

25
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

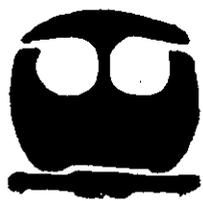


EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

EFFECTO DE LA INTERACCION CD40-CD40L EN LA
PRESENTACION DE ANTIGENOS ENDOGENOS Y EXOGENOS
POR MOLECULAS CLASE II DEL COMPLEJO MAYOR
DE HISTOCOMPATIBILIDAD

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
ABIGAIL SOLEDAD CLATZA JUAREZ



MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

258707



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente

Prof. Hernández Montes Homero

Vocal

Prof. Leon Chapa Saturnino de

Secretario

Prof. Bonifaz Alfonso Laura Cecilia

1er. Suplente

Prof. López Gonzalez José Sullivan

2o. Suplente

Prof. Cruz García Felipe

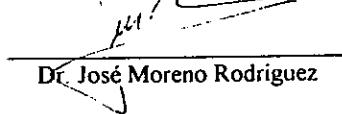
Sitio donde se desarrolló el tema: Unidad de Investigación Médica en Reumatología e
Inmunobiología. Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional Siglo XXI

Asesor del tema de tesis:



M. en C. Bonifaz Alfonso Laura Cecilia

Supervisor técnico:



Dr. José Moreno Rodríguez

Sustentante:



Abigail Clatza Juárez

DEDICATORIA

A mis padres porque gracias a ellos
soy lo que soy.

A mi hermano y amigo
por su apoyo incondicional.

A mi abuelita que con paciencia
siempre estuvo a mi lado.

A Genaro que con su amor ha cambiado
mi forma de ver la vida.

A mis amigas por su amistad
y palabras de aliento.

A mis maestros por sus enseñanzas
y sabios consejos.

Y de manera muy especial a Sola
por esos diez años de cariño y
compañía.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por haberme dado la oportunidad de formarme profesionalmente.

A la M. en C. Laura Bonifaz por sus enseñanzas profesionales y personales, al Dr. José Moreno por haberme permitido trabajar en su laboratorio y conocer la ciencia con la mayor libertad posible.

INDICE

Contenido	Pág.
- Lista de Abreviaturas	1
- Resumen	2 - 3
- Introducción	4 - 7
- Antecedentes	8 - 21
A) Estructura de CD40 y su ligando	8 - 9
B) Expresión de CD40 y CD40L	9 - 10
C) Efectos de la interacción CD40-CD40L	10 - 21
* Efectos en monocitos/macrófagos	11
* Efectos en células dendríticas	11
* Efectos en Linfocitos B	12 - 21
1.-proliferación	12 - 13
2.- Producción de anticuerpos y cambio de isotipo	13 - 16
3.-Generación de centros germinales y linfocitos B de memoria	16 - 17
4.-Modificación de moléculas coestimuladoras y de adhesión	17 - 18
5.- Procesamiento y presentación de antígenos	19 - 21
- Planteamiento del problema	22
- Hipótesis	23
- Objetivos	24

- Modelo experimental	25
- Material y métodos	26 - 32
A) Reactivos y anticuerpos	26
B) Lineas celulares	27
C) Inmunofluorescencia	28
D) Activación de linfocitos T	28 - 29
E) Determinación de moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad en superficie de linfocitos B	29
F) Ensayos de presentación de antígeno	29-32
- Resultados	33 - 53
A) Caracterización del fenotipo de lineas celulares	33 - 36
B) Estimulación de linfocitos B con CD40L	37 - 42
C) Estimulación de Linfocitos B con anticuerpos monoclonales anti-CD40	42 - 53
- Discusión	54 - 59
- Conclusión	60
- Bibliografía	61 - 67

LISTA DE ABREVIATURAS

CPA: Célula presentadora de antígenos

Ag: Antígeno

MHC: Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad

MHC II: Moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad

L_T: Linfocito T

L_T^{CD4}: Linfocito T CD4 inductor

L_T^{CD8}: Linfocito T CD8 citotóxico

L_B: Linfocito B

TCR: Receptor de linfocitos T

LG: Lisozima de gallina

IL: Interleucina

TNF: Factor de necrosis tumoral

TNFr: Receptor del factor de necrosis tumoral

RE: Retículo endoplásmico

Ii: Cadena Invariante

CLIP: Péptido de cadena invariante asociado a moléculas MHC II

MIIC: Compartimento de moléculas MHC II

RESUMEN

Una de las funciones de las células presentadoras de antígenos es el procesamiento y presentación de antígenos por las moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC II) al linfocitos T^{CD4}. El procesamiento del antígeno depende de sistemas que participan en su degradación para generar péptidos capaces de unirse a las moléculas MHC II para ser así presentados a los linfocitos T^{CD4}.

CD40 es una proteína expresada constitutivamente en las células presentadoras de antígenos. Su ligando, CD40L, se expresa primordialmente en linfocitos T^{CD4} activados. La interacción de CD40 y su ligando ha sido ampliamente estudiada en los linfocitos B. En estos se ha demostrado que induce proliferación, cambio de isotipo, formación de centros germinales, prevención de apoptosis en centros germinales, generación de células de memoria, aumento en la expresión de moléculas como: MHC II, B7, ICAM-I y LFA-3. Sin embargo, a pesar de que esta interacción induce cambios profundos en la célula presentadora de antígenos, su papel en el procesamiento y presentación de antígenos se ha estudiado poco. Algunos estudios al respecto sugieren que esta interacción mejora la capacidad presentadora de antígeno, aunque el mecanismo responsable aún es desconocido.

Este trabajo se realizó para establecer un modelo que permitiera estudiar los efectos de la estimulación de linfocitos B vía CD40 en el procesamiento y presentación de antígenos por las moléculas MHC II. Además, se determinó si el efecto de esta estimulación es dependiente de la concentración del antígeno exógeno y del origen de la proteína. El antígeno utilizado fue la lisozima de gallina. Se examinó la presentación del antígeno en dos líneas de linfocitos B, una que expresa en forma endógena la lisozima de gallina (LG-

LKDEL) y otra a la que se le administró en forma exógena la proteína. El análisis consistió, por un lado, en evaluar la presentación de antígenos de linfocitos B estimulados a través de CD40 (CD40L o anticuerpo anti-CD40). Además, de evaluar la expresión de MHC II bajo estas condiciones.

Los resultados obtenidos indican que hay diferencias en el efecto generado por la estimulación de linfocitos B vía CD40 en la presentación de lisozima de gallina exógena (LG) y de la forma endógena (LG-LKDEL). En el primer caso, el estímulo vía CD40 aumentó sutilmente la presentación de antígenos, pero sólo a bajas concentraciones. Este efecto no fue atribuible al procesamiento del antígeno ni a un aumento en la expresión de moléculas MHC II. En el caso de la LG-LKDEL, el efecto de la estimulación a través de CD40 permitió observar una respuesta no detectable en condiciones basales y aumentar una ya presente, lo que sugiere la presencia de mecanismos adicionales que favorecen la presentación de antígenos endógenos.

INTRODUCCION

Las células responsables de la respuesta inmune específica son los linfocitos, los cuales por su sitio de maduración se han dividido en linfocitos B (L_B) y linfocitos T (L_T). Una de las principales diferencias entre estas células es su forma de reconocer al antígeno (Ag). Los L_B reconocen al antígeno en su forma nativa a través de su inmunoglobulina de superficie, mientras que los L_T requieren que el antígeno, casi siempre proteico, sea procesado y presentado en forma de péptidos unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad para ser reconocidos por el receptor de linfocitos T (TCR). Existen dos tipos de L_T ; linfocitos T^{CD4} y linfocitos T^{CD8} , los primeros reconocen péptidos unidos a moléculas del MHC clase II mientras que los segundos reconocen los péptidos unidos a las moléculas MHC clase I.

En la generación de una respuesta de L_B (humoral) intervienen una serie de factores como la naturaleza bioquímica del antígeno. Así, tenemos dos tipos fundamentales de antígenos: los timo independientes y los timo dependientes. Los primeros se caracterizan por ser principalmente polisacáridos capaces de inducir una respuesta por el entrecruzamiento de las inmunoglobulinas de superficie, mientras que los antígenos timo dependientes son proteínas cuya unión a la inmunoglobulina de superficie es insuficiente para activar directamente al L_B . Así, en la generación de una respuesta de L_B a antígenos timo dependientes es necesaria, la participación de L_T^{CD4} . Para una óptima colaboración de estos se requiere su activación, para lo cual es necesaria la interacción con una célula presentadora de antígenos (CPA), una de las cuales son los L_B ¹.

En la comunicación L_T-L_B intervienen tanto interacciones celulares como moléculas solubles. La primera categoría incluye la interacción física célula-célula entre las cuales encontramos: moléculas de adhesión, TCR-MHC-péptido y moléculas coestimuladoras. La segunda categoría esta integrada por moléculas solubles como las interleucinas (IL) 2, 4, 10, etc.^{2,3}

Entre las interacciones de superficie son importantes las moléculas de adhesión; en particular, LFA-1, ICAM-3 y CD2 en L_T , las cuales interactúan con ICAM-1 (ICAM2) (ICAM-3), LFA-1 y LFA-3 en CPA respectivamente. Estas interacciones permiten una aproximación entre ambas células para facilitar el reconocimiento del péptido unido a las moléculas del MHC, lo cual constituye la primera señal de activación del L_T^3 . Sin embargo, esta señal no es suficiente. Por lo tanto, se requiere una segunda señal la cual es generada por moléculas coestimuladoras.

Los sistemas de coestimulación más conocidos son B7 y CD40 con sus respectivos ligandos. La primera pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se han encontrado dos variantes B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) que se expresan en CPA activadas. Sus ligandos son CD28, expresado constitutivamente por L_T y CTLA-4 expresada en L_T activados^{4,5}. La interacción con CD28 induce una señal de activación mientras que la interacción con CTLA-4 genera una señal inhibitoria al L_T^6 .

La segunda pareja de moléculas coestimuladoras es CD40 y su ligando (CD40L). Ambas son glicoproteínas, la primera se expresa constitutivamente en las CPA y pertenece a la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF α), mientras que la segunda se

expresa predominantemente en L_T^{CD4+} activados⁷ y pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF).

La importancia de la interacción de CD40 y su ligando fue inicialmente demostrada en pacientes con síndrome de hiper-IgM que se caracteriza por niveles altos de IgM pero niveles reducidos de otros isotipos en la respuesta a antígenos timo dependientes. Este problema es secundario a mutaciones en el gen de CD40L.

La interacción de CD40-CD40L tiene numerosos efectos que dependen del tipo de célula que exprese el receptor, su estadio de maduración y la presencia de otras señales coestimuladoras.

Los efectos de la estimulación vía CD40 han sido estudiados en los L_B y se sabe que interviene en su proliferación, locomoción, cambio de isotipo, formación de centros germinales, prevención de apoptosis, generación de L_B de memoria, aumento en la expresión de moléculas como MHC II, B7, ICAM-1, LFA-3. Sin embargo, a pesar que esta interacción induce cambios profundos en la CPA, su papel en el procesamiento y presentación de antígenos se ha estudiado poco³.

El procesamiento y presentación de antígenos consiste, en términos generales en la generación de péptidos provenientes de un antígeno para formar los complejos péptidos-MHC, los cuales van a ser reconocidos por el TCR en el L_T para iniciar una respuesta inmune.

Los antígenos pueden ser endógenos o exógenos. Los primeros son derivados de proteínas que se sintetizan en el interior de la célula, su procesamiento depende de su localización intracelular. Los antígenos exógenos son proteínas que ingresan a la célula por

endocitosis mediada por receptor, por micropinocitosis o por fagocitosis. Su procesamiento ocurre en compartimentos de la vía endocítica.

Los péptidos derivados de antígenos exógenos son presentados preferentemente por las moléculas del MHC II a L_T^{CD4} . Sin embargo, la mayoría de los péptidos unidos a estas moléculas derivan de proteínas endógenas. Estos péptidos pueden generarse en diferentes compartimentos dependiendo de su localización intracelular, aunque su unión a las moléculas del MHC II parece ocurrir sólo en la vía endocítica, se desconoce el sitio exacto de generación y de unión a péptidos^{9,10}.

