

03062-9
24.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

**"ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL
EN RATONES C57BL/6J Y EN LOS HIBRIDOS
(C57BL/6J x BALB/C) FRENTE A UNA LINEA
TUMORAL DEFICIENTE EN MOLECULAS DEL
COMPLEJO PRINCIPAL DE
HISTOCOMPATIBILIDAD, LR.4"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
(INMUNOLOGIA)**

PRESENTA

Q.FB. ROXANA DEL/RIO GUERRA

ASESOR DE TESIS

DR. GUILLERMO ALFARO MARTINEZ

SEPTIEMBRE 1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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).

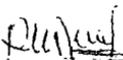
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Agosto de 1997.

Dr. ENRIQUE PIÑA GARZA
Encargado de la Dirección de la
UACPyP-CCH
Presente.

Por medio de la presente informo que la tesis "Estudio de la respuesta inmune humoral en ratones C57BL/6J y en los híbridos (C57BL/6J x BALB/c)F1 frente a una línea celular tumoral deficiente en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, L.R.4", que presenta la QFB. Roxana del Río Guerra con número de cuenta 9481246-2 y número de expediente 30942021, reúne ampliamente los requisitos de una tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto doy mi voto aprobatorio para que la tesis sea presentada en examen oral.

Atentamente



Dr. Raúl Mancilla Jiménez

Agosto de 1997.

Dr. ENRIQUE PIÑA GARZA
Encargado de la Dirección de la
UACPyP-CCH
Presente.

Por medio de la presente informo que la tesis "Estudio de la respuesta inmune humoral en ratones C57BL/6J y en los híbridos (C57BL/6J x BALB/c)F1 frente a una línea celular tumoral deficiente en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, LR.4", que presenta la QFB. Roxana del Río Guerra con número de cuenta 9481246-2 y número de expediente 30942021, reúne ampliamente los requisitos de una tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto doy mi voto aprobatorio para que la tesis sea presentada en examen oral.

Atentamente

Emma Melendro Lozano
Dra. Emma Melendro Lozano

Agosto de 1997.

Dr. ENRIQUE PIÑA GARZA
Encargado de la Dirección de la
UACyP-CCII
Presente.

Por medio de la presente informo que la tesis "Estudio de la respuesta inmune humoral en ratones C57BL/6J y en los híbridos (C57BL/6J x BALB/c)F1 frente a una línea celular tumoral deficiente en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, LR-4", que presenta la QFB. Roxana del Río Guerra con número de cuenta 9481246-2 y número de expediente 30942021, reúne ampliamente los requisitos de una tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto doy mi voto aprobatorio para que la tesis sea presentada en examen oral.

Atentamente

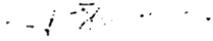

Dr. Guillermo Alfaro Martínez

Agosto, 1997.

Dr. Enrique Piña Garza
Encargado de la Dirección de la
UACPyP - CCH
Presente.

Por medio de la presente informo que la tesis "Estudio de la respuesta inmune humoral en ratones C57BL/6J y en los híbridos (C57BL/6J x BALB/c)F1 frente a una línea celular tumoral deficiente en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, LR.4", que presente la QFB. Roxana del Río Guerra con número de cuenta 9481246-2 y número de expediente 30942021, reúne ampliamente los requisitos de una tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto doy mi voto aprobatorio para que la tesis sea presentada en examen oral.

Atentamente

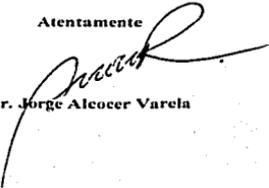

Dr. Pascal Héron Scohy

Agosto de 1997.

Dr. ENRIQUE PIÑA GARZA
Encargado de la Dirección de la
UACPyP-CCH
Presente.

Por medio de la presente informo que la tesis "Estudio de la respuesta inmune humoral en ratones C57BL/6J y en los híbridos (C57BL/6J x BALB/c)F1 frente a una línea celular tumoral deficiente en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, LR.4", que presenta la QFB. Roxana del Río Guerra con número de cuenta 9481246-2 y número de expediente 30942021, reúne ampliamente los requisitos de una tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto doy mi voto aprobatorio para que la tesis sea presentada en examen oral.

Atentamente



Dr. Jorge Alcocer Varela

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Guillermo Alfaro Martínez por permitirme realizar este trabajo bajo su asesoría.

A la Dra. Emma Verástegui Avilés por su valiosa crítica y comentarios para la realización de esta tesis y por compartir conmigo el gusto por la Inmunología.

A mi comité tutorial formado por los doctores: Rafael Saavedra y Lino Díaz de León, por sus acertados comentarios a este trabajo.

A los doctores que forman el jurado asignado: Raúl Mancilla, Emma Melendro, Guillermo Alfaro, René Pascal Herion y Jorge Alcocer, por sus valiosos comentarios a este trabajo.

Al Dr. Jorge Reyes por sus comentarios, su apoyo y por enseñarme todo lo que sabe sobre Citofluorometría.

A los Institutos de Investigaciones Biomédicas (U.A.C.P. y P. del C.C.H.), Instituto Nacional de Cancerología y al C.O.N.A.C. y T.

A los miembros del Departamento de Computación del INCan: Erick, Myrna, Letty, Benny y Alejandro.

A mis papás: Eustolio e Hilda por estar siempre conmigo y apoyarme en todo.

A mis hermanos y amigos: Heberto, Gabriel y Vianey por soportarme todo este tiempo. Gracias.

A los nuevos integrantes de la familia: Carlos Mariscal, el tremendo Carlitos y a Susana.

A mis compañeros del laboratorio: Emma, Gabriel, Claudia, Euclides, Venancio, Jorge, Ana, Graciela y Emmy.

A los amigos que compartieron conmigo esta experiencia maravillosa: Emma Verástegui, Claudia Martínez, Euclides Avila, Jorge Reyes, Gabriel del Rio, Susana Castro y Heberto del Rio. Gracias por su entusiasmo contagioso y por todo el tiempo y conocimiento que me brindaron.

A los nuevos amigos: Emma Verástegui, Claudia Martínez, Carlos Carranza, Euclides Avila, Gabriel Ramos y Emmy Estudillo.

A los amigos que siempre han estado presentes. GRACIAS.

DEDICATORIA

Al compañero de mi vida ALEJANDRO, porque al comenzar este trabajo comenzaron nuestros sueños. Gracias por todo tu apoyo y por tu sonrisa. Gracias por que vamos juntos.

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE
CANCEROLOGIA
EN LA DIVISION DE INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA-UNAM
BAJO LA SUPERVISION DEL DR. GUILLERMO ALFARO MARTINEZ

ABREVIATURAS EMPLEADAS

Acido desoxirribonucleico	ADN
Acido ribonucleico	ARN
Acido ribonucleico mensajero	ARNm
Agua destilada	H ₂ O
Albúmina de suero bovino	ASB
Amortiguador de fosfatos	PBS
Anhidrido	anh.
BALB/cAnN, cepa de ratones	B/c
BALB/k, cepa de ratones	B.k
C3HeB/FeJ, cepa de ratones	C3H
C57BL/6J, cepa de ratones	B6
Cadena ligera	CL
Cadena pesada	CP
Células asesinas naturales	AN
Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	CCDA
Complejo principal de histocompatibilidad	CPH
Diacilglicerol	DAG
Factor de crecimiento del nervio	NGF
Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	GM-CSF
Factor de necrosis tumoral	TNF
Fosfatidil inositol bifosfato	PIP2
Fosfatidil inositol-3 cinasa	PI3-k
Fosfolipasa C	PLC
Gramos	g
Gramos/mililitro	g/ml
Guanosin difosfato	GDP
Guanosin trifosfato	GTP

Hora	h
Inmunoglobulina	Ig
Inmunoglobulina de membrana	Igm
Interferón	IFN
Interleucina	IL
Linfocitos T citotóxicos	Tc
Linfocitos T de ayuda	Ta
Lipopolisacáridos	LPS
Litro	l
Médula osea	MO
Miligramo	mg
Microcurie	μCi
Microlitro	μl
Millilitro	ml
Milimolar	mM
Minuto	min
Mitomicina C	MMC
Molar, solución	M
Normal, solución	N
Ortofenilendiamina	OFD
Proteína activante de GTPasa	GAP
Proteína cinasa activada por mitógenos	MAPk
Proteína tirosina cinasa	PTK
Receptor para antígenos de células B	RCB
Región constante	C
Región determinante de complementaridad	CDR
Región de diversidad	D
Región variable	V
Región de unión	J
Revoluciones por minuto	rpm
Suero fetal bovino	SFB

Segundo
Temperatura
Trifosfato de inositol

s
T
IP3

INDICE GENERAL

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION	4
CAPITULO I	
MARCO TEORICO	
- Introducción	6
- Respuesta inmune celular contra células neoplásicas	
* Linfocitos T	7
* Células AN y macrófagos	8
* Mecanismos de evasión inmune por células tumorales	8
- Respuesta inmune humoral contra células neoplásicas	
* Anticuerpos anti células neoplásicas	11
* Desarrollo de la respuesta humoral	:
* Activación de células B	17
CAPITULO II	
OBJETIVOS	21
CAPITULO III	
MATERIAL Y METODOS	
- Animales	23
- Líneas celulares	23
- Obtención de células mononucleares	24
- Viabilidad celular	24
- Tratamiento de células con Mitomicina C	25
- Protocolos de inmunización	25
- Adsorción de suero inmune	26
- Citofluorometría de flujo	27

- Transferencia pasiva de suero	28
- Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos (ELISA)	28
- Marcaje radiactivo de células	29
- Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	29
CAPITULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSION	31
- Respuesta inmune humoral anti LR.4 en ratones C57BL/6J	32
* Inducción y caracterización de anticuerpos anti LR.4	32
* Algunas propiedades de los determinantes antigénicos identificados en la línea celular LR.4	36
* Protección de ratones C57BL/6J conferida por el antisuero anti LR.4	38
- Respuesta inmune humoral anti LR.4 en ratones híbridos, ...	39
* Características generales del crecimiento de LR.4 en la cavidad peritoneal de ratones B6C	40
Inducción y caracterización de anticuerpos anti LR.4	42
* Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	43
* Determinación del isotipo de los anticuerpos anti LR.4	44

CAPITULO V	
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFIA	49
APENDICE	
Tablas y figuras	APENDICE A
Amortiguadores	APENDICE B
Soluciones	APENDICE C
Medios de cultivo	APENDICE D

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

La línea celular LR.4 (H-2^c) fué aislada in vivo al transplantar la línea celular L5178Y (H-2^d, linfoma de células T) en ratones que expresaban el haplotipo H-2^a (A/J). La capacidad de crecer a través de barreras alogénicas fué confirmada y extendida a ratones que expresaban uno de distintos haplotipos (H-2^a, H-2^b y H-2^k) o en animales no endogámicos por Nava y cols (1992). Con excepción de los ratones C57BL/6J (H-2^b), en los cuales el tumor fué rechazado o establecido en forma crónica (200 días), el resto de los animales sucumbieron al tranplante.

La propiedad de crecer en forma irrestricta en distintos tipos de ratones es debida, al menos en parte, a un conjunto de alteraciones genéticas que repercuten en la expresión de moléculas de clase I y clase II del CPH (Nava, G., et al. 1992). El análisis genético de las células reveló que: (a) la línea celular en estudio era portadora de deleciones en los genes que codifican para la β 2-microglobulina e IA β , (b) los genes que codifican para moléculas de clase I estaban anormalmente metilados y, (c) los arreglos de los genes que codifican para la subunidad β del RCT no eran productivos. La consecuencia de estos defectos genéticos se tradujo en la falta de expresión de los mensajeros correspondientes. La ausencia de transcritos para IA α , IE α e IE β fué detectada también, pero los datos obtenidos en "Southern blots" no permitieron determinar la causa. El análisis de la superficie celular realizado con antisueros anti H-2^d o anticuerpos monoclonales en contra de CD4, CD8 o CD25 no permitió detectar estas moléculas en la

superficie.

La relevancia de la respuesta humoral en el rechazo/control del tumor en ratones C57BL/6J se fortaleció al demostrarse que LR.4 es resistente a células AN y LAK, y por la incapacidad de inducir LTC en contra de la misma bajo distintas condiciones experimentales (Verastegui, E., et al. 1997). Además, se identificó in vitro actividad lítica en contra de LR.4 mediada por anticuerpos y células AN (Verastegui, E., et al. 1997).

Por lo anterior, se consideró que era necesario obtener mayor información sobre la respuesta humoral inducida en ratones C57BL/6J y determinar si la resistencia de los ratones C57BL/6J a LR.4 tenía un carácter dominante o recesivo en los híbridos (C57BL/6J x BALB/c)_n. Los resultados que pudieran obtenerse en un proyecto de esta naturaleza contribuirían al conocimiento de la respuesta inmune en contra de los tumores malignos.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

CONSIDERACIONES TEORICAS

INTRODUCCION

La principal característica del sistema inmune es distinguir entre lo propio y lo extraño (Janeway, C.A. 1993; Marrack, P., et al. 1993).

Las células neoplásicas difieren de las células normales en algunas características importantes, tales como la pérdida de los mecanismos normales en el control del crecimiento celular, capacidad invasiva o el decremento en la sensibilidad a drogas, por mencionar algunas. Estas alteraciones se deben, principalmente, a mutaciones que dan como resultado inestabilidad genética y conducen a un desarrollo celular anormal (Hartwell, L.H., et al. 1994; Urban, J.L., et al. 1992). Estas diferencias celulares no solamente conducen a un crecimiento anormal sino que involucran diferencias a nivel del proceso de diferenciación celular. Algunos estudios clínicos (Klein, G., et al. 1985; Vogelstein, B., et al. 1993) han reportado que se requieren múltiples cambios genéticos para que una célula llegue a ser cancerosa y esto se ve reflejado en el incremento de padecimientos oncológicos en pacientes de edad avanzada.

