- antígenos de histocompatibilidad impidiendo el reconocimiento por LTCs. Falta probar si la presencia de gpl60 enmascara así mismo otros antígenos de histocompatibilidad como H-2^k y si es capaz de proporcionar una de

fensa a otro tipo de tumores del mismo haplotipo, y si la glicoproteína tumoral gp160 presenta otro tipo de funciones a parte del enmascaramiento y el mecanismo por el cual se dispara su producción.

ANEXO

I. LISTA DE REACTIVOS

Acetato de sodio (polvo)	Baker 3470
Acido C6lico (sal de sodio)	Sigma C-1254
Acido peri6dico	Baker 3-T-146
Acido tricloac6tico (cristales)	Baker 0414
Acrilanida	Bio-Rad 161-0106
Acido desoxic6lico (sal de sodio)	Sigma L42005
Azul de Bromofenol	Bio-Rad 161-0404
Azida de Sodio	Sigma 115
Bicarbonato de Sodio	GIBCO 895-1810
Bio-Gel A5m	Bio-Rad 151-1040
Cloruro de magnesio (cristales)	Baker 2444
Cloruro de potasio (cristales)	Baker 3040
Cloruro de sodio (cristales)	Baker 3624
E D T A	Sigma 2SS
D M S O	Limbros 4948
Fosfato de potasio dib6sico (polvo)	Baker 3252
Fosfato de potasio monob6sico anhidrido (cristales)	Baker 3246
4 H ₂ O	Baker 3818
Fenil metil sulfonil fluoruro	Sigma P-7626
Fuscina 6cida	Bio-Rad 161-0408
Glicina (polvo)	Bio-Rad 161-0718
L-Glutamina	GIBCO 320-5030
Hidr6xido de sodio	Baker 3722
Metaperyodato de sodio	Merk 6497
Metil-D- manopironosa	Calbiochem 462711
2-Mercaptoetanol	Bio-Rad 161-0710
Nitrato de plata	Merk 15855
N,N'-Metilen-bis-acrilami-a (BIS)	Bio-Rad 161-0200

II. LISTA DE EQUIPO

Aparatos

Potenciómetro	Beckman	Modelo 3500
Secador de geles	Bio-Rad	Modelo 224
Fuente de poder	Bio-Rad	Modelo 500
Cámara de electroforesis "slab gel" o geles de muro	Bio-Rad	Modelo 220
Cámara de electroforesis tubo gel	Bio-Rad	Modelo 155
Microscopio de luz con contraste de fase	American Optical	Modelo 2071
Sistema de cromatografía	LKB	Modelo 2137
Unidad de centrifugación	Beckman	Modelo TJ-R
Centrífuga baja velocidad	Beckman	Modelo TJ-6
Centrífuga alta velocidad	Sorvall Automatic	SS-3
Ultracentrífuga	Beckman	Modelo L5-50
Parrilla de calentamiento con agitación	UL	528C
Contador gamma	Autologic Abbott	

Material

Pipetas 1 ml	Falcon	7521
Pipetas 5 ml	Falcon	7543
Pipetas 10 ml	Falcon	7551
Tubos 12 x 75 mm (5 ml)	Falcon	2054
Tubos 17 x 100 mm (10 ml)	Falcon	2057
Tubos cónicos (50 ml)	Lux	4103
Tubos cónicos (15 ml)	Costar	4114
Tubos de centrífuga (15 ml)	Flow	4213-03315
Tubos de centrífuga (50 ml)	Flow	4236-03250
Viales de congelación	Scientific P	985731
Jeringas Conwall 2 ml	Scientific P	5173-2