Los estudios sobre el efecto de la estimulación de L_B a través de CD40 y el procesamiento y presentación de antígenos han sugerido que este estímulo aumenta la eficiencia de la presentación. Los mecanismos propuestos para dicho efecto involucran un aumento en la expresión de B7 o de los sistemas de degradación del antígeno^{11,12}.

Una de las funciones del L_B es la presentación de antígenos, el cual induce la primera señal de activación al L_T . Este, en conjunto con otras señales, es capaz de iniciar una respuesta inmune. Esta respuesta puede ser hacia antígenos extraños o propios. En el primer caso se induciría una respuesta deseable, mientras que en el segundo se podría romper la tolerancia e iniciar un proceso autoinmune¹³.

Debido a que CD40 es una molécula expresada constitutivamente en L_B y su estimulación a través de la misma induce cambios profundos como CPA, consideramos de importancia establecer un modelo que nos permita estudiar el efecto de la estimulación del L_B a través de CD40 en la presentación de antígenos por las moléculas del MHC II y el análisis posterior de los mecanismos moleculares involucrados.

ANTECEDENTES

* ESTRUCTURA DE CD40 Y SU LIGANDO

CD40

La molécula CD40 fue identificada en 1985-86 mediante el uso de anticuerpos monoclonales. Su cDNA fue aislado en 1989 a partir de un linfoma de Burkitt. La molécula CD40 humana es una glicoproteína tipo I de 45-50 KDa que pertenece a la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFr)^{2,14}. Esta compuesta de 277 aminoácidos (aa), de los cuales 193 integran el dominio extracelular, 22 aa el dominio transmembranal y 62 aa la región citoplasmática. Su localización en el genoma es en el cromosoma 20 q11.2-q13.2.

El CD40 murino fue clonado a partir L_B estimulados con lipopolisacárido (LPS) e IL-4 y mediante una hibridación cruzada con una sonda de cDNA humano. El CD40 murino está compuesto de 305 aa de los cuales 193 pertenecen a la región extracelular, 22 aa. al dominio transmembranal y 90 aa. a la región intracelular. El CD40 humano y el murino tiene una homología del 62%³.

Recientemente se ha caracterizado una forma soluble de CD40 (en líneas celulares de L_B humanos) de la cual se desconoce exactamente su origen, pero se cree que proviene del procesamiento proteolítico de la forma expresada en la superficie de la CPA^{7,15,17}.

Ligando de CD40 (CD40L)

El CD40L murino fue aislado del timoma EL-4 usando una proteína de fusión, CD40-Fc. Su cDNA determinó que se trata de una glicoproteína tipo II de 33-39 KDa, de

260 aa, de los cuales 215 pertenecen a la región extracelular, 24 aa. a la transmembranal y 22 aa al dominio intracelular ^{7,18}.

El CD40L humano fue clonado a partir de L_T^{CD4+} mediante una hibridación con sondas del cDNA del CD40L murino. Este presentó una identidad del 78 % con el murino y fue localizado en el cromosoma X. Ambas proteínas pertenecen a la familia del TNF^{7,19}.

Se ha detectado una forma soluble de CD40L el cual se identifico en sobrenadantes de L_T activados con una cinética de expresión muy similar a la forma transmembranal. Su masa relativa (Mr) es de 18 KDa y se origina por procesamiento proteolítico en microsomas, en los cuales pierde la región transmembranal y parte de la extracelular, conservando la capacidad de unión a su receptor ^{19,20}.

EXPRESION DE CD40 Y SU LIGANDO

CD40

CD40 se expresa constitutivamente en CPA, entre las cuales encontramos; L_B^{22} , células dendríticas²³ y monocitos²⁴. También se ha localizado en otras células como son fibroblastos, epitelio tímico²⁵, células endoteliales y algunos carcinomas .

Algunos autores han reportado la expresión de CD40 en L_T^{26} sin embargo este resultado es controvertido ya que también se ha localizado CD40 soluble unido a su ligando en la superficie de L_T^{27} .

Ligando de CD40 (CD40L)

El CD40L se detectó inicialmente en L_T^{CD4+} activados y en menor proporción en L_T^{CD8+} , posteriormente se identificó en $L_T \gamma\delta$ pero en menor proporción que los $L_T \alpha\beta$ ²⁸⁻³⁰. Entre otras células que expresan ésta molécula encontramos; basófilos, eosinófilos³¹, células NK³², L_B ³³ y células dendríticas³⁴.

La expresión de esta molécula ha sido estudiada ampliamente en L_T^{CD4} . En estos, el CD40L se detecta en la superficie de la célula 1-2 h después de su activación con concanavalina A o anticuerpos anti-CD3, mostrando una máxima expresión entre las 6-8 h y disminuyendo entre las 24-48 h post-activación³⁵.

Es importante señalar que la expresión de esta molécula es transitoria y requiere previa activación celular.

De los mecanismos de regulación de CD40L, se conoce poco. Algunos estudios sugieren que la interacción con su receptor (CD40) disminuye su expresión^{27,36}.

EFFECTOS DE LA INTERACCION CD40-CD40L

Se han reportado numerosos efectos de la interacción CD40-CD40L los cuales dependen del tipo de célula que exprese el receptor, el estadio de maduración de la célula, así como la presencia o ausencia de otras señales.

A continuación se describirán en forma breve los efectos de esta interacción en las principales células que expresan el receptor.

*Monocitos/macrófagos

La estimulación de monocitos mediante células transfectadas con CD40L o anticuerpos anti-CD40 induce su agregación homotípica, previene la apoptosis, aumenta la expresión de CD54, MHC II, CD86 y CD40, así como la inducción de la producción de TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IFN α , colagenasa y óxido nítrico³⁷⁻⁴¹.

Todas estas modificaciones se reflejan en un aumento en la capacidad microbicida y tumoricida de los macrófagos, así como en la posible generación de una respuesta celular Th1, la cual interviene en el control de algunas infecciones por microorganismos intracelulares^{42,43}.

*Células dendríticas

Las células dendríticas aisladas de piel, sangre periférica, bazo, así como las generadas *in vitro* a partir de células del cordón umbilical (CD34⁺) en presencia de GM-CSF + TNF α o IL-4, expresan constitutivamente CD40. El entrecruzamiento de esta molécula genera diversos cambios en las células dendríticas. Dentro de estos cambios encontramos; mayor supervivencia, aumento en la expresión de MHC II, CD58, CD80, CD86 y CD25, así como la inducción de la secreción de IL-8 y TNF α ^{42,44}.

Recientemente se ha publicado que la interacción CD40-CD40L en células dendríticas generadas *in vitro* induce la expresión funcional de CD40L la cual es capaz de inducir proliferación y cambio de isotipo en L_B³⁴.

* Linfocitos B

Son abundantes los estudios realizados sobre los efectos de la estimulación vía CD40 en los L_B y se ha observado que estos dependen en gran medida del grado de entrecruzamiento del receptor así como de la presencia de otras señales⁴⁵⁻⁴⁷. Respecto al primer punto se refiere al origen del estímulo, como en el caso de los anticuerpos anti-CD40 (siendo importante el epitopo reconocido, isotipo del anticuerpo, afinidad ,etc) o mediante CD40L (cuyo efecto dependerá del grado de oligomerización). El segundo punto se refiere a la presencia de moléculas solubles o de membrana, las cuales pueden amplificar o generar un efecto diferente^{48,49}.

Los principales efectos generados en el L_B por la estimulación a través de CD40 son:

- Proliferación
- Producción de anticuerpos y cambio de isotipo
- Generación de centros germinales y de L_B de memoria
- Modificación en moléculas coestimuladoras y de adhesión
- Procesamiento y presentación de antígenos

A continuación se describe en forma breve cada uno de estos efectos.

Proliferación

Uno de los efectos al estimular L_B (murinos o humanos) vía CD40 es el aumento en la síntesis de DNA y la proliferación celular. Este efecto ha sido reproducido en múltiples sistemas utilizando diferentes fuentes de estímulos: fibroblastos de mono CV-1/EBNA

transfectados con CD40L, anticuerpos anti-CD40 (soluble, inmovilizado), CD40L recombinante, etc.

En la mayoría de los casos la estimulación vía CD40 es suficiente para inducir proliferación (aproximadamente de 3-6 veces, dependiendo del tipo de estímulo) la cual es magnificada por la presencia de IL-2, IL-4, IL-5 o IL-10⁵⁰⁻⁵³. Sin embargo, algunos autores han reportado que el aumento en la proliferación sólo ocurre en presencia de las IL antes mencionadas⁴⁸.

Otros factores que potencian el efecto mitógeno de la estimulación vía CD40 son el entrecruzamiento de la inmunoglobulina de superficie y la presencia de otras moléculas coestimuladoras. Respecto al primer punto, se ha reportado que la coestimulación de Ig de superficie (con anticuerpos anti- μ , anti- δ) y CD40 (fibroblasto transfectado FcR yII + anti CD40) aumenta la proliferación del L_B⁵⁴. El segundo punto se origina de la observación de que membranas de L_T activados son más eficientes para inducir la proliferación que la estimulación con CD40L transfectado en fibroblastos, anti-CD40 unido a Fc-CDw32 y anti-CD40 fijado en la placa, estos resultados sugieren que el efecto mitógeno se incrementa por otras moléculas coestimuladoras ausentes en los otros sistemas de estimulación⁵⁵.

Producción de anticuerpos y cambio de isotipo

El cambio de isotipo representa la capacidad del L_B para producir inmunoglobulinas de clase diferente a IgM. A nivel molecular consiste en la asociación de los segmentos previamente rearrregados de la región variable VDJ con un nuevo segmento de la región

constante⁹. Este fenómeno permite al L_B expresar anticuerpos con la misma especificidad pero de distinta clase y por lo tanto con diferente función biológica.

El papel del sistema CD40 y su ligando en el cambio de isotipo fue demostrado de forma concluyente a través del síndrome de hiperIgM, el cual se caracteriza por una mutación en el cromosoma X que impide la generación de formas funcionales de CD40L. La falta de interacción de CD40 con su ligando se traduce en una marcada disminución de las Igs de isotipo diferente a IgM y niveles normales o mayores de ésta³.

Aunque la señalización a través CD40 es necesaria para el cambio de isotipo no es la única vía, ya que se ha reportado la producción de bajas concentraciones de IgG en ausencia de CD40L, lo cual sugiere la existencia de otro mecanismo alternativo aunque menos eficaz.

La producción de anticuerpos y el cambio de isotipo inducidos vía CD40 son altamente dependientes de la presencia de otras moléculas, siendo las más estudiadas las citocinas las cuales no sólo intervienen en la producción cuantitativa de anticuerpos si no también juega un papel decisivo en la clase de inmunoglobulina producida.

A continuación se describe el efecto de la estimulación a través de CD40 en la producción de los diferentes clases de Igs.

a) *IgM*

Estudios *in vivo* en los que se bloquea la interacción CD40 y su ligando mediante la proteína de fusión CD40-Fc han demostrado que la producción de IgM no disminuye por la ausencia de esta interacción, lo cual indica un mecanismo alternativo para la secreción de IgM independiente de CD40L³⁶.

Aunque la secreción de IgM es independiente de CD40L, su producción se aumenta por la interacción de CD40-CD40L y la presencia de interleucinas (IL)⁵⁵.

Algunos estudios indican que la IL-10⁽⁴⁵⁾, IL-2, IL-5, y la combinación IL-5+IL-4 ⁵² aumentan la producción de IgM mientras que el TGF- β la inhibe (en linfocitos B humanos)⁴⁸

b) *IgE*

Existe una amplia variedad de reportes que apoyan la producción de IgE en respuesta a la señalización vía CD40 + IL-4 (sistemas murinos y humanos). Este efecto ha sido reproducido en múltiples sistemas en donde el estímulo de CD40 es proporcionado por células transfectadas con CD40L, membranas de L_T activados, anticuerpos anti-CD40, etc^{50,52,57}

Otras IL s que favorecen la producción de IgE en L_B humanos son IL-10, IL -5 (las cuales tienen un efecto sinérgico con la IL-4⁴⁹, IL-13 y el TNF- α ⁵⁸.