Peter C. Nowell (1976) propuso que las células neoplásicas podían tener mutaciones y que esto conducía a inestabilidad genética, de esta manera se alteraba el proceso de diferenciación celular. Posteriormente se han hecho trabajos (Fischel, R., et al. 1993; Hanawalt, P.C., et al. 1986; Nowell, P. 1986) que confirmaron estas observaciones. Por ejemplo, las

mutaciones a nivel de los genes que reparan el ADN predisponen a neoplasias, los síndromes hereditarios (como ataxia telangiectásica) se caracterizan por su alta susceptibilidad a agentes que dañan al ADN y conducen a cáncer, etc.

RESPUESTA INMUNE CELULAR

Linfocitos T

Las mutaciones ocurridas en las células neoplásicas (como las mencionadas anteriormente) conducen a la formación de proteínas mutadas. De esta manera, los cambios ocurridos en las células cancerosas pueden ser detectados por el sistema inmune, ya sea como péptidos derivados de proteínas de origen viral, de proteínas propias no mutadas, de proteínas propias sobreexpresadas o como péptidos derivados de proteínas mutadas (Loyd, J.O. 1992; Roth, C., et al. 1994; Tjoo, B.A., et al. 1994). Estos péptidos pueden ser presentados por células inmunes (células presentadoras de antígenos o bien, la propia célula tumoral) en el contexto de moléculas de clase I o II del complejo principal de histocompatibilidad a linfocitos T CD8+ o CD4+, respectivamente (Knuth, A., et al. 1991; Apasov, S., et al. 1993; Ostrand-Rosenberg, S. 1994; Slingluff, C.L., et al. 1994; Coulie, P., et al. 1993; Coulie, P., et al. 1993a; Urban, J.L., et al. 1992; Townsend, A., et al. 1989).

CELULAS ASESINAS NATURALES Y MACROFAGOS

Las células asesinas naturales y los macrófagos también contribuyen a la inmunidad antitumoral del huésped, ya sea por mecanismos citotóxicos (contacto célula-célula o a través de CCDA), a través de diversas citocinas que secretan (IL-12, TNF- α , IL-1, IFN- γ) y/u otras sustancias solubles como prostaglandinas. Los factores solubles se ha visto que actúan en las células tumorales ya sea modificando su capacidad proliferativa o directamente su capacidad metastásica (Brittenden, J., et al. 1996; Klein, E., et al. 1993; Cui, S., et al. 1994; Mantovani, A., et al. 1992).

La respuesta inmune celular contra las células cancerosas se ha estudiado in vitro por más de dos décadas en muchos laboratorios de investigación (Anichini, A., et al. 1987). La relevancia in vitro de los linfocitos T citotóxicos que reconocen a los tumores ha sido evidenciada por cultivos autólogos de linfocitos con células tumorales. Este tipo de respuesta ha sido considerada la más eficaz en contra de células neoplásicas (Lloyd, J.O. 1992; Slingluff, C.L., et al. 1994; Townsend, A., et al. 1989; Tanaka, K., et al. 1988).

MECANISMOS DE EVASION INMUNE POR CELULAS TUMORALES

Existen algunas condiciones que permiten a las células tumorales escapar del control inmunitario:

I.- Alteraciones en la expresión de moléculas de clase I del

CPH:

La disminución en la expresión de moléculas de clase I del CPH ocurre principalmente en leucemias, linfomas y tumores sólidos (Browning, M.J., et al. 1992; Schrier P.I., et al. 1993). Se ha aceptado que la ausencia en la expresión de moléculas del CPH y por consecuencia la incapacidad de las células para presentar péptidos antigénicos, derivados de tumores, a LTC puede conducir a un escape del control inmunitario hacia éstas células (Levitsky, H.I., et al. 1994; Ferrone, S., et al. 1995).

Se han reportado algunas causas que conducen a la disminución o a la falta en la expresión de moléculas del CPH por las células tumorales. Entre éstas causas se incluyen la pérdida en los genes que codifican para los transportadores de péptidos (TAP) como en la línea murina RMA-S (Restifo, N., et al. 1993) y en carcinomas cervicales humanos (Cromme, F.V., et al. 1994), mutaciones en el gen de la β -2 microglobulina como en la línea de melanoma SK-MEL-33 (Wang, Z., et al. 1993; Roth, C., et al. 1994) o en la línea murina LR.4 (Nava, G., et al. 1992), entre otros mecanismos.

II.- Ausencia de moléculas coestimuladoras (B7-CD28/CTLA-4):

Para que exista una respuesta de células T hacia péptidos antigénicos presentados por moléculas del CPH se requiere una señal coestimuladora, generalmente proveniente de las células presentadoras de antígenos (células B activadas, macrófagos o células dendríticas). La activación de células T, a través de

su receptor para antígenos (RCT), sin señales coestimuladoras, les induce un estado de anergia, que se caracteriza por la ausencia en la producción de IL-2 y en la proliferación en respuesta a exposiciones subsecuentes con el antígeno (Schwartz, R.H. 1990; Schwartz, R.H. 1996; Roger, R., et al. 1996).

Aunque a nivel molecular todavía no se conoce bien el fenómeno de anergia de células T (Lombardi, G., et al. 1994), existen evidencias que sugieren el requerimiento de la interacción de sus antígenos de superficie CD28 y/o CTLA-4 con los ligandos CD80/CD86 (B7.1/B7.2) en la célula presentadora de antígenos para la activación completa (Leung, H.T., et al. 1994).

III.- Presencia de factores solubles inmunosupresores:

Aparte de los cambios que pueden ocurrir en las células tumorales que las conducen a evadir los mecanismos inmunes de vigilancia contra tumores, también se han detectado factores inmunosupresores secretados por células neoplásicas que contribuyen al escape inmunológico.

Entre los factores secretados por células neoplásicas, el mejor caracterizado es el factor de crecimiento transformante (TGF β). Se ha visto que inhibe la actividad de varias citocinas incluyendo la IL-2, IL-4 e IFN- γ . También inhibe la proliferación de células T y B y la generación de LTC. Otros trabajos han demostrado que el TGF β bloquea la actividad de células AN e induce una disminución en la expresión del

receptor para la IL-2 y de moléculas del CPH (Sulitzeanu, D. 1993; Kroemer, G., et al. 1993; Paul, W.E., et al. 1994).

Otro factor importante con propiedades inmunosupresoras es la IL-10 originalmente llamada factor de inhibición de la síntesis de citocinas (CSIF). D'Andrea y cols. (1993) demostraron que la IL 10 es capaz de inhibir el efecto de la IL-12, producida por células mononucleares humanas, sobre la proliferación de células asesinas naturales. Además, tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de varias citocinas por lo que se le considera un fuerte supresor de la función de células T, AN y macrófagos (Fiorentino, D.F., et al. 1991; De Waal Malefyt, R., et al. 1991; Howard, M.C., et al. 1992; Knuth, A., et al. 1991).

RESPUESTA INMUNE HUMORAL

ANTICUERPOS ANTI NEOPLASIAS

Existen mecanismos alternativos del sistema inmune para el reconocimiento de las células neoplásicas que involucran la producción de anticuerpos. Estos también son capaces de reconocer proteínas propias mutadas, proteínas normales sobre expresadas o componentes modificados (v.g. el nivel de glicosilación) pero expresados en la superficie celular (Urban, J.L., et al. 1992; Loyd, J.O. 1992; Tzyy-Choouwu. 1994; Knuth, A., et al. 1991; Lloyd, K.O., et al. 1989; Lloyd, J.O. 1981; Houghton, A.N. 1994).

En las últimas dos décadas se ha demostrado, en personas con padecimientos oncológicos, la presencia de células B y/o T que reconocen antígenos expresados por células neoplásicas autólogas. En los cánceres humanos, a diferencia de la mayoría de los murinos (Boon, T., et al. 1978), el sistema inmune reconoce antígenos expresados por tumores así como expresados en células de tejido normal. Así, los mecanismos de tolerancia inmunológica, al parecer, no eliminan el repertorio linfoide en contra de las células normales.

El índice de pacientes que presentan anticuerpos contra glicolípidos de superficie celular (principalmente gangliósidos, G) es alto (Lloyd, K.O., et al. 1989). Como ejemplos de éstos podemos mencionar los anticuerpos anti G₂ que reconocen tumores de origen neuroectodérmico (Cahan, L.D., et al. 1982). También se encuentran los anticuerpos anti G₃ y G₃ que selectivamente reaccionan con células de melanoma (Yamaguchi, H., et al. 1987).

Por otra parte, varios grupos de investigadores han caracterizado la respuesta inmune humoral y celular en pacientes con melanoma (Cai, X., et al. 1995; Vijayasaradhi, S., et al. 1990; Shih, F-M., et al. 1994), encontrándose que los anticuerpos generados reconocen la proteína gp95/p97 presente en las células de melanoma. En el modelo murino, la inmunización de los animales con un derivado del virus de vaccinia que expresa el antígeno p97 (Hu, S-L., et al. 1988) se induce la producción de anticuerpos y la proliferación de células T. Además, los ratones inmunizados con éste virus recombinante son capaces de rechazar células de melanoma que

expresan la proteína p97 mientras que éstos mismos ratones permiten el crecimiento de tumores negativos a p97 (Estin, C.D. et al. 1988). También se han encontrado autoanticuerpos en pacientes con melanoma metastásico con reactividad en contra de la glicoproteína gp75, relacionada al producto del gen de la tirosinasa, esta proteína es una enzima que cataliza la formación de melanina (Vijayasaradhi, S., et al. 1991). Utilizando anticuerpos monoclonales, obtenidos de ratones, en contra de gp75 se ha demostrado que la transferencia pasiva de estos anticuerpos en ratones que tienen células tumorales de melanoma B16 inducen un rechazo a tumores previamente establecidos y también producen autoinmunidad en contra de melanocitos (Roth, C., et al. 1994).

Otro ejemplo de anticuerpos antitumorales es el presentado en pacientes con cáncer de mama, en donde el antígeno que reconocen estos anticuerpos es el producto del gen HER-2/neu (Disis, M.L., et al. 1994), el cual es una proteína transmembranal tipo-receptor con una masa molecular de 185 kD (p185) y cuya función pudiera estar asociada con la actividad de tirosina-cinasa.

Existen otros modelos de cáncer en ratones en donde se han detectado la presencia de anticuerpos antitumor, tal es el caso de los ratones inoculados con sarcomas inducidos con metilcolantreno en donde se detectan anticuerpos en contra de la molécula supresora de tumor p53 (Deleo, A.B., et al. 1979). Los trabajos de Alfaro y cols. (1992) y de Nava y cols. (1992) demostraron, en ratones C57BL/6J, la presencia de anticuerpos citotóxicos en contra de las líneas tumorales murinas S180 y

LR.4, respectivamente.

Estas y otras evidencias nos permiten concluir que existe un repertorio inmune B en contra de neoplasias; sin embargo, no puede asegurarse si las respuestas por anticuerpos son respuestas específicas contra las células tumorales o bien, son el resultado de una respuesta inmune inespecífica. En los últimos años se le ha dado un papel importante a los anticuerpos monoclonales (marcadores tumorales) no solo como reactivos para probar tumorigénesis y patogénesis, sino también en el uso potencial como tratamiento inmunoterapéutico (Dyer, M.J.S., et al. 1989; Ritz, J., et al. 1981; Meeker, T.C., et al. 1985; Miller, R.A., et al. 1982; Foon, K.A., et al. 1984; Grossbard, M.L., et al. 1992).

DESARROLLO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL

La capacidad del sistema inmune para reconocer estructuras antigénicas extrañas depende, en gran parte, de los anticuerpos generados por las células B y del reconocimiento por células T. Aunque el reconocimiento por ambas células es distinto, las dos poblaciones son capaces de reconocer a una amplia gama de agentes extraños.

A diferencia de los linfocitos T que reconocen péptidos asociados con moléculas del CPH, los anticuerpos principalmente reconocen estructuras complejas, en forma tridimensional y generalmente son multivalentes (Humphrey, J.H. 1981; Brunswick, M., et al. 1988; Pike, B.L., et al. 1987).

La subunidad básica de una inmunoglobulina está formada por dos cadenas glicoproteicas de 55 kDa (CP) y dos cadenas glicoproteicas de 25 kDa (CL) aproximadamente, asociadas no covalentemente por puentes disulfuro (Max, E.E. 1993). Existen dos tipos de cadenas ligeras: λ y κ , y 5 tipos de cadenas pesadas: μ , δ , γ , α y ϵ , las que dan el nombre a los subtipos de Ig (IgM, IgD, IgG, IgA e IgE).

En cada subunidad básica de inmunoglobulina se encuentran dos regiones de las cuales, una es la región de unión al antígeno, altamente variable en la secuencia se aminoácidos región Fab (en la cual se encuentran áreas de hipervariabilidad, no definidas por cortes con enzimas) y la otra región que es relativamente constante en su secuencia de aminoácidos y es en donde reside la función efectora de los anticuerpos (Fc). Así, la IgM tiene la capacidad de iniciar la activación del complemento por la vía clásica al unir al componente C1q (Roitt, I., et al. 1993; Abbas, A.K., et al. 1994; Roitt, I.M. 1988; Carayannopoulos, L., et al. 1993); la IgG aparte de unir a la proteína del complemento C3b (Roitt, I., et al. 1993; Abbas, A.K., et al. 1994; Roitt, I.M. 1988; Carayannopoulos, L., et al. 1993) y de atravesar la placenta, es capaz de unirse a receptores Fc presentes en varios tipos de células inmunes y, de esta manera, inducir una actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpos (Ravetch, J.V. 1994; Amigorena, S., et al. 1992; Vance, B.A., et al. 1993; Fridman, W.H. 1993); la IgE se une a receptores específicos en basófilos y en mastocitos e induce la liberación de agentes inflamatorios (Roitt, I., et al. 1993; Abbas, A.K., et al. 1994; Roitt, I.M. 1988; Carayannopoulos, L., et al. 1993;

Ravetch, J.V. 1994); la IgA es la principal clase presente en secreciones y la IgD sin función aún conocida (Roitt, I., et al. 1993; Abbas, A.K., et al. 1994; Roitt, I.M. 1988; Carayannopoulos, L., et al. 1993).