BIBLIOGRAFIA

1. 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: 981.
2. Alder, W., Takigudin, T. and Smith, P.T. 1971. Phytohemagglutinin irresponsiveness in mouse methylcholanthrene sarcoma. *Cancer Res.* 31: 864.
3. Awdeh, Z.L., Williamson, A.R., Askonas, A.B. 1968. Isoelectric focusing polyacrylamide gel out its application to immunoglobulins *Nature* 219: 66.
4. Benacerraf, B. y Unanue, E.R. 1979. Tumor immunity. *Textbook of Immunology*. Ed: Benacerraf, B. Unanue, E.R., Williams, Baltimore, Lond. p. 196.
5. Biberfeld, P. and Johansson, A. 1975. Contact areas of cytotoxic lymphocytes and target cell: An electron microscopic study *Exp. Cell. Res.* 94: 79
6. Celis, E., Chang, T.W. y Eisen, H.N. 1979. Cyclical changes in susceptibility of a myeloma tumor (LPC-1) to immune destruction II. Periodic fluctuation during growth in normal and nude mice in culture. *J. Immunol.* 122: 959
7. Celis, E., Hale, A.H., Rusell, J.H. y Eisen, H. 1979. Cyclical changes in susceptibility of a myeloma tumor (LPC-1) to immune destruction. I. Changes in reactivity with cytotoxic T lymphocytes and anti-H-2^d sera. *J. Immunol.* 122: 954.
8. Celis, E. y Eisen, H.N. 1980. Interactions between a novel cell glycoprotein and the H-2K and H-2D antigens on myeloma tumor cells. *Eur. J. Immunol.* 10: 455.
9. Codrington, F.J. 1981. The masking of cancer cell surface antigens *En: The handbook of cancer Immunology*. Harold waters Ed. Vol. 8, p. 172.
10. Coggin, L.W. y Anderson, N.G. 1974. Cancer differentiation in embryonic antigens: some central problems. *Adv. Cancer Res.* 19: 105.
11. Currie, G. A. 1973. The role of circulating antigen as an inhibitor of tumor immunity in man. *Br. J. Cancer.* 28: 153.

12. Davidsohn, I. y Nelson, M.D. 1978. Sangre. En Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. Davidsohn, I., Henry, J.B. Ed. Salvat. 2a. Ed. p. 103.
13. Doljanski, F. and Kapeder, M. 1976. Cell surface shedding the phenomenon and its possible significance. *J. Theor. Biol.* 62: 253.
14. Ehrlich, P. 1906. *Collected Studies in Immunity*. McMillan Press, London.
15. Eisen, H. 1980. Cell surface antigens transfusion, transplantation and tumor immunity. 2nd. Ed. Eisen, H. Harper Row. Publishers, Philadelphia.
16. Esmon, N.C. and Little, J.R. 1976. Different mechanism for the modulation of TL antigens on murine lymphoid cell. *J. Immunol.* 117: 919.
17. Fathman, G. C. 1979. Preparation of mouse antisera against histocompatibility antigens. En: *Immunological Methods*. Lefkovits, I., Pernis, B. Ed. Academic Press. New York. p. 207.
18. Fink y Bevan, M.J. 1978. H-2 antigens of the thymus determine lymphocyte specificity. *J. Exp. Med.* 138: 766.
19. Forman, J. 1975. On the role of H-2 histocompatibility complex in determining the specificity of cytotoxic effector cells sensitized against syngenic TNP-modified-targets. *J. Exp. Med.* 142: 403.
20. Frye, L.D. and Frioy, G.J. 1975. Inhibition of mammalian cytotoxic cells by phosphatidylcholine acid its analogue. *Nature* 258: 333.
21. Gilmer, P.J., Mc. Connell, M.H. and Mc. Devitt, V.H. 1978. Insertion of Ia and H-2 alloantigens into model membrans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 902.
22. Gold, P. y Freedman, S.O. 1965. Specific carcinoembrionyc antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* 122: 467.
23. Golub, S.H. 1975. Host immune response to human tumor antigens. En: *Cancer: A comprehensive treatise*. Vol. IV. Editado por F.F. Becker. Plenum Press. New York.
24. Gomrad, E.V., Duprez, T., Reme, T. y Colomban, M.J. 1977. Exclusive involvement of H-2^b or H-2^d product_b in the interactions between T-killer lymphocytes and syngenic H-2^b or H-2^d viral lymphomas. *J. Exp. Med.* 146: 909.