Algunas de las citocinas que disminuyen la producción de IgE son TGF- β y el IFN- γ ⁵¹.

c) *IgA*

Las citocinas involucradas en la secreción de IgA de L_B (murinos y humanos) estimulados vía CD40 son IL-10, TGF- β y IL -2 ^{52,55,59}.

d) *IgG*

respuesta a varias citocinas siendo las más notables las IL-10, IL-4, IL-13 y IL-2^{48,58} mientras que TGF β disminuye su producción⁵¹.

Generación de centros germinales y L_B de memoria

Entre los eventos más importantes que ocurren en los centros germinales son: la mutación somática, la generación de L_B de memoria, el cambio de isotipo y la diferenciación a células plásmaticas. La mutación somática es un evento aleatorio en el cual ocurren mutaciones puntuales en la región variable del receptor de Ig las cuales pueden conducir a un aumento o disminución en la afinidad por el antígeno o bien un cambio de especificidad⁶¹.

En la selección de los L_B intervienen las células dendríticas foliculares las cuales retienen el antígeno por largos períodos de tiempo y los L_T^{CD4}.
Aparentemente el mecanismo de selección consiste en rescatar de apoptosis los L_B cuyo receptor tenga afinidad por el antígeno, mientras que las otras células morirán.
Así los L_B que sobrevivieron tendrán dos diferentes destinos posibles: diferenciarse a célula plásmatica o dar origen a los L_B de memoria.

Estudios realizados *in vivo*, bloqueando la interacción del CD40L con su receptor mediante anticuerpos anti-CD40L, inhibieron la formación de centros germinales⁶². Este resultado sugirió la importancia de esta interacción en la formación de centros germinales, lo cual fue confirmado cuando se demostró que en los pacientes con hiper-IgM hay ausencia de centros germinales⁶³.

Otro de los efectos de la interacción CD40-CD40L es en el destino de los L_B. Como previamente se mencionó, los L_B tienen que recibir señales que los rescaten de la apoptosis,

estudios realizados en esta área indican que estas señales provienen del entrecruzamiento del receptor del L_B con el antígeno y de la interacción de CD40 con su ligando^{64,65}.

Una vez que el L_B es rescatado de la muerte por apoptosis tiene que diferenciarse a célula de memoria o plásmatica. En este periodo de diferenciación la interacción CD40-CD40L juega un papel muy importante.

Estudios bloqueando la interacción CD40-CD40L *in vivo* inhiben la generación de L_B de memoria^{62,65}. Por otro lado, algunos autores sugieren que un contacto prolongado del L_B con CD40L en presencia de IL-2 e IL-10 favorece su diferenciación hacia célula de memoria, mientras en ausencia del ligando se favorece su diferenciación hacia célula plasmática⁶⁶.

Modificación de moléculas coestimuladoras y de adhesión

En la generación de una respuesta inmune intervienen una serie de moléculas que para su estudio hemos dividido en moléculas de adhesión y coestimuladoras. Las primeras intervienen tanto en el contacto inicial, como en la estabilización de la interacción L_T-L_B permitiendo un óptimo reconocimiento TCR-MHC-péptido. Esta interacción genera una señal de activación la cual no es suficiente y son requeridas segundas señales provenientes de moléculas coestimuladoras.

La interacción CD40 con su ligando regula la expresión de moléculas de adhesión, moléculas del MHC II y coestimuladoras.

La estimulación de L_B humanos y murinos con anticuerpos anti-CD40 incrementa la expresión de CD54 (ICAM-1), LFA-1 (CD11a/CD18) y VLA-4^{67,68}. Utilizando L_B humanos

activados con CD40L se incrementa la expresión de ICAM-1 y CD58 (LFA-3), la cinética de expresión de la primera molécula indica que es una de las primeras que se inducen, su expresión se aumenta a partir de las 6 horas después de la estimulación de CD40¹¹.

Otras moléculas que aumentan su expresión con la estimulación de L_B vía CD40 son las moléculas del MHC II. Este efecto ha sido reproducido en modelos murinos utilizando L_B de bazo estimulados con anticuerpos anti-CD40 y la proteína de fusión CD40L-CD8^{69,70}, la principal diferencia en estos sistemas es el tiempo en el cual se observa el efecto. La estimulación de L_B con anticuerpos anti-CD40 aumenta la expresión de las moléculas del MHC II a las 20 horas⁶⁹, mientras que el estímulo con la quimera CD40L-CD8 el efecto se observa hasta las 48 horas⁷⁰. Es importante mencionar que no todos los anticuerpos anti-CD40 inducen un aumento en la expresión de las moléculas del MHC II, esto depende del epítipo que reconoce así como su afinidad por la molécula⁷⁰.

Por otro lado, en L_B humanos de sangre periférica, un anticuerpo anti-CD40 unido al receptor de Fc transfectado en fibroblastos no aumenta la expresión de las moléculas del MHC II¹¹.

El papel de la interacción CD40 con su ligando en la inducción de moléculas coestimuladoras ha sido estudiado en varios sistemas utilizando L_B humanos (sangre periférica) y murinos (bazo). En estos sistemas el estímulo de CD40 fue originado mediante anticuerpos anti-CD40 unidos al receptor de Fc en fibroblastos transfectados o con construcciones de CD40L-CD8. En ambos casos, el estímulo de CD40 es capaz de inducir la expresión de B7^{11,66}. La expresión de B7 en L_B humanos se aumenta a las 20 horas post-activación⁷¹.

Procesamiento y presentación de antígenos

Como previamente hemos mencionado, los L_T reconocen antígenos (endógenos o exógenos) en forma de péptidos asociados a las moléculas del MHC, para lo cual es necesario el procesamiento del antígeno y la unión de los péptidos a las moléculas del MHC.

Los antígenos pueden ser exógenos o endógenos. El procesamiento de los primeros ocurre en compartimentos ácidos de la vía endocítica. Los endógenos, dependiendo de su localización intracelular pueden ser procesados en diferentes sitios. El mejor caracterizado es el que opera para la presentación de antígenos por las moléculas del MHC I, que es en el citosol⁷².

Los antígenos exógenos ingresan al interior de la célula por endocitosis mediada por receptores, por pinocitosis o por fagocitosis. Estas proteínas viajan en vesículas a endosomas tempranos, de ahí a los tardíos y, finalmente a los lisosomas⁷³. En estos compartimentos existen proteasas que degradan el antígeno; especialmente las cistein proteasas (catepsinas B, L, S y H).⁷⁴⁻⁷⁶

En el caso de L_B la endocitosis mediada por receptores es a través de su inmunoglobulina de superficie, mediante la cual captan con gran afinidad el antígeno para el que son específicos. De esta manera, un L_B incorpora su antígeno específico en la vía endocítica y aumenta en varios órdenes de magnitud la eficacia de presentación de antígeno, comparada con la pinocitosis⁷⁷.

Las moléculas del MHC II son glicoproteínas altamente polimórficas formadas por una cadena α y una β . Durante su biosíntesis éstas son translocadas en forma cotraduccional al interior del retículo endoplásmico (RE), donde se asocian a una tercera molécula

denominada la cadena invariante (Ii). La cadena Ii bloquea el sitio de unión de péptido de las moléculas del MHC II. Esto previene que se carguen con péptidos presentes en el retículo endoplásmico o en otros compartimentos previos a la vía endocítica. Además la cadena Ii tiene una señal transporte hacia la vía endocítica^{8,73}.

Para permitir la unión de péptidos a las moléculas del MHC II se requiere la disociación de la cadena Ii del dímero $\alpha\beta$. En este paso intervienen varias proteasas que degradan gradualmente a la cadena Ii. El último segmento de cadena Ii que permanece unido al dímero $\alpha\beta$ se denomina CLIP (péptido de la cadena Ii asociado a clase II). Este segmento ocupa el sitio de unión de péptidos a las moléculas del MHC II^{74,75}. Para la liberación del CLIP se requiere de moléculas MHC II no clásicas denominadas HLA-DM (en humanos) o H-2M (en ratones). Estas interactúan con las moléculas del MHC II favoreciendo el intercambio del CLIP por péptidos antigénicos, formando así los complejos MHC II-péptidos⁷⁸. El compartimento en donde se cree que se efectúa este intercambio se denomina *MHC* (compartimento de moléculas MHC II). Una vez formados los complejos MHC II-péptidos, viajan a la membrana celular en donde son expuestos a L_T^{CD477} .

Aunque la función de las moléculas del MHC II es presentar péptidos derivados de proteínas exógenas, la mayoría de los péptidos unidos corresponden a proteínas endógenas. Estos péptidos puede generarse en diferentes compartimentos dependiendo de su localización intracelular, aunque su unión a las moléculas del MHC II parece ocurrir solo en la vía endocítica¹⁰.

Debido que la interacción de CD40 con su ligando induce algunas de las moléculas que intervienen en la generación de la respuesta inmune (MHC II, B7, ICAM y LFA-3), algunos investigadores han estudiado su efecto en la presentación de antígenos^{66,67,69,70,78}

La estimulación de L_B de sangre periférica y líneas celulares con anticuerpos anti-CD40 unidos a receptores de Fc transfectados en fibroblastos incrementa su capacidad presentadora de antígenos. Este efecto es bloqueado con anticuerpos anti-B7, lo cual sugiere que la interacción de CD40 con su ligando favorece la presentación de antígenos indirectamente a través de la inducción de B7¹¹.

Otro estudio con un modelo de presentación de antígeno utilizando hibridomas de L_T específicos para el péptido 81-103 del citocromo c de paloma y L_B de bazo indican que la estimulación de L_B con CD40L o anticuerpos anti-CD40 aumentan la capacidad presentadora de antígenos de estas células. En este estudio el efecto observado fue independiente de moléculas coestimuladoras y de adhesión. Por lo que se concluyó que fue debido a un aumento en el procesamiento del Ag¹². Estos estudios sugieren que la estimulación de L_B vía CD40 es capaz de mejorar su función como CPA, aunque se desconoce su mecanismo de acción.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando que el estímulo de L_B a través de CD40 aumenta la expresión de moléculas estrechamente vinculadas con la presentación de antígenos como son las moléculas de adhesión, las moléculas del MHC II y las moléculas coestimuladoras, y siendo la presentación de antígenos un evento temprano y crucial en la respuesta inmune consideramos de importancia determinar el mecanismo molecular por el cual la estimulación a través de CD40 la optimiza.

Este trabajo de tesis tiene como propósito establecer un modelo que permita estudiar el efecto de la estimulación de L_B a través de CD40 en su función como célula presentadora de antígenos por moléculas del MHC II.

HIPOTESIS

- La estimulación de L_B a través de CD40 favorece el procesamiento de antígenos endógenos y exógenos para su presentación por las moléculas del MHC II.

OBJETIVO

- Determinar el efecto de la estimulación de L_B vía CD40 en la presentación de antígenos exógenos por las moléculas del MHC II.
- Determinar el efecto de la estimulación de L_B vía CD40 en la presentación de antígenos endógenos por las moléculas del MHC II.

MODELO EXPERIMENTAL

El antígeno utilizado para este estudio fue la lisozima de gallina (LG) debido a sus características inmunogénicas en ratones H-2^k y a su bien caracterizado comportamiento inmunológico. Los estudios que se realizaron fueron ensayos de presentación de antígeno. Estos consisten en poner juntos las células presentadoras de antígeno (CPA) con hibridomas de L_T en presencia del antígeno durante 24 horas. Durante este periodo los L_B (CPA) presentan el antígeno a los hibridomas de L_T los cuales liberan IL-2 en respuesta al reconocimiento de los complejos péptido-MHC II. La producción de IL-2 es valorada mediante la actividad metabólica de células dependientes de ésta (CTLL-2).

Como CPA se utilizó el hibridoma de L_B LK-35.2 sin transfectar y trasfectado con el gen que codifica para lisozima de gallina con señal de retención en retículo endoplásmico (LG-KDEL), al hibridoma resultante se le denominó LK-LG-KDEL. Estos L_B son capaces de presentar péptidos derivados del procesamiento de LG endógena o exógena, permitiendo el análisis de dos formas diferentes de una proteína.

Como hibridomas de L_T se utilizaron las líneas E907 y C10, los cuales reconocen diferentes secuencias de la LG, Δ1-80 y 46-61 respectivamente. Estos hibridomas se seleccionaron en función a su sensibilidad siendo E907 el menos sensible de los dos.