Como ya se mencionó, aparte de tener diversas funciones, los anticuerpos tienen una capacidad extensa en su repertorio para reconocer antígenos. Esta diversidad está dada, principalmente, por las combinatorias de las recombinaciones que ocurren entre los múltiples segmentos génicos que codifican las regiones variables, por la imprecisión (con que se producen estas recombinaciones y por mutaciones puntuales a este nivel (Max, E.E. 1993; Blackwell, T.K., et al. 1989; Abbas, A.K., et al. 1994; Roitt, I., et al. 1993; Schatz, D.G. 1992; Yancopoulos, G.D., et al. 1986; Gellert, M. 1992; Lieber, M.R. 1991; Hood, L.E., et al. 1984).

Estos eventos se llevan a cabo durante la ontogenia de las células B en la médula ósea (Rolind, A., et al. 1993; Kincade, P.W., et al. 1993; Law, C.L., et al. 1994; Uchida, N., et al. 1993; Kantor, A.B., et al. 1993). En el ratón, el primer tipo celular que sintetiza un producto detectable de los genes de Ig (característico del linaje B) es la célula pro/pre-BI. Esta célula posee la cinasa de tirosina de proteínas c-kit, la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), los genes activadores de la recombinación (RAG)-1 y -2, la cadena sustituta L y la molécula CD43; sin embargo, no posee la cadena μ citoplásmica y solamente muestra rearrreglos DJ a nivel de ADN (Blackwell, T.K., et al. 1989; Rajewsky, K. 1992). La transición al estado celular pre-BII se caracteriza por una

disminución de la expresión de c-kit y TdT y el aumento en la expresión de CD25. En este estadio, los linfocitos tienen al menos un locus de IgH rearrreglado (Blackwell, T.K., et al. 1989; Yancopoulos, G.D., et al. 1986).

El paso del estado pre-BII Igm⁺ al estado de célula B inmadura Igm⁺, no es muy bien conocido. Se sabe que la IL-7, producida por las células estromales de la MO es un factor de maduración para la célula pre-B (Gellert, M. 1992; Hood, L.E., et al. 1984). Esta célula inmadura sale de la MO a circulación y a tejido linfoide en donde continua su maduración a célula B madura (Blackwell, T.K., et al. 1989; Gellert, M. 1992; Lieber, M.R. 1991) (ver Figura 1, Apendice A).

ACTIVACION DE CELULAS B

Cuando los linfocitos B salen de la médula ósea a la periferia, se encuentran en un estado de reposo (fase G₀ del ciclo celular). El contacto del antígeno específico con la Igm ocasiona una serie de procesos bioquímicos en el interior celular.

Una de las consecuencias inmediatas del entrecruzamiento del receptor (Igm) por el antígeno, es la fosforilación de residuos de tirosina de una serie de proteínas blanco. Esto es llevado a cabo por cinasas de tirosinas de proteínas (PTK), las cuales incluyen miembros de la familia Src (Fyn, Lyn y Blk) y más tardíamente cinasas relacionadas a la familia Syk (Pleiman, C.M., et al. 1994; Gold, M.R., et al. 1990; Gold, M.R., et al. 1991. DeFranco, A.L. 1993; Clark, E.A., et al. 1991; Williams,

G.T., et al. 1994).

Se han obtenido evidencias experimentales que demuestran la existencia de una asociación física entre las PTKs y el receptor para antígeno de las células B (RCB) a través del heterodímero $I\alpha/I\beta$. Esta asociación es mediada por una secuencia conservada DCSM (Asp-Cys-Ser-Met) en la cadena α . Además, existen secuencias ARAM en ambas cadenas del heterodímero, las cuales, al ser fosforiladas (mecanismo no descrito) pueden unirse fuertemente a las PTKs a través de los dominios SH2 (William, G.T., et al. 1994; Cambier, J.C., et al. 1994; DeFranco, A.L. 1994; Songyang, Z., et al. 1993).

Se sabe que las cinasas de tirosinas de la familia Src interactúan con proteínas efectoras para la transducción de las señales. Estas proteínas son PLC γ 1 y γ 2, PI3-k, MAPK, p95^{vav}, p62, p190 y rasGAP (Clark, E.A., et al. 1991; Williams, G.T., et al. 1994; Cambier, J.C., et al. 1994; DeFranco, A.L. 1993; Songyang, Z., et al. 1993).

Otro proceso bioquímico que ocurre después del entrecruzamiento del RCB es la hidrólisis de fosfolípidos de la membrana que contienen inositol, especialmente fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), por fosfolipasa C (PLC). Los productos resultantes de esta hidrólisis son el diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) que conducen a la activación de isoformas de cinasas de proteínas C (PKC) y la elevación de calcio libre citosólico, respectivamente (Pleiman, C.M., et al. 1994; Bijsterbosch, M.K., et al. 1985). Ambos productos son segundos mensajeros y

sus proteínas blanco pueden estar implicadas en la transcripción y en la traducción de ciertos genes (Cambier, J.C., et al. 1994; DeFranco, A.L. 1993).

Aparte de los procesos bioquímicos mencionados anteriormente, también se encuentran la activación de p21^{ras} la cual regula a raf e inicia una activación secuencial de ERK2 cinasa y MAPk (Pleiman, C.M., et al. 1994; Cambier, J.C., et al. 1994; DeFranco, A.L. 1993; Kim, K-M., et al. 1993), y la fosforilación en la posición 3 de fosfolípidos de membrana que contienen el anillo inositol a través de la enzima fosfatidilinositol 2-cinasa (PI3-k) y los principales productos de esta reacción son PI-3, 4-P2 y PI-3,4,5-P2; sin embargo, hasta el momento se desconocen los mecanismos por los cuales los fosfoinosítidos 3-fosforilados regulan la conducta celular (Pleiman, C.M., et al. 1994; Cambier, J.C., et al. 1994; Kim, K-M., et al. 1993).

Los eventos bioquímicos producidos por el entrecruzamiento del RCB, mencionados anteriormente, conducen a los linfocitos B a la producción de anticuerpos con una determinada especificidad en contra de un antígeno. A este nivel la presencia de citocinas producidas principalmente por célula T son indispensables para la generación de células B de memoria (Colle, J-H., et al. 1990; Berek, C. 1993; Gray, D. 1993), el cambio de clase de inmunoglobulinas (Coffman, R.L., et al. 1988; Kroemer, G., et al. 1993; DeKruyff, R.H., et al. 1993; Paul, W.E., et al. 1994) y la maduración en la afinidad de los anticuerpos producidos (Rizzo, L.V., et al. 1992; Liu, Y-J., et al. 1994).

Sin embargo, existen mecanismos alternativos que ayudan en la maduración de la respuesta inmune humoral. Tal es el caso de las células AN, bajo condiciones apropiadas estimulan la secreción de Ig, y en otras, tienen una acción inhibitoria (Mond, J.J., et al. 1995; Takeda, K., et al. 1993; Wyatt, R., et al. 1991).

La activación de células AN por ciertos antígenos puede ocurrir por distintos mecanismos. Uno de estos mecanismos es a través de los receptores FcγIII presentes en la superficie celular de las AN, los cuales al ser entrecruzados, inducen la activación de PLC y la elevación de Ca²⁺ intracelular (O'Shea, J.J., et al. 1991; Vivier, E., et al. 1991; Wirthmueller, U., et al. 1992) y esto conduce a las células AN a secretar citocinas (IFN-γ, IL-3 y GM-CSF) que influyen en la secreción de Ig por los linfocitos B (Snapper, C.M., et al. 1994; Snapper, C.M., et al. 1992):

CAPITULO II

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de éste trabajo fué caracterizar la respuesta inmune humoral inducida por la línea celular LR.4 en ratones: C57BL/6J y (C57BL/6J x BALB/c)_n.

Los objetivos particulares de este trabajo fueron:

I

Estudio de la respuesta inmune humoral inducida en ratones C57BL/6J por la línea celular LR.4.

(a) Búsqueda de las condiciones experimentales apropiadas para la inducción de anticuerpos en contra de la línea celular en estudio.

(b) Caracterización de los antisueros: reactividad y niveles de anticuerpos por citometría de flujo.

(c) Estudios de protección mediada por anticuerpos en contra de la línea LR.4.

II

Caracterización de la respuesta inmune humoral en contra de LR.4 generada en ratones (C57BL/6J x BALB/c)_n.

(a) Determinar si la respuesta humoral detectada en ratones C57BL/6J, pero no en ratones Balb/c, en contra de LR.4 es dominante o recesiva al usar animales híbridos.

(b) Identificar y caracterizar los anticuerpos del suero o del líquido obtenido de la cavidad peritoneal por citometría de flujo o ELISA.

(c) Investigar si los anticuerpos de los dos compartimentos descritos son citolíticos en ensayos de citotoxicidad celular.

CAPITULO III
MATERIAL Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron hembras de 8-10 semanas de las siguientes estirpes endogámicas de ratones: C57BL/6J (H-2^b), BALB/cAnN (H-2^d), BALB/k y C3HeB/FeJ (H-2^k) y de ratones híbridos F1 obtenidos de la cruce C57BL/6J x BALB/cAnN (H-2^{bd}). Todos los animales fueron obtenidos del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Líneas celulares

Las características generales de las líneas celulares usadas en éste trabajo se describen en la Tabla 1. La línea celular LR.4 fué aislada a partir de la línea L5178Y por su capacidad de crecer a través de barreras allogénicas y posteriormente fué caracterizada con métodos inmunológicos (Verastegui, E., et al. 1997) y de genética molecular (Nava, G., et al. 1992).

Las células fueron cultivadas in vitro a 37°C, en medio RPMI-1640 suplementado (ver Apéndice D), en una atmósfera humidificada y con CO₂ al 5 %. Algunas de las líneas celulares fueron propagadas in vivo en animales que expresaban el haplotipo apropiado: L5178Y en BALB/c, EL4.4 y RMA en C57BL/6J, y LR.4 en C3H para evitar la aparición de revertantes H-2^k.

TABLA 1

Línea Celular	Haplotipo	Cepa	Ref.
LR.4	H-2 ^c	DBA/2	Nava, G. et al 1992.
Yac-1	H-2 ^a	A/Sn	Cikow, M. et al 1973.
EL4.4	H-2 ^b	C57BL/6J	Nava, G. et al 1992.
RMA	H-2 ^b	C57BL/6J	Restifo, N., et al. 1993.
LS178Y	H-2 ^d	DBA/2	Weinhold, K. et al. 1977.
745	H-2 ^d	DBA/2	DeLamerroth, A., et al. 1976.
L929	H-2 ^k	C3H	Sanford, K.K., et al. 1968.

Obtención de células mononucleares

Las células mononucleares fueron obtenidas al disgregar el bazo o el timo de ratones que expresaban el haplotipo apropiado. Los eritrocitos contaminantes fueron lisados con solución ACK (ver Apéndice B) y las células se incubaron en medio de cultivo hasta que se usaron (Kruisbeek, A.M. 1993).

Viabilidad celular

La viabilidad celular fué calculada en base a un método basado en la exclusión del colorante azul tripano (Strober, W.

1993). En todos los casos la viabilidad celular fué >95%.

Tratamiento con MMC

Este procedimiento consistió en incubar, en la obscuridad, 4×10^6 células con una solución de MMC (25 $\mu\text{g/ml}$) durante 1h a 37°C (Kruisbeek, A.M., et al. 1993). Posteriormente, las células fueron lavadas repetidamente para eliminar la MMC residual y se usaron de acuerdo a las necesidades experimentales.

Protocolos de inmunización

(a) El antisuero anti H-2^d fué inducido en ratones C57BL/6J con 1×10^6 células extraídas del bazo de ratones BALB/c. Los animales se inmunizaron por vía ip una vez por semana durante 5 semanas. Cuatro días después de la última inmunización los animales fueron sangrados por punción intracardiaca y el suero almacenado a -20°C.

(b) Los antisueros contra la línea celular LR.4 fueron obtenidos en base a dos protocolos de inmunización distintos.

El primero de ellos fué similar al usado para la obtención del antisuero anti H-2^d, excepto que la última inmunización se hizo con células vivas, no tratadas con MMC.

Un método alternativo fué diseñado con el propósito de incrementar el nivel de anticuerpos contra la línea celular en

estudio. Este procedimiento consistió en inocular por vía subcutánea una vez por semana, durante 3 semanas, y en cantidades crecientes, células LR.4 vivas (1×10^3 , 1×10^4 y 5×10^5). Posteriormente la inmunización fué reforzada al inocular semanalmente, por vía ip, de acuerdo a la siguiente secuencia: 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^6 y 1×10^6 , células LR.4 vivas. La obtención y manejo de los antisueros fué similar al procedimiento descrito en (a) (Roloson, G.J., et al. 1981).

(c) Los sueros obtenidos de animales no inmunes y usados como controles, fueron procesados de acuerdo al método general descrito anteriormente.

Las propiedades de los antisueros y los niveles de anticuerpos se determinaron por inmunofluorescencia indirecta en un citómetro de flujo (ver más adelante).