25. Granger, A.G. and Kolb, W.P. 1968. Lymphocyte in vitro cytotoxicity. Mechanism of immune and nonimmune small lymphocyte mediated target cell destruction. J. Immunol. 101: 111
26. Hale, A.H., Celis, E., Rusell, J.H. y Eisen, N.H. 1979. Cyclic immune destruction. III. Periodic production of a cell surface glycoprotein and changes in reactivity with cytotoxic T cell and anti-H-2^d sera. J. Immunol. 122: 2245.
27. Hellstrom, K.E. y Hellstrom I. 1974. Lymphocyte mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumor antigens. Adv. Immun. 18: 209.
28. Henney, C.S. and Lichtenstein, L.M. 1971. The role of cyclic AMP in the cytolytic activity of lymphocyte. J. Immunol. 107: 610.
29. Henney, C.S., Gaffney, J. and Bloom, B.R. 1974b. On the relation of soluble mediators to cell mediated cytolysis. J. Exp. Med. 140: 837.
30. Henney, C.S. 1980. The mechanism of T. Cell-mediated lysis. Immunol. Today. 2:36.
31. Henney, C.S. and Gillis, S. 1984. Cell-mediated cytotoxicity. En: Fundamental Immunology. William, E., Paul, M.D. Editor. Raven Press, New York. p. 669.
32. Herberman, R.B. y Aoki, H.T. 1979a. Natural killer cells as antitumor effector cells. J. Natl. Cancer. Inst. 62: 441.
33. Herberman, R.B., Sjeu Kay, D.H., Ortaldo, J.R., Riccardi, C., Bonnard, G.D., Holden, H.T., Fagnani, R., Santoli, A. y Ducetti, P. 1979 b. Natural killer cells: characteristics and regulation of activity. Immunol. Rev. 44: 4370.
34. Herrmann, S.H. and Mescher, F.M. 1981. Lymphocyte recognition of H-2 antigen in liposomas. J. Supramol. Struct. Cell. Biochem. 16:121.
35. Herrmann, S. H., Mescher, M.F. 1981. Secondary cytolytic T lymphocyte stimulation by purified H-2K^b in liposomas. Proc. Natl. Acad. Sci. 78(4): 2488.
36. Hood, L., Steinmetz, M. y Malissen, B. 1983. Genes of the mayor histocompatibility complex of the mouse. Ann. Rev. Immunol. 1:579.
37. Howard, F.D., Ledbetter, J.A., Mehdi, S.Q., and Herzenberg, L.A. 1980. A rapid method for the detection of antibodies to cell surface antigens: A solid phase radioimmunoassay using cell membranes. J. Immunol. Methods. 38: 75.

38. Hubbard, A.L. y Cohn, Z. A. 1976. Specific labels for cells surfaces En: Biochemical Analysis of Membranes. Maddy, A.H. (Edit) Chapman and Hall, London. pp. 427.
39. Jaton, J., Brandt, D. Ch., Vassalli, P. 1979. The isolation and characterization of immunoglobulins, antibodies and their constituent polypeptide chains. En: Immunological Methods Lefkovits, I., Pernis, B. Ed. Academic Press. New York. p.44
40. 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: 1787.
41. Katz, D.H. y Dancerceraf, B. (Editores) 1974. The role of the products of the histocompatibility gene complex in immune responses. Academic Press. New York. pp. 780.
42. Kirkwood, J.M. and Gershon, R.K. 1974. A role for supressor T cells in immunological enhancement of tumor growth. Prog. Exp. Tumor. Res. 19: 157.
43. Klein, J. 1973-1974. Immunological surveillance against neoplasia Harvey Lect. 69:71.
44. Klein, J. 1975. Biology of the mouse histocompatibility H-2 complex. Springer-Verlang. New York. pp. 600.
45. Klein, J., 1979. The mayor histocompatibility complex of the mouse Science 203: 516.
46. 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.
47. Kuppers, R. and Henney, C.S. 1977. IX. Relationships between antigen recognition and lytic expression in killer T-cells. J. Immunol. 118: 71.
48. Law, L.W. y Appella, E. 1975. Studies of soluble transplantation and tumor antigens. En: Cancer: A comprehensive Treatise. Vol. IV. Editado por F.F. Becker. Plenum Press, New York. pp. 135.
49. Lehninger, L.A. 1975. Biochemistry. Worth publishers. Inc. 2a. Ed. p. 157.
50. Lemonnier, F., Mescher, M., Sherman, L., Burakoff, S. 1978. The induction of cytolytic T lymphocytes with purified plasma membranes. J. Immunol. 120: 1114.