Como estímulo de CD40 se utilizaron fibroblastos (L929) transfectados con CD40L murino (L929-GP39) o anticuerpos monoclonales anti-CD40 murino (IC10).

A la par a los ensayos de presentación de antígeno se evaluó la expresión de las moléculas del MHC II en los L_B estimulados a través de CD40 mediante citometría de flujo.

MATERIAL Y METODOS

* *Reactivos y Anticuerpos*

La LG utilizada fue obtenida de Sigma Chemical, el medio de cultivo fue RPMI-1640 (GIBCO) suplementado con piruvato de sodio, glutamina, 2-mercaptoetanol, aminoácidos esenciales, suero fetal bovino, gentamicina, anfotericina y ciproxina.

Los anticuerpos monoclonales IC10 (IgG_{2a} anti-CD40 murino)⁷⁰, In-1 (IgG_{2b} anti Ii)⁸², H116-32 (IgG_{2b} anti H-2A α^k)⁸³, fueron obtenidos de los hibridomas del mismo nombre.

Los anticuerpos monoclonales anti-B7.1-ficoeritrina (PE), anti B7.2-PE, anti-CD23-PercP, anti-TCR-PE fueron cortesía de Pharmingen. El anticuerpo anti-CD40L murino (MR-1) fueron cortesía del Dr. Randolph Noelle.

Los anticuerpos monoclonales anti-Ig murino marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o con PE, estreptavidina-FITC y anti-Ig rata-FITC fueron comprados a Boehringer Mannheim.

La proteína de fusión CD40-Fc $\gamma 1$ humano fue cortesía del Dr. David Gray y el péptido 48-62 de la LG cortesía del Dr. Dario Vignali.

El bromuro de 3-(4,5 dimetil tiazol-2 il)-2,5 defeniltetrazolio (MTT), la ionomicina y ester de forbol (PMA) fueron comprados a Sigma y la ³H-timidina a Amhersham.

Las inmunofluorescencias fueron analizadas en un citómetro de flujo (FACs SORT) de Becton Dickinson.

*** Líneas celulares**

Como CPA se utilizaron los hibridomas murinos LK-35.2 y LK-LG-KDEL (H-2^{k/d})^{78,79}. El primero es derivado de la fusión somática de una sublínea de A20 (derivada de ratones Balb/c, H-2^d) con esplenocitos de ratones B10.BR (H-2^k). LK-LG-KDEL se originó a partir de la transfección de LK-35.2 con el plásmido que contiene el cDNA de LG que en su extremo 5' (carboxilo terminal) tiene los nucleótidos que codifican para el tetrapéptido KDEL (lys-asp-glu-leu) que es una señal de retención en el retículo endoplásmico.

Como hibridoma de T se utilizaron las líneas C10⁸⁰ y E907⁸¹, que reconocen un epítipo dentro de las secuencias de LG 46-61 y Δ 1-80 respectivamente.

La línea celular L929, fibroblasto de ratón C3H/An fue transfectada con el cDNA pME18S que lleva consigo el inserto con los pares de bases del 1-13410 del gen que codifica el ligando de CD40 (línea L929-GP39), a la par se transfectó con el vector vacío (línea L929-V).

Las células dependientes de IL-2 fueron las CTLL-2, las cuales son L_T citotóxicos. Todas estas líneas se mantuvieron en cultivo en RPMI suplementado a 37 ° C en atmósfera de 5% CO₂ y 90 % de humedad en botellas de cultivo de 200, 125 y 75 cm².

***Purificación de anticuerpos**

Los anticuerpos anti-CD40, anti-Ii y anti-MHC II fueron purificados en sepharosa proteína G y proteína A. Una vez purificados fueron dializados contra solución salina de

fosfatos y esterilizados mediante radiación (10,000 Rads). Su concentración se determinó por espectrofotometría a 280 nm y su funcionalidad mediante citometría de flujo .

**** Inmunofluorescencia***

Para el análisis de las diferentes moléculas de superficie, se incubaron a 4°C 1×10^6 células con 100 μ L de una solución de inmunoglobulinas humanas (15mg/mL) durante 30 minutos. Se centrifugó a 2000 rpm y el botón se resuspendió en 100 μ L de PBS-SFB1%-0.05% de azida de sodio (solución de lavado) con 10 μ g del anticuerpo dirigido contra la molécula de interés, se incubó 30 minutos a 4°C, se lavó el botón celular con 400 μ L de la solución de lavado y esto se repitió 3 veces. En el caso de una tinción directa el primer anticuerpo fue marcado con un fluorocromo (FITC o PE) en una tinción indirecta el botón celular se resuspendió en el segundo reactivo marcado con el fluorocromo (anti-Ig ratón-FITC, anti-Ig rata-FITC o estreptavidina-FITC), se incubó durante 30 minutos a 4°C y posteriormente se realizaron los lavados como previamente se mencionó.

Una vez terminada la tinción el botón celular se resuspendió en una solución de PBS-yoduro de propidío y se analizaron las muestras en un citómetro de flujo.

**** Activación de los L_T***

Los L_T fueron activados con ionomicina y ester de forbol (PMA). Se cultivaron 250 000 células/mL en presencia de ionomicina (0.5 μ g/mL) y PMA (5ng/mL). Después de 6 y 24 horas de cultivo, se desprendieron las células con solución salina de fosfatos (PBS) de la placa de cultivo y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se

realizó una inmunofluorescencia indirecta para evaluar la expresión de CD40L en superficie. La tinción se reveló con anti-Ig ratón-FITC. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo Facsort (Becton-Dickinson).

**** Determinación de moléculas MHC II en L_B estimulados vía CD40***

Los L_B fueron estimulados en presencia del CD40L o de anticuerpos anti-CD40. En la estimulación con CD40L se utilizaron los fibroblastos L929-Gp39. Se realizó un cocultivo de CPA (125,000 células /mL) con L929-Gp39 (80,000) durante 24, 48 o 72 horas a 37° C . Transcurrido este tiempo se desprendieron las células con PBS y se analizaron por citometría de flujo. Los anticuerpos utilizados fueron anti-MHC II-biotinilados y como revelador estreptavidina-FITC. Para la estimulación con anticuerpos anti-CD40. Se cultivaron 250,000 células/mL en presencia de 10µg/mL de anti-CD40 o anti-Ii como anticuerpo irrelevante en las mismas condiciones. Transcurrido este período se determinó la expresión de las moléculas MHC II en la superficie de las células por inmunofluorescencia directa con anticuerpos anti MHC-II marcados con FITC.

****Ensayo de presentación de Antígeno***

Estos ensayos consistieron en poner en contacto la CPA con los diferentes hibridomas de L_T en placas de 96 pozos. Para esto se cosecharon las CPA y los hibridomas de L_T. El botón celular se resuspendió en RPMI-1640 suplementado y se contaron las células en una cámara de Neubauer.

Para poder contar exclusivamente las células vivas se utilizó el colorante azul de tripano el cual tiñe las células muertas (dilución 1:10). Se colocaron las CPA (número variable) y 50,000 hibridomas de L_T por pozo (la mezcla quedo en un volúmen final de 200µL) y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Cuando la CPA fue LK-35.2 se añadieron 20 µL de LG (100x) a una concentración 10 veces mayor que la desada.

Para evaluar el efecto de la estimulación via CD40 en estos ensayos, se cocultivaron 3000 células L929-Gp39 o L929-V con la mezcla de CPA e hibridomas de T, manteniendo el volúmen final de 200 µL pozo. Cuando el estímulo fue mediante anticuerpo se añadieron estos a una concentración de 10 µg/mL.

****Determinación de la producción de IL-2***

La eficacia de la presentación de antígeno se evaluó por medio de la cuantificación de IL-2, ésta es liberada por el L_T al activarse por la interacción de su TCR con las moléculas del MHC II con el péptido unido.

Para medir la cantidad de IL-2 secretada se utilizan las células dependientes de la misma CTLL-2, por lo tanto su actividad metabólica será proporcional a la cantidad de IL-2 y esta a su vez será proporcional al grado de activación del L_T durante el ensayo de presentación de antígeno. La actividad metabólica de las células CTLL2 se evaluó de dos formas alternas: incorporación de ³H-timidina o reducción del MTT (ambos métodos comparables entre sí)⁴³.

a) Incorporación de timidina

Para realizar esta técnica se recolectaron 100 μ L del sobrenadante de las placas de cultivo en donde se realizó el ensayo de presentación de antígeno.

Las CTLL-2 se cosecharon, se resuspendieron en PBS y se lavaron tres veces con la misma solución. Después del último lavado se resuspendieron en RPMI-1640 suplementado y se contaron las células en la cámara de Neubauer utilizando azul tripano. Después de esto se colocaron 10,000 células por cada 100 μ L de sobrenadante ajustando el volúmen final a 200 μ L, los cuales se incubaron 20 h a 37 °C. Después de esto se añadieron 20 μ L de 3 H-timidina (1 μ Ci) y se incubó 10 horas bajo las mismas condiciones.

Posteriormente se midieron las cuentas por minuto (c.p.m) en un contador de centelleo. Los resultados se expresaron como índices de activación (I.A) en que:

$$I.A = \frac{\text{c.p.m muestra} - \text{c.p.m del control de reactivo}}{\text{c.p.m del control de células}}$$

b) Reducción de MTT

Este método se basa en una reacción de oxido-reducción. El MTT (bromuro de 3-(4,5 dimetil tiazol-2 il)-2,5 defeniltetrazolio es un compuesto cuya estructura forma un anillo. Cuando este anillo se rompe forma un compuesto colorido denominado formazán. El MTT se utiliza para medir la actividad de la enzima succinato-deshidrogenasa, la cual rompe el anillo dando origen al formazán, cristales azules, los cuales al disolverse tiene un pico de absorción a 570nm. La cantidad de formazán generado es proporcional a la actividad metabólica de las células presentes. De este modo se puede medir la actividad metabólica

mediante un método colorimétrico; sólo las células cultivadas en presencia de IL-2 permanecerán vivas y, por lo tanto, tendrán actividad metabólica..

Para desarrollar este método se recolectaron 50 μ L del sobrenadante en donde se realizó el ensayo de presentación de antígeno. A este sobrenadante se le añadieron 20,000 células CTLL-2 (previamente lavadas y contadas) en un volumen de 50 μ L, siendo el volumen final de 100 μ L. Posteriormente se incubó la placa 24 h a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo se añadieron 20 μ L de una solución de MTT (5mg/mL) y se incubó 5 horas bajo las mismas condiciones. Para detener la reacción se añadieron 100 μ L de una solución de SDS 10% con HCl 0.01N. Se dejó reposar toda la noche y se midió la absorbancia (Abs.) a 570 nm. Los resultados se expresaron en índices de activación (I. A)

RESULTADOS

Caracterización del fenotipo de las líneas celulares

A) CPA (L_B)

Debido a que las CPA son parte importante de nuestro modelo fue indispensable caracterizar algunas de sus moléculas en su superficie, en especial CD40 y otras moléculas que fueran desreguladas al estimular a través de CD40 o que estuvieran involucradas con la presentación de antígenos.

Las moléculas que seleccionamos por su importancia en la presentación de antígenos fueron CD40, MHC II IA^k, CD23, B7.1 y B7.2 .

Para evaluar la expresión de estas moléculas en la superficie de L_B se realizaron inmunofluorescencias directas (MHCII-FITC, B7.1-PE, B7.2-PE y CD23-Percp) e indirectas (anti-CD40 revelado con anti-Ig rata-FITC) y se analizaron las muestras por citometría de flujo (Figura 1).

El análisis reveló la presencia de estas moléculas en la superficie de L_B, indicando que éstas expresan en forma constitutiva las moléculas coestimuladoras B7.1 y B7.2 , CD23, MHC II IA^k y CD40. La expresión constitutiva de B7.1 y B7.2 indica que los L_B tienen marcadores de activación, además la expresión de CD40 hace a estas células susceptibles al estímulo vía esta molécula.