Adsorción del antisuero

Las adsorciones del antisuero contra LR.4 fueron hechas con las mismas células (o con L5178Y) previamente lavadas con PBS. El método consistió en incubar 1×10^7 células en un volumen final de 0.1 ml de antisuero diluido (1:20) durante 1h a 37°C ; posteriormente, la mezcla de reacción se dejó a 4°C durante toda la noche. Las células fueron removidas por centrifugación, y el procedimiento se repitió en dos ocasiones. El producto final fué aclarado por centrifugación y almacenado a -20°C . Como control de adsorción una muestra del antisuero fué tratada en forma equivalente pero omitiendo la incubación

con las células neoplásicas (Collins, J.J., et al. 1978).

La reactividad de los antisueros adsorbidos y el título fueron evaluados por inmunofluorescencia indirecta en un citómetro de flujo.

Citofluorometría de flujo

Para el análisis de inmunofluorescencia indirecta 1×10^6 células de las líneas seleccionadas fueron lavadas dos veces con PBS y se centrifugaron a 4°C . Para evitar el pegado inespecífico, las células fueron incubadas con $100 \mu\text{l}$ de una dilución 1:10 de suero normal de cabra por 30 min a 4°C . El exceso de suero fué removido lavando dos veces con PBS-ASB-NaN. La población celular resultante fué incubada con diluciones apropiadas de suero normal o del antisuero indicado, en condiciones equivalentes a las descritas anteriormente, para exponerla en un último paso a una dilución 1:30 de un anticuerpo fluoresceinado anti-Ig de ratón inducido en cabra (Boehringer Mannheim). Las células se lavaron con PBS y se fijaron inmediatamente con $50 \mu\text{l}$ de paraformaldehído al 10% en PBS y se diluyeron en un volumen final de 1 ml con PBS. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson) calibrando antes de cada experimento con caliBRITE y el análisis de resultados se hizo con el programa de LYSIS II (Holmen, K. et al. 1993; Otten, G., et al. 1993).

Transferencia pasiva de suero

Para el ensayo de protección contra LR.4 por anticuerpos inducidos en ratones B6 se conformaron cuatro grupos de animales B6 (n=6). Cada uno de los animales pertenecientes a uno de los distintos grupos recibió 15 μ l ip de uno de los siguientes reactivos biológicos: antisuero contra LR.4 (I), antisuero anti LR.4 adsorbido (II), suero normal (III) de B6 o PBS (IV). Inmediatamente después cada ratón recibió un trasplante ip de 1×10^4 células LR.4 vivas y fué observado diariamente con el propósito de determinar si había crecimiento tumoral.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

El método usado en este trabajo fué una modificación del procedimiento experimental descrito por P. Hornbeck (1993). Para este grupo de experimentos se usaron placas de cultivo de 96 pozos de fondo plano. Los pozos se distribuyeron en grupos de 3 para su manejo e identificación posterior. Cada paso de la secuencia experimental que se describe a continuación fué seguido por 4 ciclos de lavado para garantizar la fidelidad y reproducibilidad de los datos: (a) en cada pozo se depositaron 50 μ l de una suspensión de la línea LR.4 (2×10^4 células/ml de amortiguador de carbonatos, ver Apéndice B) seguido por un período de incubación de 2h a 37°C; (b) posteriormente se añadieron 50 μ l de la solución de bloqueo (Apéndice C) y se dejó reaccionar por 2h a 37°C; (c) una vez interrumpida la reacción se depositaron, en grupos de 3 pozos, 50 μ l de uno de

los siguientes reactivos biológicos: suero normal, suero anti LR.4, ascitis o solución de lavado (PBS-Tween 20, ver Apendice C), las placas se incubaron a temperatura ambiente y en agitación continua por 1h; (d) para determinar la subclase de Ig, se usaron 50 μ l de un anticuerpo de cabra peroxidado dirigido contra una de las siguientes Ig de ratón: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 o IgM y se dejaron reaccionar en oscuridad 1h en agitación continua a temperatura ambiente, y (e) finalmente la reacción se reveló con 50 μ l de una solución de OFD (ver Apendice C) y se detuvo con 100 μ l de H₂SO₄ 1M (ver Apendice C). La absorbancia fué medida a 492 nm en un lector de ELISA Multiskan MS. Los resultados fueron graficados como dilución de la muestra contra lectura de absorbancia a 492 nm.

Marcaje radiactivo de células

Cinco millones de células fueron marcadas radioactivamente con 300 μ Ci de Na₂⁵¹CrO₄ (DuPont NEN) en 700 μ l de SFB durante 1h a 37°C. El isótopo libre fué eliminado lavando con PBS y la concentración celular se ajustó a 1 x 10⁵ células/ml en medio de cultivo (Nava, G., et al. 1992).

Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

Cien microlitros de una suspensión de células blanco (1 x 10⁵ células/ml) previamente incubadas con suero normal de ratón o suero anti LR.4 (dilución 1:20) y marcadas radioactivamente con ⁵¹Cr fueron depositadas en pozos de placas de cultivo (96

pozos) con fondo redondo. La población de células efectoras fué extraída de bazos de ratones B6 sin tumor. Las células efectoras fueron diluidas de tal manera que se obtuvieran las siguientes proporciones entre células efectoras y células blanco: 25:1, 50:1 o 100:1 (Nava, G., et al. 1992). La lisis fué determinada por triplicado después de 18h de incubación a 37°C. Para la determinación de las liberaciones máxima y mínima, a un volumen equivalente al experimental de células blanco se le adicionaron 100 µl de Tritón 100X al 20% (Sigma) o RPMI-1640 suplementado. Los resultados se obtuvieron mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Liberación específica} = \frac{LM - LE}{LT - LE} \times 100$$

En donde: LM=liberación de la muestra, LE=liberación espontánea y LT=liberación total.

NOTA: Todos los experimentos presentados en esta tesis fueron realizados por lo menos en tres ocasiones en las mismas condiciones produciendo resultados semejantes, lo que les confiere confiabilidad y reproducibilidad.

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSION

RESULTADOS Y DISCUSION

Los experimentos que se describen a continuación fueron diseñados con el propósito de estudiar si la letalidad en ratones BALB/c o la resistencia de los ratones C57BL/6J, secundaria al trasplante intraperitoneal de la línea celular LR.4 (H-2^b), estaba determinada por la capacidad de desarrollar una respuesta inmune humoral específica. Esto era necesario ya que la participación de células del sistema inmune con actividad citotóxica, tales como los linfocitos T citotóxicos, las células asesinas naturales o aquellas obtenidas por estimulación in vitro con IL-2 (LAK) fué descartada por Verástegui y colaboradores (1997).

Es importante señalar que el rechazo/control de la línea tumoral LR.4 por los ratones B6 no estaba condicionado por productos del complejo principal de histocompatibilidad. Esta conclusión fué obtenida por Nava y cols. (1992) al transplantar en paralelo y en condiciones experimentales equivalentes un grupo de ratones caracterizados por expresar distintos haplotipos (BALB.b, H-2^b; BALB/c o DBA/2, H-2^d y BALB.k o C3H, H-2^k) o miembros de una colonia cerrada no endogámica (CD1), en los cuales el tumor se desarrolló y fué letal para los animales.

Respuesta humoral anti LR4 en ratones C57BL/6J

Inducción y caracterización de anticuerpos anti LR.4 en ratones C57BL/6J

Un grupo de ratonas jóvenes C57BL/6J o BALB/c fueron inmunizadas contra la línea celular LR.4 de acuerdo a los protocolos descritos en la sección de Materiales y Métodos. Los sueros obtenidos se analizaron por citometría de flujo en contra de las líneas celulares: LR.4 (H-2^v), L5178Y y 745 (H-2^d), EL4.4 y RMA (H-2^b), Yac-1 (H-2^a) y L929 (H-2^k) o de células extraídas de timos de ratones C57BL/6J (H-2^b), BALB/c (H-2^d) o BALB.k y C3H (H-2^k). Dentro del grupo de líneas celulares es importante resaltar a L5178Y, que diera origen a LR.4 (Nava, G., et al. 1992), así como a EL4.4 (Nava, G., et al. 1992) y RMA (Restifo, N. et al. 1993), obtenidas de ratones C57BL/6J por mutagénesis química. El uso de células extraídas del timo sirvió como indicador de posibles semejanzas o diferencias entre células T normales y neoplásicas. El suero anti H-2^d (Materiales y Métodos) fue utilizado como control en la expresión de moléculas del CPH en las líneas celulares LR.4 (H-2^v) y L5178Y (H-2^d) (resultados no mostrados).

Los resultados de éstos experimentos (Figuras 2-5) revelaron que el antisuero anti LR.4 inducido en ratones B6 reaccionó en forma parecida con células T normales obtenidas de timo (Figura 3) o con células neoplásicas de los haplotipos H-2^a, H-2^d y H-2^k (Figura 2). Por el contrario, los resultados fueron negativos con células T obtenidas del timo de ratones B6 (Figura 5) o con las líneas celulares EL4.4 y RMA (Figura 4).

La posibilidad de que existieran niveles bajos de anticuerpos contra éstas dos últimas variedades celulares fué descartada al usar el antisuero sin diluir y obtener valores indistinguibles de los detectados con el suero normal (resultados no presentados). Por otra parte, el suero de ratones BALB/c inmunizados con la línea LR.4 no mostró reactividad alguna contra LR.4 (Figura 6).

Con el propósito de determinar si los anticuerpos contra LR.4 reaccionaban con uno o más determinantes antigénicos expresados por células neoplásicas o con antígenos compartidos por linfocitos T normales provenientes de timo, se hicieron diluciones apropiadas del antisuero, las cuales fueron adsorbidas posteriormente con LR.4 o con L5178Y. Como se demuestra en la figura 7, los productos de la adsorción dejaron de reaccionar con las dos líneas celulares y con linfocitos T obtenidos del timo de ratones BALB/c o BALB.k. Es preciso señalar que los productos de las adsorciones realizadas con las líneas celulares (LR.4 y L5178Y) produjeron resultados semejantes, por los que solamente se muestran los realizados con la línea celular LR.4.

Los resultados presentados en las secciones anteriores revelaron que la línea celular LR.4 expresa determinantes antigénicos no relacionados con moléculas relevantes en la presentación de antígenos, productos del CPH, pero que son compartidas por células T normales. Es importante destacar que linfocitos T circulantes, del bazo o de ganglios linfáticos no fueron estudiados y en consecuencia la posibilidad de que moléculas de superficie expresadas por células T inmaduras

fueran responsables de la reactividad con el antisuero no puede descartarse. Otra observación importante derivada de éstos experimentos radica en las diferencias antigénicas que se detectaron entre ratones B6 y un grupo relativamente grande de animales endogámicos entre los cuales se incluyó a ratones BALB.b (H-2^b). La posibilidad de que los ratones B6 expresen una forma alélica de este o estos determinantes antigénicos no ha sido explorada todavía.

En la actualidad se acepta que los linfocitos T citotóxicos o las células asesinas naturales, en forma menos específica, son los componentes del sistema inmune más eficaces para reconocer y destruir células neoplásicas (Van Den Eynde, B., et al. 1989; Gooding, L.R., et al. 1983; De Plaen E., et al. 1988; Darrow, T.L., et al. 1989; Trinchieri, G. 1989; Seaman, W.E., et al. 1987; Welsh, R.M., et al. 1981). En éste modelo experimental, sin embargo, la falta de expresión de productos del complejo principal de histocompatibilidad (Nava, G., et al. 1992) y la resistencia a células asesinas naturales (Verastegui, E., et al. 1997) por parte de LR.4 indican que el reconocimiento, control o rechazo de la línea celular en estudio está mediado, al menos en parte, por los anticuerpos producidos en ratones C57BL/6J. La posibilidad de que el antisuero reaccionara con algunas variedades α/β de receptores para antígeno de células T que no forman parte del repertorio de ésta estirpe de ratones también puede descartarse, ya que las células LR.4 son portadoras de una deleción extensa que afecta a la subunidad β (Nava, G. 1990). Por otra parte, la incapacidad de los ratones BALB/c para desarrollar una respuesta inmune humoral en contra de LR.4 nos sugiere que,

posiblemente, la susceptibilidad de esta cepa de ratones al tumor sea en gran parte mediada por la ausencia de anticuerpos.

En forma adicional es posible concluir que él o los posibles determinantes antigénicos detectados en LR.4 y L5178Y no son expresados exclusivamente por células neoplásicas. Por ésta razón, el uso del antisuero en contra de células normales pudiera contribuir a la caracterización de poblaciones de linfocitos T obtenidos de ratones C57BL/6J. Estudios realizados por otros grupos de investigación (Nickell, S.P., et al. 1993; Silva, J.S., et al. 1992; Suzuki, Y., et al. 1988; Gazzinelli, R.T., et al. 1994; Bogdan, C. 1990) han revelado que existen diferencias importantes entre ratones C57BL/6J y otras estirpes, tales como BALB/c, a nivel de la síntesis de IL-4, IFN- γ e IL-12, lo que repercute significativamente en la susceptibilidad o resistencia a algunos agentes infecciosos.

Tomados en conjunto los datos presentados demuestran que, al menos en condiciones experimentales, la respuesta humoral puede participar en el reconocimiento y destrucción de células neoplásicas. Debe enfatizarse que los ratones C57BL/6J no son intrínsecamente resistentes a LR.4. De hecho, el trasplante intraperitoneal, independientemente del número de células inoculadas, es seguido en todos los casos por proliferación abundante, la que alcanza su mayor nivel 25 y 30, para declinar o mantenerse por períodos largos (hasta 200 días) (Verastegui, E., et al. 1997). La inducción de estados crónicos en los cuales los animales retienen el tumor con un mínimo de deterioro orgánico sugiere que otros factores pudieran contribuir a la resistencia detectada en ratones C57BL/6J. Si

estos forman parte o no del sistema inmune se desconoce.