51. Longhorne, J. y Lindhal, K.F. 1981. Limiting dilution analysis of precursors of cytotoxic T lymphocytes. En: Lefkovits, I., y Pernis, B. (Edit) Immunological Methods Vol. II. Academic Press, New York. pp 223.
52. Lowry, H., Rosenbrough, J., Farr, L. and Randall, J. 1951. Protein measurement with folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 143: 265.
53. Marchalonis, J.J., Cone, R.E. y Sauter, V. 1971. Enzymatic iodination aprobe for accesible surface proteins of normal and neoplastic lymphocytes. Biochem. J. 124: 921.
54. Martz, E. 1975. Early steps inspecific tumor cell lysis by sensitized mouse T lymphocytes. II. Electrolyte permeability increase in the target cell membrane concomitant with programming for lisis. J. Immunol. 117: 1023.
55. Martz, E. 1977. Mechanism of specific tumor cell lysis by alloimmune T lymphocytes. Resolution and characterization of discrete steps in the cellular interaction. Contemp. Top. Immunobiol. 7: 301.
56. Merrill, C. R., Goldman, D., Sedman, H. S. Eberl, M.H. 1981. Ultrasensitive Stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebro-spinal fluid proteins. Science 211: 1437.
57. Muramatsu, T. and Nathenson, S.G. 1970. Studies on the carbohydrate portion of membrane-located mouse H-2 alloantigens. Biochem 9(25): 4875.
58. Natheson, S.G. y Cullen, S. E. 1974. Biochemical properties and immunochemical genetic relations of mouse H-2 alloantigenetic relations. Biochem. Biophy. Acta 344 : 1.
59. Palladino, M.A., Old, L.J. y 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. 41:406.
60. Perkins, A.H. 1980. El complejo mayor de histocompatibilidad del humano. En: Fudenberg, H.H., Stites, P.D., Caldwell, J.L., Wells, V.J. Inmunología Clínica. 2a. Edición. Ed. Manual Moderno, pp, 181.
61. Perlam, P. Perlam, H. y Wigzel, H. 1972. Lymphocyte mediated cytotoxicity in vitro: induction and inhibition by humoral antibody and nature of effector cells. Transpl. Rev. 13: 91.
62. Peter, J.B. and Tseng-Fung, J. 1984. Oncogenes, Proto-oncogenes, and cancer. Diagnostic Medicine :36.

63. Plaut, M., Bubbers, J.E., Henney, C.S. 1976. Studies on the mechanism of lymphocytes-mediated cytotoxicity. VII. Two stages in the T-cell mediated lytic cycle with distinct requirements. *J. Immunol.* 116: 150.
64. Price, M.R. y Baedwim, R.W. 1975. Immunobiology of chemically induced tumors. En: *Cancer: Comprehensive Treatise. Vol. IV.* Editado por F.F. Becker. Plenum Press. New York. pp 259.
65. Reiser, R. and Wardale, J. 1981. Immunological Detection of specific proteins in total cell extracts by fractionation in gels and transfer to diazo-phenylthioether paper. *Eur. J. Biochem.* 114: 569.
66. Robbins, S.L. and Contran, R.S. 1979. Pathologic basis of disease. 2a. Edición. Ed. Saunders Company W.B. Philadelphia. London. p. 141.
67. Rosenstein, Y., Theelen, M., Sánchez, I., and Celis, E. 1985. Isolation, Purification and characterization of a mouse plasmacytoma cell surface glycoprotein involved in the resistance of the tumor cells to immune destruction. *J.N.C.I.* En prensa.
68. Selin, D., Wallach, D.F.H. and Fischer, H. 1971. Intercellular communication in cell-mediated cytotoxicity. Fluorescein transfer between H-2^d target cells and H-2^b lymphocytes in vitro *Eur. J. Immunol.* 1: 453.
69. Shreffler, D.C. y David, S.C. 1974. The H-2 major histocompatibility and the I immune response region: genetic variation, function and organization. *Adv. Imm.* 20: 125.
70. Silver, J. y Hood, L. 1974. Detergent solubilized H-2 antigens is associated with a small molecular weight polypeptide. *Nature*, 249: 764.
71. Soloski, M.J., Uhr, J.W., Flaherty, L.V., Vitetta, E.S. 1981. Qa-2, H-2K and H-2D alloantigens evolved from a common ancestral gene. *J. Exp. Med.* 153: 1080.
72. Stutman, O. 1975. Immunodepression & malignancy. *Adv. Cancer Res.* 22: 261.
73. Sura, S.N., Khorskaya, Y.V., Kadashidze, A. G., Foks, B.B. Svet-Moldavsky, G.I. 1967. Cytochemical study of interaction between lymphocytes and target cells in tissue culture. *Exp. Cell. Res.* 48: 656.
74. Szoka, F. and Papahadjopoulos, D. 1978. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 4198.

75. Ternynck, T. and Aurameas, S. 1976. Polymerization and Immobilization of proteins using Ethylchloroformate and Glutaraldehyde. Scandinavian, J. Immunol. Supp. 3: 29.
76. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 4350.
77. Weber, K. y Osborn, M. 1979. The reliability of molecular weigth determination by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis J. Biol. Chem. 244: 4406.
78. Wei-Zen, W. and Lindquist, R.R. 1981. Alloimmune cytolytic T lymphocyte activity, Triggering and expression of killing mechanism in cytolytic T lymphocytes. J. Immunol. 126: 513.
79. Zinkernagel, R.M. y Doherty, P.C. 1975. H-2 compatibility requirement for T-cell mediated lysis of target cells infected with lymphocyte choriomeningitis virus. J. Exp. Med., 141: 1427.