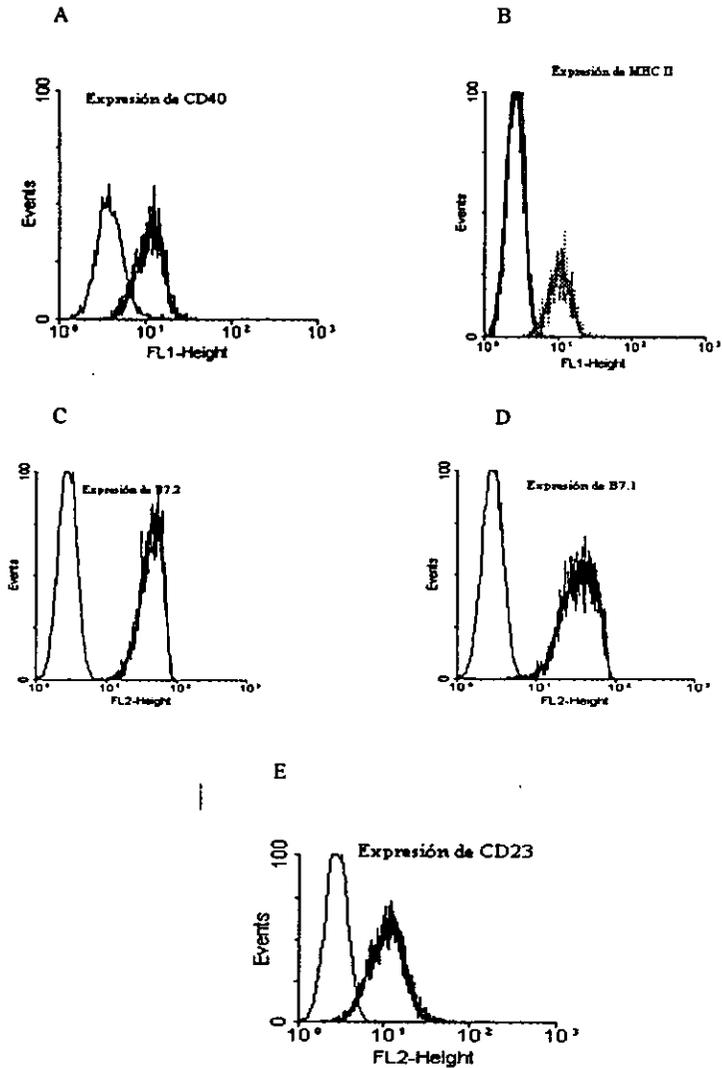


Figura 1 Expresión de MHC II, CD40, B7.1, B7.2 y CD23 en CPA. Se analizó la expresión de A) CD40, B) moléculas MHC II, C) B7.2, D) B7.1 y E) CD23 en CPAs en reposo. Sólo en el caso de la expresión de CD40 se reveló la tinción con anticuerpos anti-rata-FITC, las otras tinciones fueron directas. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo. I: irrelevante E: expresión de la molécula de interés

B) Hibridomas de T

En estas células resultó de interés analizar la expresión de las moléculas que estuvieran relacionadas con la interacción con el MHC II-péptido así como la expresión de CD40L. Así, las moléculas analizadas fueron CD4, CD40, TCR y CD40L. Para el análisis se cosecharon 1×10^6 células que fueron teñidas con anticuerpos anti-TCR-FITC, anti-CD4 - FITC y anti CD40L. Este último fue revelado con anti-Ig ratón-FITC. Las muestras se resuspendieron en PBS-yoduro de propidio y se analizaron en el citómetro de flujo (figura 2).

Los resultados muestran la expresión espontánea de CD4, TCR pero no así de CD40 y su ligando. Como esta última molécula se expresa en L_T activados se decidió determinar su expresión bajo condiciones de activación. La activación se realizó con ionomicina y ester de forbol (PMA). Para esto se cultivaron 250,000 células y se activaron con $0.5 \mu\text{g/ml}$ de ionomicina + 5 ng/mL de PMA y se determinó la presencia de CD40L a las 6 y 24 h de estimulación (figura 2). El resultado muestra que bajo estas condiciones el CD40L se detecta hasta 24 horas después del estímulo. Por lo tanto, los hibridomas aquí utilizados no expresan CD40L en condiciones basales, pero son capaces de hacerlo al ser activados.

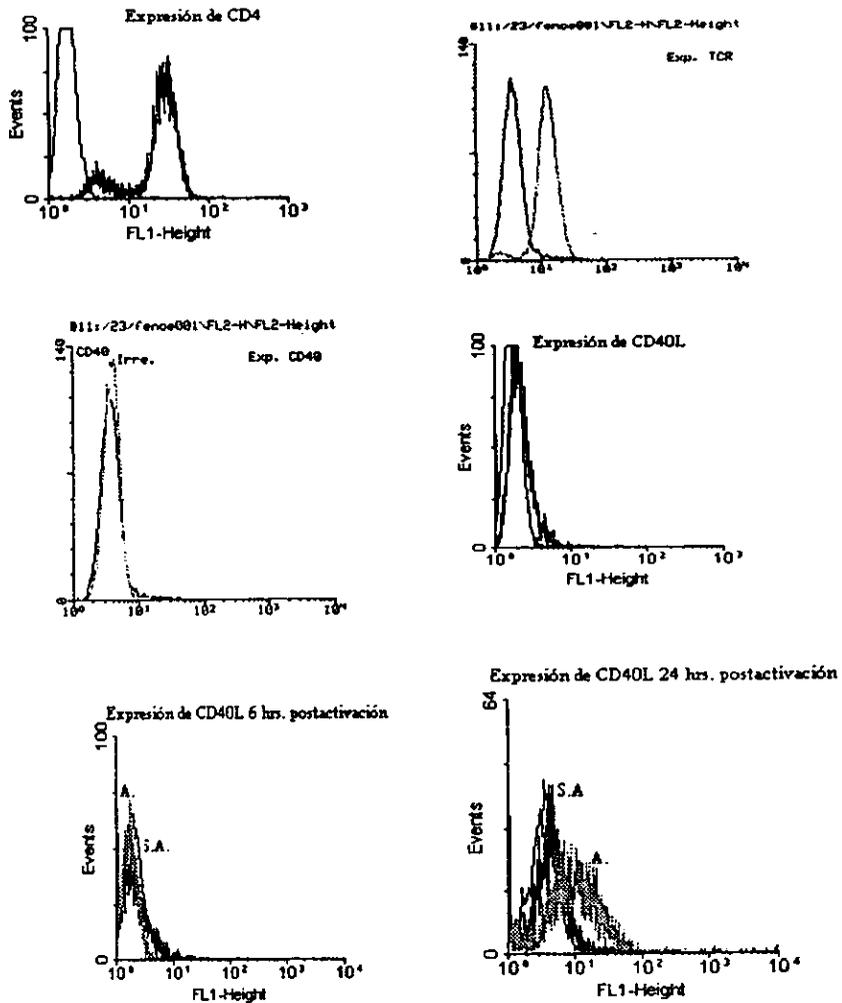


Figura 2 Expresión de CD4, TCR, CD40L en hibridomas de T (E907). Expresión de CD4, TCR, CD40, CD40L sin estímulo, expresión de CD40L en L_T activados a las 6 y 24 horas post-activación. La activación se realizó con 0.5µg/mL de ionomicina+ 5 ng PMA, las tinciones se realizaron en el tiempo indicado. A: L_T activados con ionomicina-PMA, S.A: L_T sin activar

Estimulación de L_B con CD40L

Expresión de CD40L en L929- Gp39

La línea celular L929-Gp39 fue subclonada para asegurar una expresión uniforme de la molécula. La expresión de CD40L fue determinada mediante inmunofluorescencia indirecta revelada con anti-Ig ratón-FITC y analizada por citometría de flujo.

En la figura 3 se observa la expresión de CD40L en una clona L929-Gp39 que fue utilizada en este estudio .

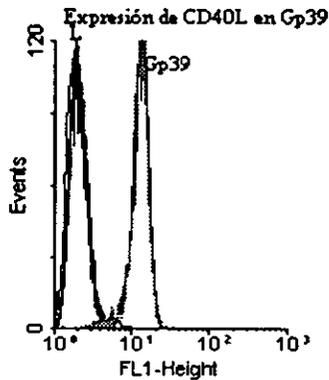


Figura 3 Expresión de CD40L en L909-Gp39 y L909-V . Se cosecharon 1×10^6 células las cuales se incubaron 30 minutos en hielo con una solución de inmunoglobulinas humanas. Posteriormente se incubó con anti-CD40L murino y se reveló con anti -Ig ratón-FITC. L : L929 transfectada con el vector vacío, Gp39 :L929 transfectado el CD40L murino.

La estimulación de los L_B con CD40L aumenta su capacidad presentadora de antígenos endógenos y exógenos por moléculas del MHC II

Debido a que en nuestro ensayo la molécula CD40 se expresa únicamente y en forma constitutiva en L_B y que su ligando solo se expresa en los hibridomas de L_T activados es posible estimular L_B vía CD40 en un ensayo de presentación de antígeno y determinar su efecto en éste.

Para evaluar el efecto de la interacción de CD40 con su ligando en la capacidad presentadora de antígenos de L_B se efectuaron ensayos de presentación de antígenos en presencia de L929-Gp39 y L929-V. Estos ensayos se realizaron variando el número de L_B desde 0 hasta 100,000. El número de hibridomas de L_T y fibroblastos (L929-Gp39 y L929-V) se mantuvo constante a 50,000 y 3000 cels/pozo respectivamente, cifras que se habían determinado previamente como óptimas. La concentración de LG exógena fue de 3µg/mL para el hibridoma en estudio que es una concentración subóptima..

El ensayo de presentación de antígenos se realizó como se describe en materiales y métodos. La técnica utilizada para revelar la actividad metabólica de las CTLL-2 fue el de reducción de MTT.

Los resultados obtenidos (figuras 4 y 5) indican que la interacción de CD40 con su ligando aumenta la presentación de LG endógena y exógena. Es interesante mencionar que existe una mayor influencia de L929-Gp39 en la presentación de la LG endógena (figura 5) que en la forma exógena (figura 4).

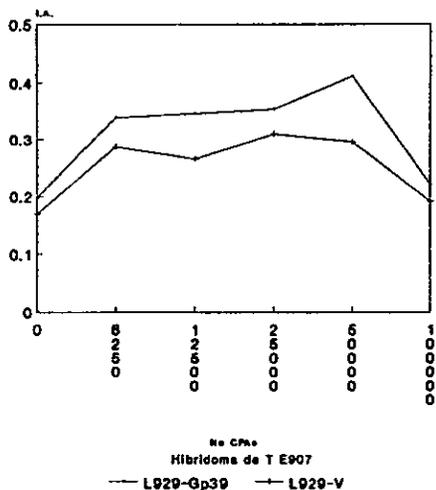


Figura 4 Efecto de la interacción de CD40 con su ligando en la presentación de LG exógena. Se realizó un E.P.A. con un número variable de LK-35.2 y un número constante de E907 y fibroblastos (L929-Gp39 y L929-V); 50,000 y 3000 respectivamente. La concentración de LG fue de 3µg/mL. Se incubó 24 horas y posteriormente se recolectaron los sobrenadantes. La actividad metabólica de las CTLL-2 se analizó por reducción de MTT. La absorbancia se determinó a 570 nm. I.A. Índice de activación, Abs mínima 0.126, Abs máxima 0.17. Abs de reactivos 0.10.

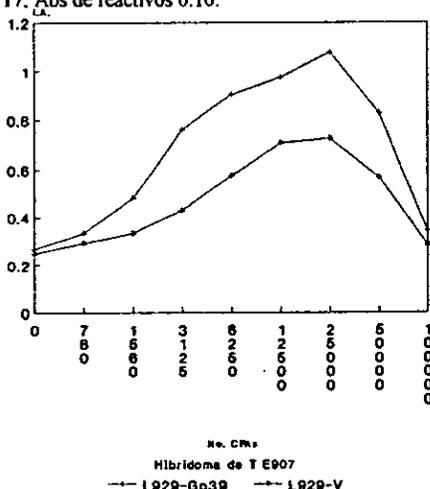


Figura 5 Efecto de la interacción de CD40 con su ligando en la presentación de LG endógena. Se realizó un E.P.A. con un número variable de LK-LG-KDEL y un número constante de E907 y fibroblastos (L929-Gp39 y L929-V); 50,000 y 3000 respectivamente. Se incubó 24 horas y posteriormente se recolectaron los sobrenadantes. La actividad metabólica de las CTLL-2 se analizó por reducción de MTT. La absorbancia se determinó a 570 nm. I.A. Índice de activación, Abs mínima 0.130, Abs máxima 0.3, Abs de reactivos 0.10.