Algunas propiedades de los determinantes antigénicos identificados en la línea celular LR.4

Los experimentos que se describen a continuación fueron diseñados con el fin de confirmar la existencia de epítopes antigénicos compartidos por la línea celular LR.4 y células T normales, así como su posible relevancia en el control del tumor por ratones B6. Con este propósito se inmunizaron dos grupos de ratones (n=6) con células T obtenidas del timo de animales B/c o B.k y posteriormente se les retó con 1×10^4 células LR.4 por vía ip. Los resultados de estos experimentos (Tabla 2) revelaron que es posible inducir inmunidad en contra de LR.4 con linfocitos normales y que esta protección probablemente es debida a una o más proteínas de membrana, no relacionadas con el haplotipo, expresadas por diferentes estirpes de ratón pero no por B6. La naturaleza de estas moléculas y estadio de diferenciación a partir del cual se expresan no han sido determinados todavía.

Estudios realizados por Verastegui y cols. (1997) demostraron que la línea celular LR.4 fué resistente a mecanismos clásicos de inmunidad a tumores como los mediados por LTC o células AN. Sin embargo, los resultados de los experimentos presentados hasta ahora sugieren que los anticuerpos inducidos bajo distintas condiciones experimentales son relevantes en el control o rechazo de LR.4 por ratones C57BL/6J.

La capacidad de los anticuerpos de lisar a LR.4 en presencia de una fuente exógena de complemento fué demostrada por Nava y cols. (1992). Sin embargo, estos experimentos no pueden considerarse concluyentes sobre el papel que desempeñan los anticuerpos en el rechazo o control del tumor debido a la falta de actividad lítica en presencia de suero de ratón (Yakoleff y Alfaro, resultados no publicados).

En forma alternativa, los anticuerpos pudieran participar en forma indirecta, a través de la capacidad citotóxica de células del sistema inmune que carecen de receptores capaces de reconocer a LR.4. Debido a que Barrera (1990) demostró que los macrófagos tenían un mínimo de actividad en contra de células opsonizadas con antisuero anti LR.4, el ensayo de CCDA se llevó a cabo con células obtenidas del bazo de ratones B6. En términos generales se acepta que la población celular del bazo está constituida por células B (45%), células T (45%) y células AN y macrófagos (10%). Los resultados de estos experimentos demostraron que, bajo estas condiciones experimentales, existe reconocimiento y lisis de LR.4; en forma adicional es importante señalar que la magnitud de la respuesta dependió de la proporción entre células blanco y células efectoras (Figura 6). Por el contrario, el suero de ratones vírgenes o el suero adsorbido dieron resultados negativos y en consecuencia consideramos que un mecanismo equivalente in vivo podría participar en la respuesta de esta estirpe de ratones.

Los resultados obtenidos por Verástegui y cols. (1997) sugirieron que las células responsables de la destrucción in vitro de LR.4 eran AN. Esta conclusión fué posible ya que se

detectó una inhibición total de la actividad lítica después de la administración de anticuerpos anti asialo GM1. Los contactos celulares se habrían llevado a cabo usando a los anticuerpos como un puente, en un extremo del cual las regiones Fc de las Ig (subclase IgG) serían reconocidas por receptores expresados en la membrana de las AN. Si este mecanismo opera in vivo no ha sido demostrado. Los experimentos de citotoxicidad de este trabajo son congruentes con la interpretación anterior y fortalecen la participación de una respuesta humoral.

En años recientes la importancia de anticuerpos que reconocen antígenos expresados por células tumorales, capaces de mediar actividad lítica ha sido motivo de interés por distintos grupos de investigación (Lloyd, K.O. 1989; Cai, X., et al. 1995; Lubeck, M.D., et al. 1985; Dyer, M.J.S., et al. 1989; Hellstrom, I., et al. 1987). Si esta forma de contrarrestar la progresión tumoral tiene un futuro en la inmunoterapia requiere de mayor solidez.

Protección de ratones C57BL/6J conferida por antisuero anti LR.4.

Para investigar si el antisuero anti-LR.4 era suficiente para impedir el crecimiento de esta línea celular se llevaron a cabo un grupo de experimentos que consistieron en la administración ip de este reactivo biológico producido en el laboratorio. Con este propósito se conformaron cuatro grupos de animales B6 (n=6). Los animales pertenecientes a cada uno de los distintos grupos recibió por vía ip 15 μ l de una de los

siguientes reactivos: antisuero contra LR.4 (I), antisuero anti-LR.4 adsorbido (II), suero normal (III) de B6 o PBS (IV). Inmediatamente después cada ratón recibió un trasplante ip de 1×10^6 células LR.4 vivas y fué observado diariamente durante 45 días con el propósito de determinar si hubo crecimiento tumoral (Tabla 3).

Únicamente aquellos ratones que recibieron antisuero anti LR.4 no adsorbido no permitieron crecimiento del tumor; por el contrario, aquellos en los que el antisuero adsorbido fué inyectado se comportaron de la misma forma que el grupo de animales que recibieron suero normal o PBS. Estos experimentos consolidan nuestra proposición de que una respuesta humoral constituye la característica distintiva de los ratones B6 en relación con otras estirpes incluidas en el estudio.

Roloson y cols. (1981) demostraron que la transferencia pasiva a ratones B6 de suero inmune específico del adenocarcinoma AD755a confirió protección a través de un mecanismo similar al descrito en este trabajo. Otros grupos de trabajo han mostrado que suero hiperinmune en contra de esporozoitos de Plasmodium es efectivo para la protección de ratones BALB/c en contra de la malaria (Weiss, W.R., et al. 1993; Schofield, L., et al. 1987).

Respuesta inmune humoral anti LR4 en ratones híbridos

El siguiente grupo de experimentos se hicieron con el fin de determinar si la resistencia de los ratones C57BL/6J,

secundaria al trasplante intraperitoneal de la línea celular LR.4 tenía un carácter dominante o recesivo en ratones híbridos (C57BL/6J x BALB/c)». Como se mostró en la sección anterior, la resistencia al tumor detectada en ratones B6 está determinada, al menos en parte, por la inducción de una respuesta humoral contra determinantes antigénicos compartidos con otras células normales o neoplásicas y que no guardan relación con productos codificados por genes del CPH.

Características generales del crecimiento de LR.4 en la cavidad peritoneal de ratones B6C

La capacidad de los ratones B6 de rechazar o controlar a LR.4 en la cavidad peritoneal es una propiedad que no es compartida por otros ratones, incluyendo a la estirpe BALB.b que expresa el mismo haplotipo (H-2^b). No todos los animales estudiados desde el punto de vista de la susceptibilidad a LR.4 fueron analizados desde el punto de vista inmunológico; sin embargo, es posible que las diferencias con los ratones B6 radican en la incapacidad para producir anticuerpos contra la línea celular en estudio (como lo ha sido demostrado con los ratones BALB/c). Si esto es secundario a una forma de protección en contra de una respuesta autoinmune o a la falta de miembros del repertorio de células B detectados en ratones B6, queda por determinar. De hecho, Verástegui y cols. (1997) demostraron que la limitante en los ratones B/c estaba en la producción de anticuerpos y no en la población de células efectoras capaces de mediar citotoxicidad en presencia de anticuerpos contra LR.4.

El uso de híbridos B6C₃ se consideró pertinente para iniciar un estudio sobre la respuesta inmune humoral en contra de LR.4 en un contexto genético constituido por animales susceptibles y resistentes.

En un primer grupo de experimentos se inocularon 24 ratones con 1×10^6 células LR.4 y se les siguió por un período de 240 días. Durante este tiempo los animales fueron observados para determinar macroscópicamente el desarrollo del tumor en la cavidad abdominal y pesados cada día para seguir el curso de la enfermedad. Los resultados obtenidos de este análisis revelaron que el crecimiento de LR.4 tenía algunas características comunes a los progenitores y otras que posiblemente eran consecuencia de la interacción del genoma de cada uno de los progenitores. A partir de este grupo de ratones fué posible identificar tres tipos diferentes de crecimiento de LR.4 cuyas características generales se describen a continuación y cuya representación gráfica se encuentra en la Figura 9.

Tipo I.- Los animales de este grupo se comportaron de forma similar a los ratones B6 al presentar un crecimiento inicial seguido del rechazo del tumor.

Tipo II.- Fué detectado en un solo ratón y se caracterizó por tener dos fases de crecimiento, el segundo de los cuales fué letal. Por esta razón se consideró que no había habido rechazo, solamente control temporal del crecimiento neoplásico.

Tipo III.- A diferencia de la segunda variedad (tipo II), los ratones sobrevivieron a la recurrencia tumoral y lograron

de nuevo rechazar al tumor.

Es importante señalar, que ninguno de los ratones transplantados con LR.4 sucumbieron al tumor como los ratones parentales BALB/c.

Con las restricciones que lleva implícitas un análisis por observación, los datos fueron interpretados en favor de un carácter dominante de la respuesta inmune en contra de LR.4. La presencia de recurrencias tumorales podría ser consecuencia de la participación secuencial o competitiva de poblaciones de células T cooperadoras que finalmente pudieran repercutir en la eficiencia de la respuesta inmune humoral contra LR.4. La complejidad del fondo genético de los ratones híbridos, que no es la suma de los genomas individuales, no permite otra cosa que una mera interpretación especulativa.

Inducción y caracterización de anticuerpos anti LR.4 en ratones híbridos B6C

Con el propósito de determinar si las características de crecimiento de LR.4 en los ratones B6C estaban determinadas por la inducción de una respuesta mediada por anticuerpos, se diseñó un grupo de experimentos circunscrito a los primeros 24 días después del trasplante.

Con este planteamiento se analizaron el suero y el líquido de cavidad peritoneal obtenidos de tres grupos de ratones híbridos, de 8 semanas (n=3 por grupo), transplantados con 1 x

10⁶ células LR.4 y sacrificados de acuerdo al siguiente calendario: 60, 150 y 240 días. Es importante mencionar que los animales sacrificados en el 60 día no habían desarrollado líquido de ascitis y por esta razón se realizó un lavado peritoneal con PBS y este fué utilizado para los análisis posteriores.

En las figuras 10 y 11 se observa que la concentración de anticuerpos en el suero y en el líquido obtenido de la cavidad peritoneal se incrementó progresivamente. Es preciso mencionar que el título de anticuerpos en el líquido de ascitis fué en promedio, cinco veces mayor al detectado en suero.

Estos resultados fueron interpretados de la siguiente manera: (a) la respuesta humoral inicialmente detectada en ratones B6 es dominante en ratones B6C y (b) las diferencias en los niveles de anticuerpos entre el suero y el líquido de ascitis podrían ser consecuencia de la dificultad para distribuirse con la misma eficiencia en los dos compartimentos.

Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos inducidos en ratones B6C

Los experimentos presentados en la figura 12 revelaron que los anticuerpos detectados en el suero o en el líquido de ascitis contra LR.4 inducidos en ratones B6C son capaces de mediar actividad citotóxica. Las diferencias en la eficiencia podrían estar determinadas por la presencia de sustancias que inhiben la acción de anticuerpos citotóxicos en contra de LR.4;

sin embargo, esto no ha sido determinado.

Determinación del isotipo de los anticuerpos anti LR.4

Con el propósito de determinar si existía un isotipo de Ig preferencial en esta respuesta humoral desarrollada en los ratones B6C en contra de la línea LR.4 y de esta manera poder sugerir la participación de citocinas en esta respuesta inmune se realizaron ensayos de ELISA para la determinación del isotipo de Ig.

En la figura 13 se muestra que el antisuero anti LR.4 inducido en ratones B6C contiene anticuerpos correspondientes a la clase IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3); sin embargo, no se encontró la participación de un isotipo particular de IgG. Estos resultados apoyan la posible participación de las células AN como célula efectora en inducir una CCDA en contra de LR.4, ya que las AN poseen receptores para la porción Fc de inmunoglobulinas IgG.

La respuesta inmune humoral del tipo IgG generada por los ratones híbridos en contra de la línea celular LR.4 nos sugiere una participación activa de linfocitos T de ayuda (CD4+) (Coffman, R.L., et al. 1989; Gajewski, T.F., et al. 1989; Rizzo, L.V., et al. 1992). En trabajos realizados por T.R. Mosmann y colaboradores (1989) se encontró que los linfocitos Ta pueden ser subdivididos en Ta1 y Ta2 de acuerdo al perfil de citocinas que producen. Se ha demostrado que tanto los Ta1 como los Ta2 pueden proporcionar ayuda a células B en forma

restringida por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad e inducir respuestas de anticuerpos primarias o secundarias siempre y cuando exista un reconocimiento dirigido hacia un antígeno específico (Parker, D.C. 1993; Noelle, R.J., et al. 1991; Abbas, A.K., et al. 1993; Paul, W.E., et al. 1994).

Numerosos trabajos han reportado que la síntesis de IgG1 en respuestas secundarias ocurre por varias vías, una de ellas involucra IL-4 e IL-5 (respuesta Ta2) y la otra vía involucra IL-2 (respuesta Tal) (Coffman, R.L., et al. 1989; Abbas, A.K., et al. 1993; Paul, W.E., et al. 1994; Schultz, C.L., et al. 1992). En contraste, la síntesis de IgG2a requiere citocinas específicas como la IL-2 y el IFN γ (respuesta Tal) (Snapper, C.M., et al. 1987; Stevens, T.L., et al. 1988; Finkelman, F.D., et al. 1988). Así, es necesaria la participación de varias citocinas para dirigir la respuesta de anticuerpos hacia un isotipo particular.