Las células transfectadas con CD40L no aumentan la expresión de moléculas del MHC II

Como previamente se mencionó en los antecedentes, uno de los efectos de la estimulación del L_B vía CD40 es un aumento en la expresión de las moléculas del MHC II. Siendo estas moléculas importantes en la presentación de antígenos era necesario determinar si el aumento en la presentación de antígeno observada no era una consecuencia directa de una mayor expresión de las moléculas del MHC II en superficie. Para abordar este punto se realizó una cinética de la expresión de éstas moléculas en L_B estimulados con CD40L.

El experimento consistió en un cocultivo de 125,000 CPA + 80,000 L929-Gp39. El cultivo se mantuvo durante 24, 48 y 72 horas. Transcurrido este tiempo se determinó la expresión de las moléculas del MHC II por medio de inmunofluorescencia indirecta (revelado con estreptoavidina -FITC). Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo.

Los resultados obtenidos (figura 6) indicaron que la expresión de las moléculas MHC II en superficie no es afectada por la interacción de CD40 con CD40L expresado en L929, por lo que el aumento en la presentación de antígenos no es debida a una mayor expresión de las moléculas del MHC II.

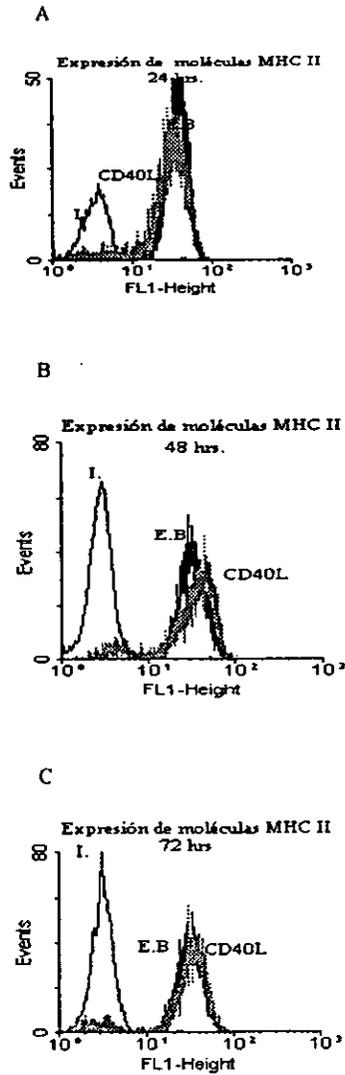


Figura 6 Expresión de moléculas MHC II en L_b estimulados con CD40L. Se cocultivaron 125,000 CPAs + 80,000 L909-CD40L durante 24 (A), 48 (B) y 72 horas (C). Posteriormente se determinó la expresión de moléculas MHC II en superficie. Se incubaron las células con anticuerpos anti MHC II-biotinilado y se reveló con estreptovidina-FITC. Las muestras se resuspendieron en PBS-yoduro de propidio y se analizaron en el citómetro de flujo. E.B: expresión basal de moléculas MHC II, CD40L: expresión de moléculas MHC II en L_b estimulados con CD40L, I: tinción con un anticuerpo irrelevante

Debido a que los fibroblastos L929-Gp39 eran altamente inestables, la expresión de CD40L variaba considerablemente lo cual hacía difícil la realización y reproducibilidad de los experimentos, por lo que se decidió continuar con los experimentos estimulando los L_B mediante anticuerpos anti-CD40 murino (IC10).

Estimulación de L_B con anticuerpo anti-CD40

La estimulación de L_B con anti-CD40 induce señales de activación

Antes de efectuar los ensayos de presentación de antígenos con L_B estimulados con anti-CD40 fue preciso determinar si esta interacción generaba alguna señal de activación. Para esto se cultivaron 250,000 cél/mL en presencia de 10µg/mL de anticuerpo anti-CD40 o anti-Ii como irrelevante. Como control de positivo se utilizó el lipopolisacárido (LPS) a una concentración de 50µg/mL. A continuación se evaluó la expresión de CD23 a 12, 24, 48 y 72 horas. La tinción fue realizada con anticuerpos anti-CD23-PE y se analizó por citometría de flujo.

Los resultados (Figura 7) muestran que la expresión de CD23 se eleva ligeramente a las 24 horas siendo más evidente a las 48 y 72 horas. Esto nos indica que el anticuerpo anti-CD40 aporta señales al L_B.

Expresión de CD23 en linfocitos B estimulados con anticuerpos anti-CD40

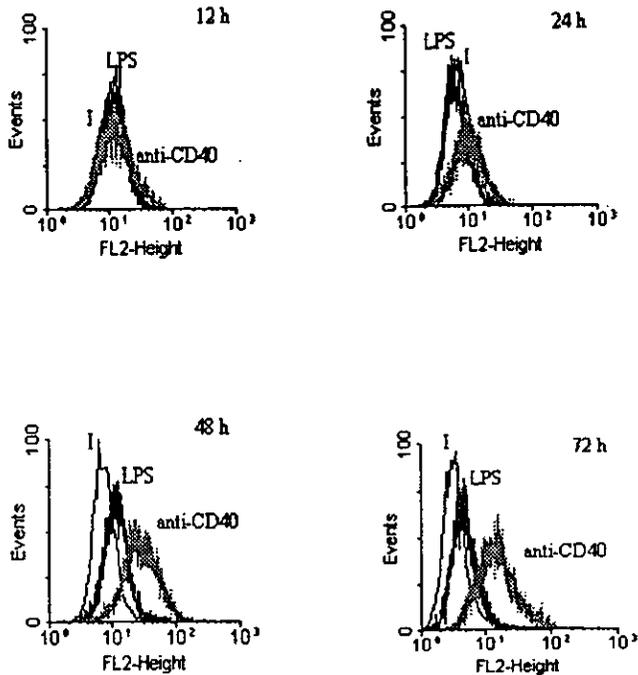


Figura 7 Expresión de CD23 en L_B activados con anti-CD40 . Se evaluó la expresión de CD23 como índice de activación en L_B estimulados con anti-CD40 o anti-Ii como control negativo (10µg/mL), como control positivo se utilizó el LPS (50 µg/mL). Las muestras fueron teñidas con anti-CD23-PE y analizadas en el citómetro de flujo. In I: L_B estimulados con anticuerpos anti-Ii como control, anti-CD40: L_B estimulados con anticuerpos anti-CD40 y LPS: L_B estimulados con LPS

La estimulación de L_B con anti-CD40 aumenta sutilmente la presentación de antígenos exógenos por moléculas MHC II

Para evaluar el efecto de la estimulación de L_B con anticuerpos anti-CD40 en la presentación de antígenos se realizaron ensayos de presentación de antígeno con 25,000 CPA (LK-35.2), 50,000 hibridomas de L_T (C10 o E907) y 10µg/mL de anti-CD40 o anti-li como irrelevante. La concentración de LG fue variable. La actividad metabólica de las CTLL-2 fue revelada mediante la reducción de MTT (C10) o incorporación de ³H-timidina (E907).

Los resultados obtenidos para el hibridoma C10 (figura 8) muestran que el estímulo con el anticuerpo anti-CD40 mejora ligeramente la eficiencia de presentación de antígeno a una concentración de 0.3 µg/mL de LG, la cual es la concentración mínima de LG a la que responde el hibridoma. A concentraciones mayores de ésta no se observa efecto.

Con el hibridoma E907 (figura 9) el efecto se observa a 10 µg/ml la cual coincide con la mínima concentración de antígeno a la que responde el hibridoma, por arriba de esta concentración no se observa efecto alguno.

Estos resultados indican que el estímulo con anti-CD40 aumenta la presentación de LG exógena pero solo a bajas dosis de antígeno. Es decir, en condiciones subóptimas.

Aumento en la presentación de LG
exogena por el estímulo con anti-CD40

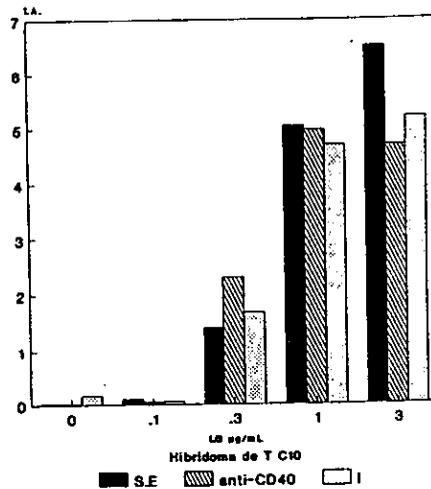


Figura 8 Aumento sutil en la presentación de antígenos exógenos por la estimulación de L_B con anticuerpos anti-CD40. Se realizó el E.P.A con 25000 células LK-35.2 + 50,000 hibridomas de T C10. La concentración de LG varió entre 0-10 $\mu\text{g/mL}$. Se estimulo con anticuerpos anti-CD40 (10 $\mu\text{g/mL}$) e irrelevante (I) (10 $\mu\text{g/mL}$). El ensayo fue revelado por reducción del MTT. La absorbancia (Abs.) se midieron a 570 nm. Abs.mínima 0.104, Abs. máxima 0.804, Abs. C. reactivos .103, Abs C.Cel. 0.139

Aumento en la presentación de LG
exogena por el estímulo con anti-CD40

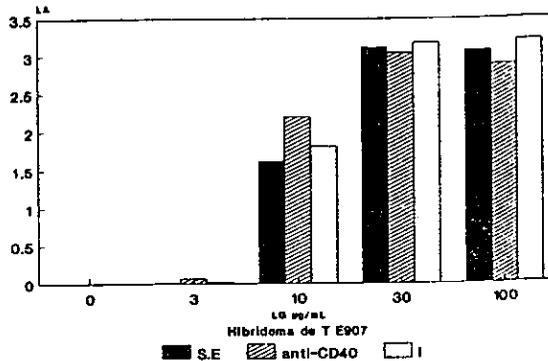


Figura 9 Aumento sutil en la presentación de antígenos exógenos por la estimulación de L_B con anticuerpos anti-CD40. Se realizó el E.P.A con 25000 células LK-35.2 + 50,000 hibridomas de T E907. La concentración de LG varió entre 0-100 $\mu\text{g/mL}$. Se estimulo con anticuerpos anti-CD40 (10 $\mu\text{g/mL}$) y con un anticuerpo irrelevante (I) (10 $\mu\text{g/mL}$). El ensayo se reveló por incorporación de ^3H -timidina. I.A Índice de activación.. c.p.m. del C.reactivos =140, c.p.m C.células = 225, c.p.m. max.= 72218, c.p.m. min.= 430

Aumento sutil en la presentación del péptido 48-62 de LG por el estímulo con anticuerpos anti-CD40.

Una vez determinada que la estimulación de L_B con anticuerpos anti-CD40 mejora la capacidad presentadora de ésta, se decidió determinar si esto era consecuencia del procesamiento del antígeno.

Para determinar este punto se realizó ensayos de presentación de antígeno con LK-35.2, C10, anticuerpos anti-CD40 e irrelevante (10µg/mL) variando la concentración del péptido 48-62 de LG el cual no requiere procesamiento para su presentación. El experimento se evaluó mediante incorporación de ³H-timidina.

Los resultados se muestran en la figura 10. En ésta se aprecia que el anticuerpo anti-CD40 mejora ligeramente la presentación del péptido a una concentración 0.1µM mientras que a concentraciones mayores no se observa ningún efecto lo que rectifica que el efecto sólo se presenta a bajas dosis de antígeno. Esto nos sugiere que la mejora en la presentación de LG exógena no es debida a un aumento en el procesamiento del antígeno.