Varios autores han demostrado que puede existir una regulación de la respuesta inmune humoral por medio de células T, en la cual, no existe restricción por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad. Esto es llevado a cabo por el acoplamiento de CD28 en la célula T a B7/BB1 expresado en la célula B activada o bien, a través de la estimulación de células T por citocinas derivadas de macrófagos o de células B estimuladas con antígenos TI (Leung, H.T., et al. 1994; DeKruyff, R.H., et al. 1985; Solbach, W., et al. 1991). Sin embargo, no ha sido posible descartar o no la participación de células T en la regulación de la respuesta humoral anti LR.4

(IgG) generados en nuestro modelo experimental.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- La línea celular LR.4 es capaz de inducir la producción de anticuerpos en los ratones de la cepa C57BL/6J, no así en los ratones de la cepa BALB/c.
- La susceptibilidad de los ratones de la cepa BALB/c pudiera estar influenciada por la incapacidad de desarrollar una respuesta inmune humoral en contra de LR.4.
- La respuesta humoral inducida en los ratones C57BL/6J reveló que LR.4 expresa determinantes antigénicos en la superficie celular, compartidos con célula T normales y relevantes en el control/rechazo del tumor. Estos epítopes no están relacionados con moléculas del CPH; sin embargo, no se ha podido descartar si estos determinantes antigénicos son exclusivos de células T maduras, inmaduras o presentes en ambas poblaciones de células T.
- In vitro, los anticuerpos generados en ratones C57BL/6J son capaces de lisar a LR.4 por un mecanismo de CCDA, en el cual, la célula efectora fué de la estirpe de las AN. Sin embargo, su relevancia in vivo no ha sido posible determinar.
- Posiblemente, el desarrollo de una respuesta inmune humoral en los ratones híbridos B6C sea una característica dominante de ratones resistentes C57BL/6J.
- El análisis de los anticuerpos anti LR.4 generados en los ratones híbridos B6C mostró que, in vitro, el mecanismo lítico

para la línea celular fué semejante al de los ratones B6 (CCDA). Además, el isotipo de inmunoglobulina dominante en esta respuesta fué IgG.

- Este modelo experimental murino permitió demostrar la importancia del desarrollo de una respuesta inmune humoral para el control y/o rechazo de células carentes de la expresión de moléculas relevantes en la presentación de antígenos. Así mismo, el uso del antisuero generado en los ratones C57BL/6J en contra de la línea en estudio pudiera contribuir a la caracterización de poblaciones de linfocitos T obtenidos de esta misma cepa de ratones.

REFERENCIAS

- Abbas, A.K., H.J. Burstein y S.A. Bogen. Determinants of helper T-cell dependent antibody production. *Seminars Immunol.* 1993;5:441-447.
- Abbas, A.K., A.H. Lichtman y J.S. Pober. Effector mechanism of immunoglobulin E-initiated immune reactions. 278-292. En: *Cellular and Molecular Immunology*. Segunda edición. Editado por W.B. Saunders Company. 1994.
- Abbas, A.K., A.H. Lichtman y J.S. Pober. Maturation of B lymphocytes and expression of immunoglobulin genes. 66-94. En: *Cellular and Molecular Immunology*. Segunda edición. W.B. Saunders Company. 1994.
- Alfaro, G., C. Lomeli, R. Ocadiz, et al. Immunologic and genetic characterization of S180, a cell line of murine origin capable of growing in different inbred strains of mice. *Vet. Immunol. Immunopatol.* 1992;30:385-398.
- Amigorena, S., J. Salamero, J. Davoust, et al. Tyrosine-containing motif that transduces cell activation signals also determines internalization and antigen presentation via type III receptors for IgG. *Nature* 1992;358:337-341.
- Anichini, A., G. Fossati, G. Parmiani, et al. Clonal analysis of the cytolytic T-cell response to human tumors. *Immunol. Today* 1987;8:385-389.

Apasov, S., F. Redegeld y M. Sitkousky. Cell-mediated cytotoxicity. Contact and secreted factors. *Curr. Op. Immunol.* 1993;5:404-410.

Barrera, R. Distintos mecanismos de respuesta inmune antitumoral generados por la cepa de ratones C57BL/6J contra dos células tumorales de origen murino. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. 1990.

Blackwell, T.K. y F.W. Alt. Mechanism and developmental program of immunoglobulin gene rearrangement in mammals. *Annu. Rev. Genet.* 1989;23:605-636.

Bogdan, C., H. Moll, W. Solbach, et al. Tumor necrosis factor- α in combination with interferon- γ , but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania* major amastigotes. *Eur. J. Immunol.* 1990;20:1131-1135.

Boon, T. y A. Van Pel. Teratocarcinoma cell variants rejected by syngeneic mice: protection of mice immunized with these variants against other variants and against the original malignant cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978;75:1519-

Brittenden, J., S.D. Heys, J. Ross y O. Eremin. Natural killer cells and cancer. *Am. Cancer Soc.* 1996;1226-1243.

Browning, M.J. y W.F. Bodmer. MHC antigens and cancer: Implications for T-cell surveillance. *Curr. Op. Immunol.* 1992;4:613-618.

Brunswick, M., F.D. Finkelman, PlF. Hight, et al. Picogram quantities of anti-Ig antibodies coupled to dextran induce B cell proliferation. *J. Immunol.* 1988;140:3363-3372.

Cahan, L.D., R.F. Irie, R. Singh, et al. Identification of a human neuroectodermal tumor antigen (OPA-1-2) as ganglioside GD2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982;79:7629-7633.

Cambier, J.C., C.M. Pleiman y M.R. Clark. Signal transduction by the B cell antigen receptor and its coreceptors. *Annu. Rev. Immuno.* 1994;12:457-486.

Carayannopoulos, L. y J.D. Capra. Immunoglobulin. 183-314. Structure and function. En: **Fundamental Immunology**. Tercera edición. Editado por William E. Paul Raven Press, Ltd., New York. 1993.

Cia, X. y A. Garen. Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: Selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995;92:6537-6541.

Cikes, M., S. Fierber y G. Klein. Progressive loss of H-2 antigens with concomitant increase of cell-surface antigen(s) determined by Moloney Leukemia virus in culture murine lymphomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 1973;50:347.

Clark, E.A. y P.J.L. Lanre. Regulation of human B-cell activation and adhesion. *Annu. Rev. Immunol.* 1991;9:97-127.

Coffman, R.L., B.W. Seymour, D.A. Leberman, D.D. Hiraki, et al. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation isotype regulation. *Immunol. Rev.* 1988;102:5-28.

Collins, J.J., G. Roloson, D.E. Haagenen Jr, et al. Immunologic control of the ascites from of murine adenocarcinoma 755. II. Tumor immunity associated with a Friend-Moloney-Rauscher-type virus. *J. Natl. Cancer Inst.* 1978;60:141-151.

Coulie, P. y A. Van Pel. Defined antigens recognized by T lymphocytes on human tumors. *Curr. Op. Oncol.* 1993;5:1043-1048.

Coulie, P., P. Weynants, C. Muller, Lehmann, F. et al. Genes coding for antigens recognized on human tumors by autologous cytolytic T lymphocytes. *Ann. New York Acad. Sci.* 1993;690:113-119.

Cromme, F.V., P.F.H. van Bommerl, J.M.N. Walboomers, et al. Differences in MHC an TAP-1 expression in cervical cancer lymph node metastases as compared with the primary tumors. *Br. J. Cancer* 1994;69:1176-1181.

Cui, S., J.S. Reichner, R.B. Mateo y J.E. Albina. Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms. *Cancer Res.* 1994;54:2462-2467.

D'Andrea, A., M. Aste-Amezaga, N.M. Valiante, et al.

Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.* 1993;178:1041-1048.

DeFranco, A.L. B lymphocyte activation. 505-529. En: **Fundamental Immunology**. Tercera edición. Editado por William E. Paul Raven Press, Ltd., New York. 1993.

b.- DeFranco, A.L. Structure and function of the B cell antigen receptor. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1993;9:377-410.

Deisseroth, A., J. Baker, W.F. Anderson y A. Nienhuis. Hemoglobin synthesis in somatic cell hybrids. Coexpression of mouse with human of chinese hamster globin genes in interspecific somatic cell hybrids of mouse erythroleukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975;72:2682-2686.

DeKruyff, R.H., C. Clayberger y H. Cantor. Monoclonal helper T cells induce B cell responses to T-independent antigens. Antigen-specific T cells are directly stimulated by activated B cells in the absence of antigen. *J. Immunol.* 1985;134:86-90.

De Kruyff, R.H., L.V. Rizzo y D.T. Umetsu. Induction of immunoglobulin synthesis by CD4+ T cell clones. *Seminars Immunol.* 1993;5:421-430.

Deleo, A.B., G. Jay, E. Appella, et al. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc. Natl. Acad.*

Sci.USA. 1979;76:2420-2424.

De Plaen, E., C. Lurquin, A. Van Pel, et al. Immunogenic (tum^r) variants of mouse tumour P815: cloning of the gene of tum^r antigen P91A and identification of the tum^r mutation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988;85:2274-

De Waal Malefyt, R., J. Haanen, H. Spit, et al. IL-10 and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. J. Exp. Med. 1991;174:915-924.

Disis, M.L., E. Calenoff, G. McLaughlin, et al. Existnt T-cell and antibody immunity to HER-2/*neu* protein in patients with breast cancer. Cancer Res. 1994;54:16-20.

Dyer, M.J.S., G. Hale, F.G.J. Hayhoe y H. Waldmann. Effects of CAMPATH-1 antibodies *in vivo* in patients with lymphid malignancies: influence of antibody isotype. Blood 1989;73:1431-1439.

Estin, C.D., U.S. Stevenson, G.D. Flowman, et al. Recombinant vaccinia virus vaccine against the human melanoma antigen p97 for use in immunotherapy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.1988;85:1052-1056.

Ferrone, S. y F.M. Marincola. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance

and clinical relevance. *Immunol. Today* 1995;16:487-494.

Finkelman, F.D., I.M. Katona, T.R. Mosmann y R.L. Coffman. IFN- γ regulates the isotypes of Ig secreted during *in vivo* humoral immune response. *J. Immunol.* 1988;140:1022-1027.

Fiorentino, D.F., A. Zlotnik, P. Vieira, et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* 1991;146:3444-3451.

Fishel, R., M.K. Lescoe, M.R.S. Rao, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027-1038.

Foon, K.A., R.W. Schroff, P.A. Bunn, et al. Effects of monoclonal antibody therapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1984;64:1085-1093.

Fridman, W.H. Regulation of B-cell activation and antigen presentation by Fc receptors. *Curr. Op. Immunol.* 1993;5:355-360.

Gajewski, T.F., J. Joyce y F.W. Fitch. Antiproliferative effect of IFN- γ in immune regulation. III. Differential selection of TH1 and TH2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IL-2 and recombinant IFN- γ . *J. Immunol.* 1989;143:15-22.

Gazzinelli, R.T., M. Wysocka, S. Mayashi, et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*

1994;153:2533-2543.

Gellert, M. Molecular analysis fo V(D)J recombination. *Annu. Rev. Genet.* 1992;22:425-446.

Grossbard, M., O.W. Press, F.R. Appelbaum, et al. Monoclonal antibody-based therapies of leukemia and lymphoma. *Blood* 1992;80:863-878.

Gold, M.R., D.A. Law y A.L. DeFranco. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by the B-lymphocyte antigen receptor. *Nature* 1990;345:810-813.

Gold, M.R., L. Matsuuchi, R.B. Kelly y A.L. DeFranco. Tyrosine phosphorylation of components of the B-cell antigen receptors following receptor crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991;88:3436-3440.

Gooding, L.R. y K.A. O'Connell. Recognition by cytotoxic T lymphocytes of cells expressing fragments of the SV40 tumour antigen. *J. Immunol.* 1983;131:2580-2598.

Hanawalt, P.C. *Trends Genet.* 1986;2:124-128.

Hartwell, L.H. y M.B. Kastan. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266:1821-1828.

Hay, R., M. Macy, A. Corman-Weinblatt, et al. *Catalogue of cell lines and hybridomas.* 239. Quinta edición. American Type Culture Collection. 1991.

Hellstrom, I., U. Garrigues, E. Lavie y K.E. Hellstrom. Antibody-mediated killing of human tumor cells by attached effector cells. *J. Exp. Med.* 1987;624-627.

Holmen, K. y B.J. Fowlkes. Preparation of cells and reagents for cytometry. 1:5.3.1. En: *Curr. Prot. Immunol.* Wiley Interscience. 1993.

Hood, L.E., I.L. Weissman, W.B. Wood y J.H. Wilson. Expression of antibody genes. 81-129. En: *Immunology*. Segunda edición. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1984.

Hornbeck, P. Enzyme-linked immunosorbent assays. Indirect cellular ELISA to detect antibodies specific for surface antigens. 1:2.1.15-2.1.16. En: *Curr. Prot. Immunol.* Wiley Interscience. 1993.

Houghton, A.N. Cancer antigens. Immune recognition of self and altered self. *J. Exp. Med.* 1994;180:1-4.

Howard, M.C., A. O'Garra, H. Ishida, et al. Biological properties of interleukin 10. *J. Clin. Immunol.* 1992;12:2920-2926.

Hu, S-L., G.D. Plowman, P. Sridhar, et al. Characterization of a recombinant vaccinia virus expressing human melanoma-associated antigen p97. *J. Virol.* 1988;62:176-180.

Humphrey, J.H. Tolerogenic or immunogenic activity of hapten conjugated polysaccharides correlated with cellular

Localization. *Eur. J. Immunol.* 1981,11:212-220.

Janeway, C.A. How the immune system recognizes invaders. *Sci. Am.* 1993;269:73-79.

Kantor, A.B. y L.A. Herzenberg. Origin of murine B cell lineages. *Annu. Rev. Immuno.* 1993;11:501-538.

Kincade, P.W. y J.M. Gimble. B lymphocytes. 43-74. En: *Fundamental Immunology*. Tercera edición. Editado por William E. Paul Raven Press, Ltd., New York. 1993.

Klein, G. y E. Klein. Evolution of tumours and the impact of molecular oncology. *Nature* 1985;315:190-195.

Klein, E. y A. Mantovani, Action of natural killer cells and macrophages in cancer. *Curr. Op. Immunol.* 1993;5:714-716.