Efecto del estímulo con anti-CD40 en la presentación del péptido 48-62 de la LG

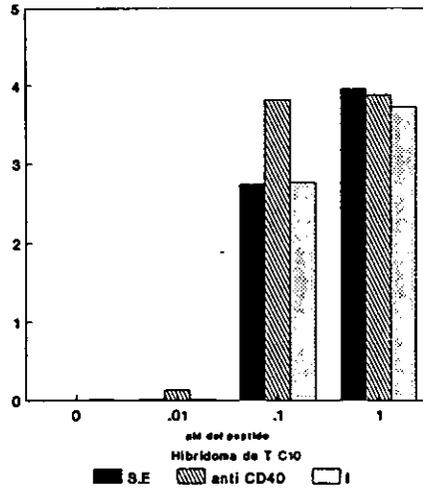


Figura 10 Aumento en la presentación del péptido 48-62 de LG por el estímulo de CD40. Se realizó un E.P.A con LK-35.2 (25,000 cel/mL), C10 (50,000 cel/mL) y anticuerpos anti-CD40 y anticuerpos irrelevante (I) (10µg/mL). La concentración del péptido de LG fue variable. El ensayo fue revelado por incorporación de ³H-timidina. S.E sin estímulo. c.p.m. C.reactivos= 140, c.p.m C. células= 280, c.p.m max=111009, c.p.m min.= 379.

La estimulación de L_B con anti-CD40 aumenta la presentación de antígenos endógenos por moléculas MHC II

Aunque la función de las moléculas del MHC II es presentar péptidos derivados de proteínas exógenas, la mayoría de los péptidos unidos corresponden a proteínas endógenas, además en estudios previos se han demostrado que existen diferencias en el procesamiento de formas endógenas y exógenas de un mismo antígeno. Debido a esto se decidió evaluar el efecto de la estimulación de L_B a través de CD40 en la presentación de antígenos endógenos. Para esto se realizaron ensayos de presentación de antígeno con número variable de LK-LG-KDEL, 50,000 hibridomas de L_T (E907 y C10). La concentración de los

anticuerpos (anti-CD40 o anti-Ii) fue de 10µg/mL. Los experimentos fueron revelados por reducción del MTT.

Los resultados para el hibridoma C10 (Figura 11) muestran que la estimulación vía CD40 permite detectar una respuesta con sólo 97 L_B mientras aumenta la presentación a partir de 195 hasta 3120 L_B. Después de este rango no se aprecia efecto alguno de la estimulación con anti-CD40.

Por otro lado, para E907 (figura 12) no se detecta una respuesta en condiciones basales, mientras que el estímulo con anti-CD40 se detecta una respuesta en los L_T.

Estos resultados sugieren que para la presentación de LG endógena el estímulo de los L_B vía CD40 permite la detección de una respuesta previamente no observable y magnificar otra ya presente en condiciones subóptimas de L_B. En condiciones óptimas de L_B el estímulo no induce efectos observables. Esto es similar a lo observado para LG exógena pero el efecto es considerablemente mayor. Por lo tanto los resultados sugieren que para la LG endógena, el estímulo con anti-CD40 favorece la presentación de antígenos por mecanismos adicionales a los que ocurren con LG exógena. El resultado obtenido con E907 indica que aún en el caso que la concentración inicial de los complejos MHC II-péptidos es indetectable por el método utilizado, se obtiene una respuesta cuantificable al estimular a través de CD40.

Aumento en la presentación de LG endógena por el estímulo de CD40

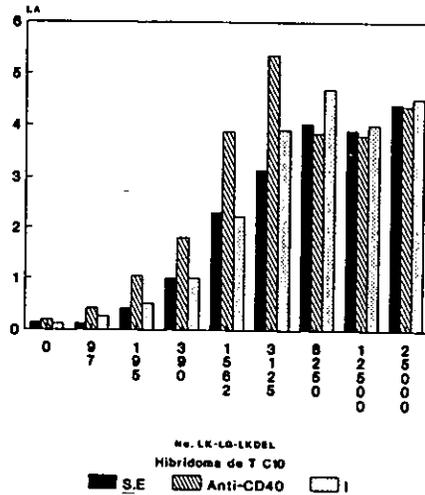


Figura 11 Aumento en la presentación de LG endógena por el estímulo con anticuerpos anti-CD40. El E.P.A se realizó con un número variable de LK-LG-KDEL y 50,000 C10, La concentración de los anticuerpos fue de 10µg/mL. El experimento fue revelado por reducción del MTT. S.E: sin estímulo. Absorbancias (Abs.) a 570 nm; Abs.min. 0.125, Abs. max. 0.847, Abs.C.reactivos 0.106, Abs.C.células 0.130

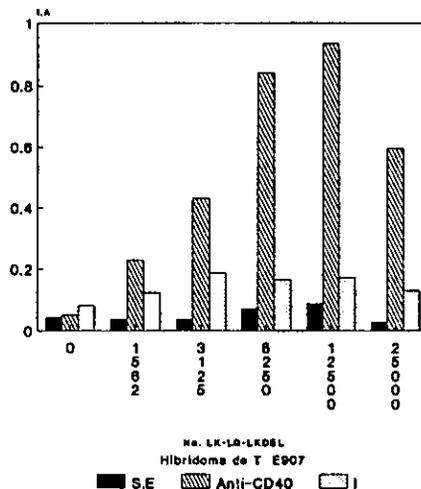


Figura 12 Aumento en la presentación de LG endógena con anticuerpos anti-CD40. El E.P.A se realizó con un número variable de LK-LG-LDEL y 50,000 E907. La concentración de los anticuerpos fue de 10µg/mL. El experimento fue revelado por reducción del MTT. S.E :sin estímulo. Absorbancias (Abs.) a 570 nm; Abs.min. 0.113, Abs. max. 0.3, Abs.C.reactivos 0.106, Abs.C.células 0.130

La proteína CD40-Fc bloquea el efecto inducido por anticuerpos anti-CD40 en la presentación de LG endógena.

Para corroborar que el aumento en la presentación de LG fuera atribuida a la activación de L_B con anticuerpos anti-CD40 se bloqueo esta interacción mediante la proteína de fusión CD40-Fc, la cual se une a los anticuerpos anti-CD40 y, por lo tanto, bloquea sus efectos.

Para esto se realizó un ensayo de competencia en donde se mantuvo constante la concentración del anticuerpo y la proteína de fusión ($10\mu\text{g/mL}$), variando solo el número de L_B (LK-LG-KDEL), el hibridoma de L_T utilizado fue E907.

Los resultados indican (figura 13) que a la menor cantidad de L_B el bloqueo es total, efecto que se va haciendo parcial a medida que se aumenta el número de éstas.

Esto confirma que efectivamente el efecto en la presentación de antígenos es mediado por la estimulación vía CD40.

Bloqueo del efecto de la estimulación de CD40 por CD40-Fc

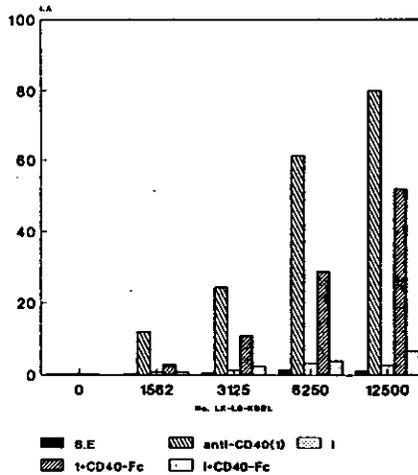


Figura 13 Bloqueo del efecto del anticuerpo anti-CD40 por CD40-Fc. E.P.A, LK-LG-KDEL (número variable), E907 (50,000 cel/pozo). Concentración de los a anticuerpos (anti-CD40 o irrelevante anti-Ii) y la proteína de fusión CD40-Fc 10µg/mL. El ensayo fue revelado por incorporación de ³H-timidina. S.E sin estímulo. c.p.m C. reactivos=140, c.p.m C.células= 280, c.p.m max.= 22571, c.p.min.=247

El aumento en la presentación de LG no es debido a un aumento en la expresión de moléculas MHC II

Como previamente se mencionó, uno de los efectos al estimular L_B via CD40 es el aumento en la expresión de las moléculas MHC II. Para evaluar el papel de estas moléculas en el aumento de la capacidad presentadora de los L_B, se estimularon 250,000 L_B con anticuerpo anti-CD40 o anti-Ii (10µg/mL) y se evaluó la expresión de las moléculas del MHC II a las 12, 24, 48 y 72 horas. Como control de activación se utilizó el lipopolisacárido (LPS 50µg/mL). Para el análisis de esta molécula se realizó inmunofluorescencia directa (anticuerpos anti-MHC II-FITC), las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo a los respectivos tiempos mencionados.

Los datos obtenidos (figura 14) indican que 12 horas después del estímulo con el anticuerpo anti-CD40 no se aprecian modificaciones en la expresión de las moléculas analizadas, a las 24 horas la expresión de las moléculas del MHC II permanece sin cambio, mientras que a las 48 horas se observa un ligero desplazamiento en la expresión de las moléculas MHC II, que es más evidente a las 72 horas.

Debido a que no existe cambio en la expresión de las moléculas MHC II durante el tiempo en el que se realiza los ensayos de presentación de antígeno (24 horas) podemos deducir que el aumento en la presentación de antígenos aquí descrito no es atribuido a una mayor expresión de las moléculas del MHC II.

Expresión de las moléculas del MHC II en
linfocitos B estimulados a través de CD40

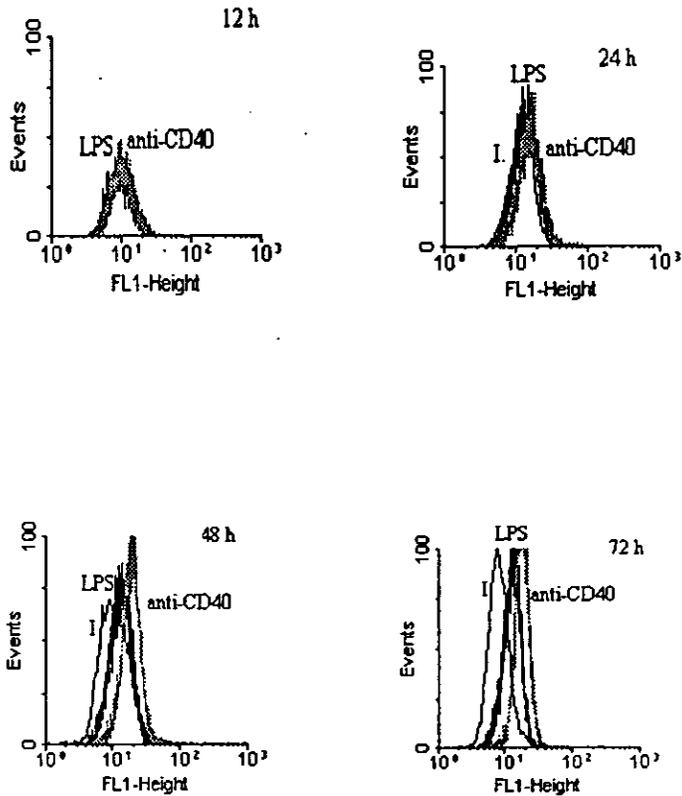


Figura 14 Expresión de MHC II CPAs activadas con anticuerpos anti-CD40 o anti Ii (10µg/mL). Se activaron 250,000 CPAs con anticuerpos (anti-CD40 o irrelevante (anti Ii)) 10µg/mL. Como control de activación se utilizó lipopolisacárido (LPS) 50µg/mL. Las tinciones se realizaron a los respectivos tiempos con anticuerpos anti-MHC II-FITC. Las muestras se analizaron por citometría de flujo. IC10 anti-CD40, In anti-Ii. LPS.

DISCUSION

Este trabajo se realizó con la finalidad de establecer un modelo que permitiera evaluar el efecto de la estimulación de linfocitos B a través de CD40 en la presentación de dos formas diferentes (endógena y exógena) de una misma proteína. Para esto se utilizó como modelo la lisozima de gallina. Como células presentadoras de antígeno se utilizaron dos líneas de linfocitos B: una transfectada con la lisozima de gallina con señal de retención en retículo (LK-LG-KDEL) y otra a la que se administró en forma exógena la proteína (LK35.2). El estudio consistió, por una parte, en ensayos de presentación de antígeno con los linfocitos B estimulados con células portadoras de CD40L o anticuerpo monoclonal anti-CD40 e hibridomas de L_T con diferente sensibilidad a la lisozima de gallina (C10 y E907). Además, se analizó la expresión de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II) en linfocitos B estimulados de la misma manera.