Knuth, A., T. Wolfel y K.H. Meyer zum Buschenfelde. Cellular and humoral immune responses against cancer. Implications for cancer vaccines. *Curr. Op. Immunol.* 1991;3:659-664.

Kroemer, G., I. Moreno de Alborán, J.A. Gonzalo y C. Martínez-A. Immunoregulation by cytokines. *Crit. Rev. Immunol.* 1993;13:163-191.

Kruisbeek, A.M. Isolation of mouse mononuclear cells. Preparation of cell suspensions from spleen, thymus and lymph node. 1:3.1.2-3.1.3. En: *Curr. Prot. Immunol.* Wiley Interscience. 1993.

b.- Kruisbeek, A.M. y E. Schevach. Proliferative assays for T cell function. Blocking cellular division of accessory/stimulatory cells: Mitomycin C treatment. 1:3.12.8. En: *Curr. Prot. Immunol.* Wiley Interscience. 1993.

Law, C.L. y E.A. Clark. Cell-cell interactions that regulate the development of B-lineage cells. *Curr. Op. Immunol.* 1994;6:238-247.

Leach, D.R., M.F. Krummel y J.P. Allison. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996;271:1734-1736.

Leung, H.T. y P.S Linsley. The CD28 costimulatory pathway. *Therap. Immunol.* 1994;1:217-228.

Levitsky, H.I., A. Lazenby, R.J. Hayashi y D.M. Pardoll. In vivo priming of two distinct antitumor effector populations: The role of MHC class I expression. *J. Exp. Med.* 1994;179:1215-1224.

Lieber, M.R. Site-specific recombination in the immune system. *FASEB J.* 1991;5:2934-2944.

Lloyd, J.O. Cancer Immunology. The search for specificity-G.H.A. Clowes memorial lecture. *Cancer Res.* 1981;41:361-375.

Lloyd, K.O. y J.O. Lloyd. Human monoclonal antibodies to glycolipids and other carbohydrate antigens. Dissection of the humoral immune response in cancer patients. *Cancer Res.*

1989;49:3445-3451.

Lloyd, J. Old. *Cancer. Curr. Op. Immunol.* 1992;4:603-607.

Lombardi, G., S. Sidhu, R. Batchelor y R. Lechler. Anergic T cells as suppressor cells in vitro. *Science* 1994;264:1587-1589.

Lubeck, M.D., Z. Steplewski, F. Baglia, M.H. Klein, et al. The interaction of murine IgG subclass proteins with human monocyte Fc Receptors. *J. Immunol.* 1985;135:1299-1304.

Mantovani, A., B. Bottazzi, F. Colotta, et al. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today* 1992;13:265-270.

Marrack, P. y J.W. Kappler. How the immune system recognizes the body. *Sci. Am.* 1993;269:81-89.

Max. E.E. Immunoglobulinas: Molecular genetics. 315-382. En: *Fundamental Immunology*. Tercera edición. Editado por William E. Paul Raven Press, Ltd., New York. 1993.

Meeker, T.C., J. Lowder, D.G. Maloney, et al. A clinical trial of anti-idiotypic therapy for B cell malignancy. *Blood* 1985;65:1349-1363.

Miller, R.A., D.G. Maloney, R. Warnke y R. Levy. Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N. Engl. J. Med.* 1982;306:517-522.

Nava, G. Caracterización molecular de una línea tumoral (LR.4), que crece a través de barreras alogénicas. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. 1990.

Nava, G., R. Ocadiz, V. Ortega y G. Alfaro. Damage in β -2 m and DNA methylation of H-2 genes are involved in loss of expression of class I MHC products on the membrane of LR.4 a cell line derivative of the T-cell lymphoma L5178Y. *Eur. J. Immunogenet.* 1992;19:1-18.

Nickell, S.P., M. Keane y M. So. Further characterization of protective Trypanosoma cruzi-specific CD4+ T-cell clones: T helper type 1-like phenotype and reactivity with shed trypomastigote antigens. *Infect. Immunity* 1993;61:3250-3258.

Noelle, R.J. y E.C. Snow. T helper cell-dependent B cell activation. *FASEB J.* 1991;5:2770-2776.

Nowell, P. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194:23-28.

Nowell, P.C. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.* 1986;46:2203-2207.

Ostrand-Rosenberg, S. Tumor immunotherapy. The tumor cells as an antigen-presenting cell. *Curr. Op. Immunol.* 1994;6:722-727.

Otten, G. y W.M. Yokoyama. Flow cytometry analysis using the Becton Dickinson FACScan. 1:5.4.1-5.4.8. En: *Curr. Prot. Immunol.* Wiley Interscience, 1993.

Parker, D.C. T cell-dependent B cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 1993;11:331-360.

Paul, W.E. y R.A. Seder. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994;76:241-251.

Pike, B.L., M.R. Alderson y G.J.V. Nossal. T-independent activation of single B cells. An orderly analysis of overlapping stages in the activation pathway. *Immunol. Rev.* 1987;99:119-152.

Pleiman, C.M., D. D'Ambrosio y J.C. Cambier. The B-cell antigen receptor complex. Structure and signal transduction. *Immunol. Today* 1994;15:393-399.

Rajewsky, K. Early and late B-cell development in the mouse. *Curr. Op. Immunol.* 1992;4:171-176.

Ravetch, J.V. Fc receptors: Rubor redux. *Cell* 1994;78:553-560.

Restifo, N., F. Esquivel, Y. Kawakami, et al. Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J. Exp. Med.* 1993;177:265-272.

Ritz, J., J.M. Pesando, S.E. Sallan, et al. Serotherapy of acute lymphoblastic leukemia with monoclonal antibody. *Blood* 1981;58:141-152.

Rizzo, L.V., R.H. DeKruff y D.T. Umetsu. Generation of B cell memory and affinity maturation. Induction with Th1 and Th2 cell

clones. *J. Immunol.* 1992;148:3733-3739.

Roitt, I.M. Molecules wich recognize antigen. 31-54. En: *Essential Immunology*. Sexta edición. Editado por Blackwell Scientific Publications. 1988.

Roitt, I., J. Brostoff y D. Male. Hypersensitivity-type I. 19.1-19.22. En: *Immunology*. Tercera edición. Editado por Mosby. 1993.

Roger, R., J. Breard, M. Comisso, et al. CD28-mediated cytotoxicity of YT natural killer cells on B7-positive targets induces rapid necrotic death independent of granule exocytosis. *Cellular Immunol.* 1996;168:24-32.

Rolind, A. y F. Melchers. B lymphopoiesis in the mouse. *Adv. Immunol.* 1993;53:123-156.

Roloson, G.J., D.E. Haagensen, C.A. Chambers y D.P. Bolognesi. Immunologic control of the ascites from of murine adenocarcinoma 755. Efficacy of serum therapy is controlled by a single genetic locus. *J. Immunol.* 1981;126:2328-2341.

Roth, C., C. Rochlitz y P. Kourilsky. Immune response against tumors. *Adv. Immunol.* 1994;57:281-351.

Sanford, K.K., W.R. Earle y G.D. Likely. The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J. Natl. Canc. Inst.* 1948;9:229-246.

Schatz, D.G. V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu. Rev. Immunol.* 1992;10:359-383.

Schofield, L., J. Villaquiran, A. Ferreira, et al. Gamma-interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* 1987;330:664-666.

Schrier, P.I. y L.T.C. Peltenburg. Relationship between myc oncogene activation and MHC class I expression. *Adv. Cancer Res.* 1993;60:181-246.

Schultz, C.L., P. Rothman, R. Kuhn, et al. T helper cell membranes promote IL-4-independent expression of germ-line *Cy 1* transcripts in B cells. *J. Immunol.* 1992;149:6064.

Schwartz, R.H. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990;248:1349-1356.

Schwartz, R.J. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J. Exp. Med.* 1996;184:1-8.

Seaman, W.E., M. Sleisenger, E. Eriksson, et al. Depletion of natural killer cells in mice by monoclonal antibody to NK.1.1. Reduction in host defense against malignancy without loss of cellular or humoral immunity. *J. Immunol.* 1987;138:4539-4544.

Shih, F-M., D.E. Elder, D. Speicher, et al. Isolation and functional characterization of the A32 melanoma-associated antigen. *Cancer Res.* 1994;54:2514-2520.

Silva, J.S., P.J. Morrissey, K.H. Grabstein, et al. Interleukin 10 and interferon γ regulation of experimental Trypanosoma cruzi infection. *J. Exp. Med.* 1992;175:169-174.

Slingluff, C.L., D.F. Hunt y V.H. Engelhard. Direct analysis of tumor-associated peptide antigens. *Curr. Op. Immunol.* 1994;6:733-740.

Snapper, C.M. y W.E. Paul. Interferon- γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 1987;236:944-947.

Solbach, W., H. Moll y Rollinghoff. Lymphocytes play the music but the macrophage calls the tune. *Immunol. Today* 1991;12:4-6.

Songyang, Z., S.E. Shoelson, M. Chaudhuri, et al. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 1993;72:767-778.

Stevens, T.L., A. Bossie, V.M. Sanders, et al. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 1988;334:255-258.

Strober, W. Common immunologic techniques. Trypan blue exclusion test of cell viability. 3:A.3.3. En: *Curr. Prot. Immunol.* Wiley Interscience. 1993.

Sulitzeanu, D. Immunosuppressive factors in human cancer. *Adv. Cancer Res.* 1993;60:247-267.

- Suzuki, Y., M.A. Orellana, R.D. Schreiber, et al. Interferon- γ : The major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 1988;240:516-518.
- Tanaka, K., T. Yoshioka, C. Bieberich y G. Jay. Role of the major histocompatibility complex class I antigens in tumor growth and metastasis. *Annu. Rev. Immunol.* 1988;6:359-380.
- Tjoa, B.A. y D.M. Kranz. Generation of cytotoxic T-lymphocytes to a self-peptide/class I complex. A model for peptide-mediated tumor rejection. *Cancer Res.* 1994;54:204-208.
- Townsend, A. y H. Bodmer. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 1989;7:601-624.
- Trinchieri, G. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 1989;47:187-375.
- Tzyy-Choouwu. Immunology of the human papilloma virus in relation to cancer. *Curr. Op. Immunol.* 1994;6:746-754.
- Uchida, N., W.H. Fleming, E.J. Alpern y I.L. Weissman. Heterogeneity of hematopoietic stem cells. *Curr. Op. Immunol.* 1993;5:177-184.
- Urban, J.L. y H. Schreiber. Tumor antigens. *Annu. Rev. Immunol.* 1992;10:617-644.
- Vance, B.A., T.W.J. Huizinga, D. Wardwell y P.M. Guyre. Binding of monomeric human IgG defines an expression polymorphism of

- FcyRIII on large granular lymphocyte/natural killer cells. *J. Immunol.* 1993;151:6429-6439.
- Van Den Eynde, B., P. Hainaut, M. Herin, et al. Presence on a human melanoma of multiple antigens recognized by autologous CTL. *Int. J. Cancer* 1989;44:634-640.
- Verastegui, E., R. del Rio, V. Ortega y G. Alfaro. Specific recognition and rejection of the H-2 deficient cell line LR.4 by C57BL/6J mice. *Eur. J. Immunogenet.* 1997;24:93-103.
- Vijayasaradhi, S., B. Bouchard y A.N. Houghton. The melanoma antigen gp75 is the human homologue of the mouse *b* (*BROWN*) locus gene product. *J. Exp. Med.* 1990;171:1375-1380.
- Vijayasaradhi, S. y A.N. Houghton. Purification of an autoantigenic 75 KDa human melanosomal glycoprotein. *Int. J. Cancer* 1991;47:298-303.
- Vogelstein, B. y K.W. Kinzlen. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 1993;9:138-141.
- Wang, Z., Y. Cao, A. Albino, et al. Lack of HLA class I antigen expression by melanoma cells SK-MEL-33 caused by a reading frameshift in β -2 microglobulin mRNA. *J. Clin. Invest.* 1993;91:684-692.
- Weinhold, K.J., L.T. Goldstein y E.F. Wheelock. Tumor-dormant states established with L5178Y lymphoma cell in immunized syngenic murine host. *Nature* 1977;59:61.

Weiss, W.R., M. Sedegah, J.A. Berzofsky y S.L. Hoffman. The role of CD4+ T cells in immunity to malaria sporozoites. *J. Immunol.* 1993;151:2690-2698.

Welsh, R.M., K. Karre, M. Hansson, et al. Interferon mediated protection of normal and tumor target cells against lysis by mouse natural killer cells. *J. Immunol.* 1981;126:219-225.

Williams, G.T., C.J.G. Peaker, K.J. Patel y M.S. Neuberger. The α/β sheat and its cytoplasmic tyrosines are required for signaling by the B-cell antigen receptor but not for capping or for serine/threonine-kinase recruitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994;91:474-478.

Yamaguchi, H., K. Furukawa, S.R. Fortunato, et al. Cell-surface antigens of melanoma recongized by human monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987;84:2416-2420.

Yancopoulos, G.D. y F.W. Alt. Regulation of the assembly and expression of variable-region genes. *Annu. Rev. Immunol.* 1986;4:339-368.

APENDICE

APENDICE A
FIGURAS

ESTADOS DE MADURACION DE CELULAS B

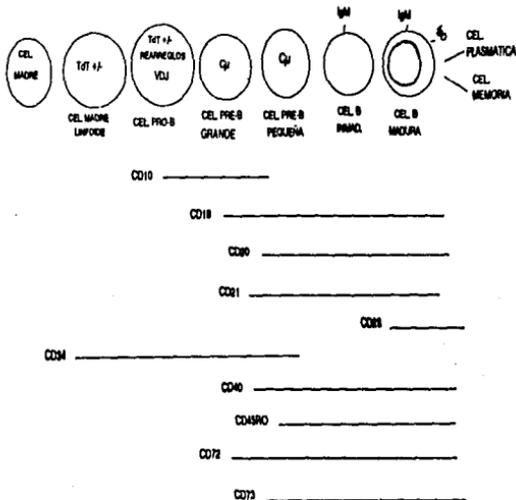


Figura 1.- Representación esquemática de los principales estados de maduración de linfocitos B. La enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) aparece antes del rearreglo y expresión de los genes IgH. La cadena μ es detectada en el citoplasma de células pre-B antes de que la molécula completa de IgM se exprese en la superficie de células B inmaduras. La expresión o ausencia de algunas glicoproteínas de la superficie pueden ser detectadas con anticuerpos monoclonales (Paul, W. 1993).

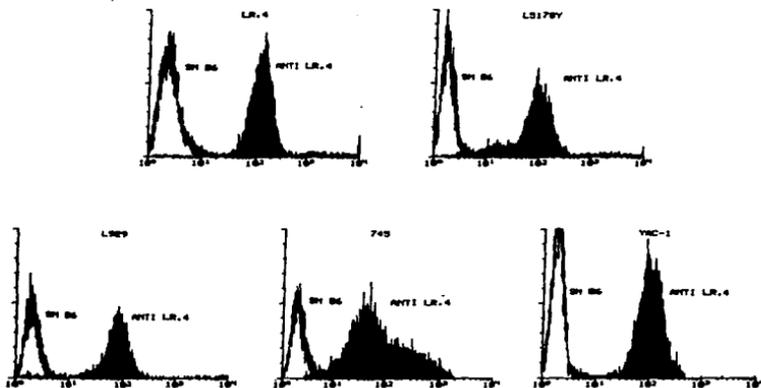


Figura 2.- Reactividad del suero anti LR.4 contra líneas celulares de diferentes haplotipos. La dilución empleada del suero fué de 1:20. Los histogramas representan intensidad de la fluorescencia contra número de células.

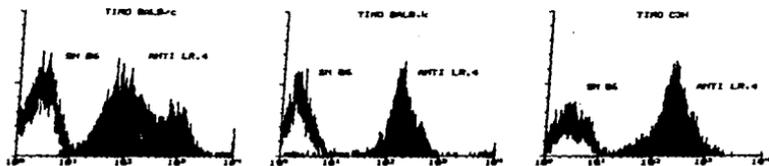


Figura 3.- Reactividad del suero anti LR.4 contra célula T normales provenientes de timo. Los ratones empleados fueron de los haplotipos H-2^d (BALB/cAnN) y H-2^k (BALB.k y C3HeB/FeJ).

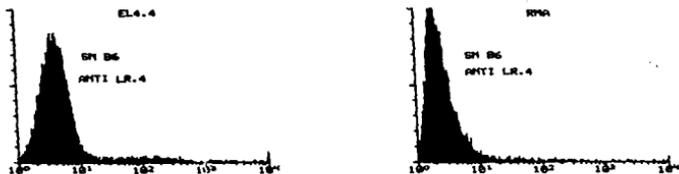


Figura 4.- Reactividad del suero anti LR.4 contra líneas celulares provenientes de ratones C57BL/6J: EL4.4 y RMA. La dilución de suero utilizada en este experimento fué de 1:20; sin embargo, los mismos resultados se registraron utilizando el suero sin diluir.

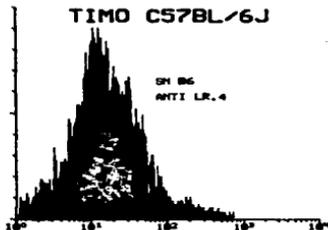


Figura 5.- Reactividad del suero anti LR.4 contra células T normales provenientes del timo de ratones C57BL/6J. El análisis fué realizado en un citómetro de flujo Becton Dickinson. El histograma representa la intensidad de fluorescencia contra número de células. La dilución de suero empleada fué de 1:20; sin embargo, los mismos resultados se registraron utilizando el suero sin diluir.

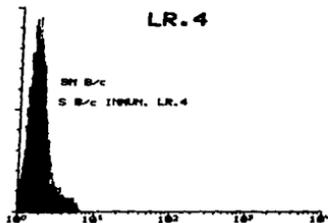


Figura 6.- Reactividad del suero obtenido de ratones BALB/c transplantedos ip con LR.4. La dilución empleada del suero fué de 1:20; sin embargo, mostró la misma reactividad empleandose suero sin diluir.

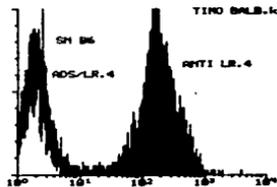
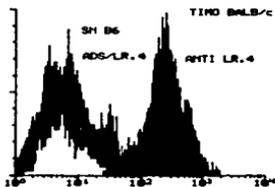
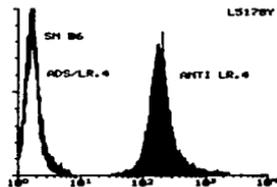
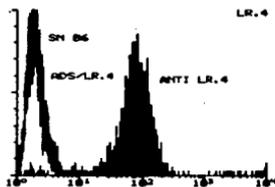


Figura 7.- Reactividad del suero anti LR.4 adsorbido con la línea celular LR.4. Las células empleadas fueron LR.4, L5178Y, células T provenientes del timo de ratones BALB/c y BALB.k. En todos los histogramas se muestra el suero anti LR.4 antes de ser adsorbido. Resultados semejantes se presentaron cuando se adsorbió con L5178Y.

No. de Ratones	Inmunización	Protección (%)
6	Timos C57BL/6J	0/6 (0)
6	Timos BALB/c	6/6 (100)
6	Timos BALB.k	6/6 (100)

Tabla II.- Inmunización de ratones C57BL/6J con células obtenidas de timo de ratones de diferentes haplotipos. La protección fué evaluada como positiva si los ratones no desarrollaban un crecimiento tumoral en la cavidad peritoneal en un periodo de 50 días aproximadamente.

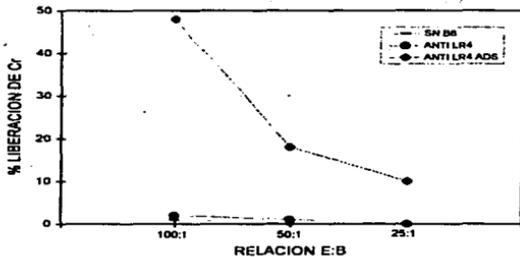


Figura 8.- Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Los anticuerpos provienen del suero de ratones C57BL/6J inmunizados con la línea celular LR.4. En todos los casos la célula blanco fue LR.4 y las células efectoras fueron obtenidas del bazo de ratones vírgenes B6.

No. de Ratones	SN B6	SI Anti LR.4	Protección (%)
6	Si	No	0/6 (0)
6	No	Si	6/6 (100)
6	No	No	0/6 (0)
6	No	Suero ads.	0/6 (0)

Tabla III.- Ensayo de protección in vivo mediante la transferencia pasiva de suero Anti LR.4 o el suero adsorbido. A todos los ratones se les transfirió ip 15 μ l de suero o de PBS. La protección fué evaluada en igual forma como la descrita en la tabla II.

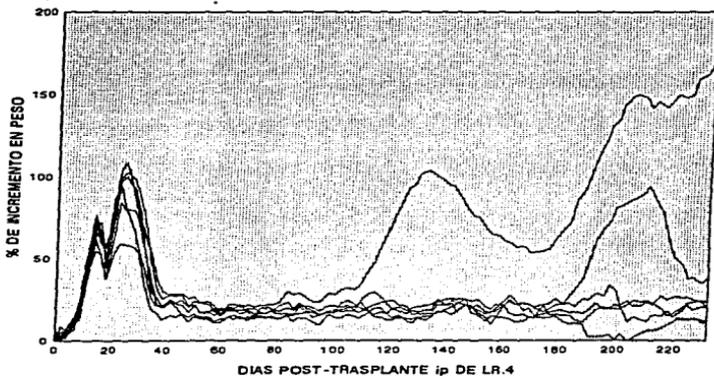


Figura 9.- Gráfica del comportamiento de LR.4 en la cavidad peritoneal de ratones B6C. La gráfica muestra los días post-trasplante ip de LR.4 contra el porcentaje de incremento en peso. Los tipos de crecimiento están descritos en la sección de Resultados y Discusión.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

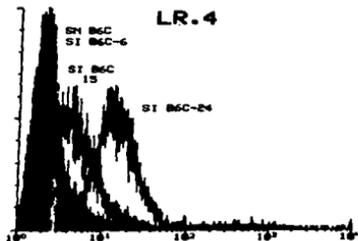
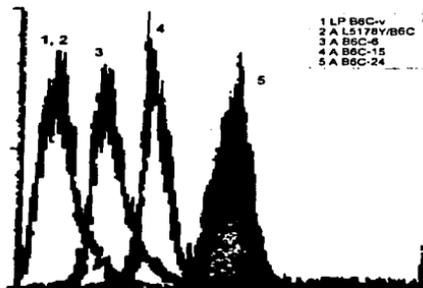


Figura 10.- Concentración de anticuerpos anti LR.4 provenientes del suero de ratones B6C. Todos los sueros se utilizaron sin diluir. El histograma muestra la intensidad de la fluorescencia contra el número de células.



**Figura 11.- Concentración de anticuerpos anti LR.4
provenientes del líquido de la cavidad peritoneal
de ratones B6C. Todas las muestras se utilizaron
sin diluir.**

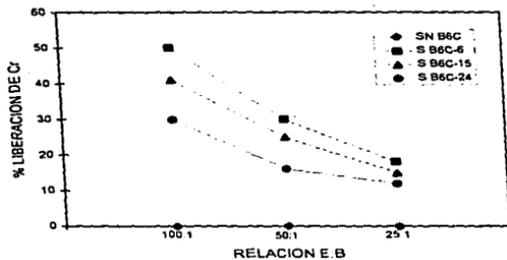


Figura 12.a.- Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Los anticuerpos provienen del suero de ratones B6C transplantados con LR.4.

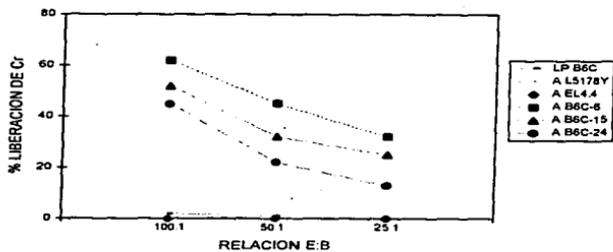


Figura 12.b.- Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Los anticuerpos provienen del liquido obtenido de la cavidad peritoneal de ratones B6C transplantados con LR.4.

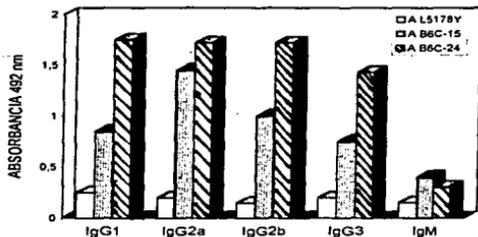


Figura 13.- Determinación del isotipo de inmunoglobulina. En este experimento se utilizó el líquido obtenido de la cavidad peritoneal de ratones B6C transplantados con LR.4 (dilución 1:5). La determinación se realizó por la técnica de ELISA.

APENDICE B

Amortiguadores utilizados

Amortiguador de fosfatos (PBS):

1.9 mM NaH_2PO_4 , anh.

8.1 mM NaH_2PO_4 , anh.

154 mM NaCl

Ajustar pH a 7.2-7.4 con NaOH, 1M.

Utilizar filtro de 45 μm de diámetro

Amortiguador de Lisis de Eritrocitos (ACK):

0.015 M NH_4Cl

1.0 mM KH_2CO_3 ,

0.1 mM Na_2EDTA

Ajustar pH a 7.2-7.4 con HCl, 1 N.

Esterilizar por filtración.

Amortiguador de Carbonatos (ELISA):

15 mM Na_2CO_3 ,

35 mM NaHCO_3 ,

3.1 mM NaN₃,

Ajustar pH a 9.5

Amortiguador de Citratos (ELISA):

0.05 mM de ácido cítrico

0.048 mM de citrato de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$

Ajustar pH a 4.5

APENDICE C

Soluciones utilizadas

Solución de bloqueo (ELISA)

0.05% Tween 20
1.0 mM Na₂EDTA
0.25% ASB
0.05% NaN₃
Aforar con PBS

Solución de lavado (ELISA)

250 μ L Tween 20
500 mL PBS

Sustrato Ortofenilendiamina (OFD, ELISA)

12 mg OFD
12 mL Amortiguador de citratos
4.8 μ L H₂O₂, 30%
Se prepara antes de su uso en la oscuridad.

H₂SO₄ 1M (ELISA)

54.5 mL H₂SO₄ (δ =1.835)
Aforar a 1.0 L con H₂O d.

Solución de lavado (Inmunofluorescencia)

3 % ASB

0.1 % NaN₃

Aforar PBS. Utilizar filtro de 45 μ m.

Mitomicina C (MMC)

2.0 mg Mitomicina C (Sigma)

4.0 mL Agua bidestilada

Guardar a 4°C en la oscuridad

APENDICE D

Medios de cultivo

Medio de Cultivo RPMI-1640

20.8 g RPMI-1640 (GIBCO/BRL)

5.0 g Dextrosa

1.9 L de H₂O d

Ajustar pH a 7.2-7.4 con NaHCO₃.

Esterilizar por filtración.

RPMI-1640 suplementado

500 mL RPMI-1640

5 mL Piruvato de sodio (Sigma), 100 mM

5 mL Aminoácidos no esenciales (Sigma), 10 mM

1 mL Fungizona (Gibco/BRL), 1%

1 mL Estreptomicina (Sigma), 0.2 %

50 mL SFB (Gibco/BRL)

Esterilizar por filtración.