Los resultados obtenidos indican: 1) el estímulo de linfocitos B a través de CD40 aumenta la presentación de antígenos endógenos y exógenos, siendo más notable con los primeros, 2) El aumento en la presentación de antígenos exógenos no depende de un mejor procesamiento, 3) la estimulación de linfocitos B con anticuerpos a través de CD40 aumenta la presentación de antígenos endógenos de manera más notable sugiriendo la participación de mecanismos adicionales a los involucrados para antígenos exógenos.

Estudios realizados con linfocitos B estimulados con CD40L expresado en células de insecto (Sf9) y con diferentes concentraciones de antígeno (citocromo c) sugirieron que este estímulo era capaz de aumentar de manera importante la presentación de antígenos exógenos⁽¹²⁾. En nuestro estudio obtuvimos resultados similares. Es decir, el estímulo de

linfocitos B con CD40L mejoró la presentación de antígenos exógenos y endógenos, siendo mayor el efecto en la presentación de los últimos, lo cual podría sugerir la presencia de mecanismos de acción adicionales dependiendo de la forma del antígeno (endógeno o exógeno). El análisis de la expresión de las moléculas del MHC II en linfocitos B estimulados de la misma manera demostró que éstas no aumentan, descartando el aumento de éstas como causa principal del incremento en la presentación de antígenos originada por CD40L.

Otros estudios estimulando linfocitos B de sangre periférica con anticuerpos anti-CD40 unidos a receptores de Fc en fibroblastos transfectados con estos, sugieren que está estimulación mejora la capacidad presentadora de antígenos de los linfocitos B⁽¹¹⁾, proponiendo como principal mecanismo efector el aumento de la expresión de moléculas coestimuladoras como B7.1 y B7.2. Resultados similares se han obtenido estimulando los linfocitos B de bazo y línea celular con anticuerpos anti-CD40 en forma soluble⁽¹²⁾, sólo que en este caso el efecto fue atribuible al aumento en el procesamiento del antígeno.

En nuestro trabajo encontramos que la estimulación de linfocitos B a través de CD40 resulta en un aumento muy sutil en la presentación de antígenos exógenos, la cual sólo se aprecia a concentraciones bajas de antígeno. La participación del procesamiento en el aumento de la presentación de antígenos exógenos se evaluó en ensayos de presentación de antígeno con el péptido de lisozima de gallina 48-62, el cual no requiere ser procesado para su presentación. Los resultados obtenidos muestran un ligero aumento en la presentación del péptido 48-62 de la lisozima de gallina (a concentraciones bajas de este) en los linfocitos B estimulados a través de CD40. Este resultado sugiere muy fuertemente que el aumento en la

presentación de antígenos exógenos no es debida a un mayor procesamiento del antígeno lo que difiere con estudios anteriores.

Una explicación de las diferencias encontradas en este estudio y reportes anteriores pudiera ser la metodología. Mientras que en este trabajo el anticuerpo anti-CD40, el péptido de lisozima de gallina y el cocultivo de linfocito B- linfocito T se añadieron simultáneamente, en otros estudios se estimulo primero al linfocito B con el anticuerpo anti-CD40 durante tiempos variables, se fijaron las células con glutaraldehído y posteriormente se añadió el péptido y los linfocitos T⁽⁶⁵⁾. Podría ser que el proceso de fijación no solo detiene el procesamiento sino también afecta la eficacia de presentación del antígeno al alterar las interacciones de superficie. Además, los antígenos utilizados son diferentes por lo que sus requerimientos para ser procesados y presentados pueden variar.

El hecho de que el aumento de la presentación de antígenos exógenos solo se presente a dosis bajas de antígeno podría explicarse considerando que a esas concentraciones el número de complejos MHC II-péptido en superficie fueran insuficientes para lograr una máxima respuesta del linfocito T, bajo estas condiciones, el estímulo a través de CD40 puede mejorar la capacidad presentadora del linfocito B logrando aumentar la respuesta del linfocito T. Mientras que concentraciones altas de antígeno promueven la formación de un mayor número de complejos MHC II-péptidos alcanzando la máxima capacidad presentadora del linfocito B, por lo que el estímulo a través de CD40 ya no genera ningún cambio en el linfocito B optimizado. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que el hibridoma de linfocito T alcance su máxima capacidad de respuesta, y por lo tanto, no perciba una mayor presentación del antígeno.

El efecto de la estimulación de linfocitos B con anticuerpos anti-CD40 en la presentación de antígenos endógenos fue diferente. En estos, el estímulo a través de CD40 fue suficiente para detectar una respuesta con hibridomas de linfocitos T poco sensibles, que no respondían a la presentación de antígenos por linfocitos B sin estimular. En el caso de hibridomas muy sensibles, como C10, se observó que el efecto de la estimulación con el anticuerpo anti-CD40 se perdía cuando se aumentaba el número de células presentadoras de antígeno (linfocitos B), lo cual fue similar a lo ocurrido en la presentación de antígenos exógenos a concentraciones altas de estos.

Estudios realizados respecto a la eficiencia de presentación de péptidos endógenos o exógenos de una misma proteína han sugerido que la eficiencia de presentación y el patrón de péptidos generados dependen en gran medida de la forma de la proteína (endógena o exógena) y en particular de la localización intracelular de la misma. Estos estudios sugieren fuertemente diferentes vías de procesamiento para antígenos endógenos y exógenos de una misma proteína¹⁰.

Con base en lo anterior sugerimos que el principal mecanismo por el que se aumenta la presentación de antígenos endógenos es a través de su procesamiento. Esto se propone debido a que logramos detectar una respuesta en linfocitos T, la cual es indetectable (por estos métodos) en condiciones basales. No obstante, debemos considerar la participación de mecanismos adicionales que actúan para los antígenos exógenos, la cual es aditiva al procesamiento.

El aumento en la presentación de antígenos en linfocitos B estimulados con anticuerpos anti-CD40 puede deberse a múltiples factores que mejoran su capacidad como

célula presentadora de antígenos. Entre ellos: una mayor expresión de moléculas MHC II, moléculas coestimuladoras (B7) y de moléculas de adhesión como LFA-1, LFA-3, ICAM-1.

Para evaluar la participación de las moléculas del MHC II, se analizó la expresión de éstas en la superficie de linfocitos B estimulados con anticuerpos anti-CD40. Los resultados obtenidos indican que estas moléculas no se aumentan durante las primeras 24 horas post-estimulación (tiempo durante el que se desarrolla el ensayo de presentación de antígenos). Sin embargo, a pesar de no detectarse un aumento en la expresión de las moléculas del MHC II, no puede descartarse por completo su participación, ya que pudiera ser que el estímulo con anticuerpos anti-CD40 aumente la formación de complejos MHC II-péptido o la vida media de estos en la superficie, lo cual no se estudio en esta investigación.

Es importante mencionar que en el caso de la estimulación de linfocitos B con anticuerpos anti-CD40 se aumentó la expresión de moléculas MHC II a partir de las 48 horas post-estímulo, mientras que con CD40L no se aumentó en ningún tiempo la expresión de éstas. Esto concuerda con estudios anteriores que sugieren que el efecto de la estimulación de linfocitos B a través de CD40 depende del tipo de estímulo (anticuerpos, ligando, etc) lo cual influirá en el grado de entrecruzamiento del receptor y por consiguiente en los efectos generados.

Estudios posteriores realizados para evaluar la participación de B7 en el aumento de la presentación de antígenos en linfocitos B estimulados a través de CD40, sugieren que la expresión de las moléculas B7 no se aumentan hasta después de 24 horas de estimulación con anticuerpos anti-CD40, lo que concuerda con los resultados obtenidos en otros estudios ⁽⁶⁴⁾. Debido a que los ensayos de presentación de antígeno tienen una duración de 24 horas

no consideramos que estas moléculas intervengan de manera crucial en el efecto observado, sin embargo, no se puede descartar de manera concluyente su participación.

Es importante mencionar que los estudios en los que se ha atribuido un papel importante a B7.1 y B7.2 se han realizado con linfocitos B de sangre periférica, que no expresan en forma constitutiva B7, se pre-estimulan con anticuerpos anti-CD40 durante 48 horas y posteriormente se pusieron en contacto con los L_T. Mientras que en los experimentos realizados aquí los linfocitos B utilizados expresan en forma constitutiva B7.1 y B7.2 y la estimulación de CD40 se realizó durante las 24 horas que duro el ensayo de presentación de antígeno.

La participación de moléculas de adhesión no fue evaluada por lo que no podemos descartar su posible intervención en el aumento de la presentación de antígenos en linfocitos B estimulados con anticuerpos anti-CD40.

Estos resultados demuestran que la estimulación de linfocitos B a través de CD40 aumenta su eficiencia en la presentación de antígenos. Sin embargo, existen diferencias en el efecto de esta estimulación en la presentación de antígenos endógenos y exógenos, lo que sugiere la participación de mecanismos de acción adicionales, inherentes a la forma del antígeno endógena o exógena). Esto concuerda con estudios realizados por este grupo en donde formas diferentes de lisozima de gallina generan diferente patrón de péptidos dependiendo de su localización intracelular. Esto nos sugiere que el efecto de la estimulación de linfocitos B a través de CD40 podría depender de la localización intracelular de la proteína.

CONCLUSION

El modelo diseñado en este trabajo experimental permitió evaluar el efecto de la estimulación de linfocitos B a través de CD40 en la presentación de antígenos por moléculas MHC II. Los resultados generales señalan que esta estimulación mejora la capacidad presentadora de antígenos del linfocito B. Sin embargo, se presentaron diferencias en el efecto de la estimulación de linfocitos B a través de CD40 en la presentación de antígenos endógenos y exógenos. Por un lado se aumentó sutilmente a concentraciones bajas del antígeno, la presentación de antígenos exógenos, mientras que para antígenos endógenos se logró detectar una respuesta que en condiciones basales no se percibía, además de un aumento en una respuesta ya detectable. El efecto observado para los primeros es aparentemente independiente de su procesamiento, mientras que en ninguno de los dos casos el efecto fue atribuido a un aumento en la expresión de las moléculas del MHC II. Esto nos permite proponer que los mecanismos por los cuales la estimulación de linfocitos B a través de CD40 aumenta la presentación de antígenos pudieran ser aditivos dependiendo de la forma del antígeno (endógena o exógena).

BIBLIOGRAFIA

1. - Clark B., Foy M. y Noelle R. 1996. CD40 and its ligand. *Adv. Immunol.* 63: 43-78
2. - Janeway C., Travers P. *Immunobiology The immune system in Health and Disease.* tercera edición 1997 Gerland Publishing Inc. pp 7:1- 8:1
3. - Laman D., Claassen E., Noelle R. 1996. Functions of CD40 and its Ligand, gp39 (CD40L). *Crit. Rev. Immunol.* 16:59-108
4. -Jenkins M. K. 1994.The Ups and Downs of T Cell Costimulation *Immunity.* 1: 443-446
5. -Allison P. y Krummel F 1995. CD28 and CTLA-4 Have Opposing Effects on the Response of T cell to Stimulation. *J. Exp. Med* 182: 459-465.
6. -Cresswell P.1994 Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 259-293.
7. - Kooten Van C. and Banchereau J. CD40-CD40 Ligand: A Multifunctional Receptor-Ligand Pair. *Adv. Immunol.* 61:1-77.
- 8.- Chess L, Lee J, Yellin M., Lederman S. 1992 Identification of a Novel Surface protein on activated CD4⁺ that induces contact-dependent B cell differentiation (help). *J. Exp. Med* 175:1091-1101
- 9.- Moreno J., Vignali D., Nadimi F., Fuchs S., Adorini L., y Hammerling G. J. 1991 Processing of an endogenous antigen can generate MHC II-restricted determinants distinct from those generated after the processing of exogenous protein. *J. Immunol.* 147: 3306-3313.
- 10.- Bonifaz A. 1995 Vías de procesamiento de antígenos endógenos para su presentación por moléculas MHC II del complejo principal de histocompatibilidad. Tesis de Maestría Facultad de Medicina, UNAM.
- 11.- Ranheim E., Kipps T. 1993 Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J. Exp. Med,* 177:925-935.
- 12.- Faassen A., Dalke D., Berton M. and Pierce S. 1995 CD40-CD40 ligand interactions stimulate B cell antigen processing. *Eur. J. Immunol.* 25:3249-3255.
- 13.- Moreno J. Respuesta inmune y mecanismos de autoinmunidad. Editorial Limusa, 1996. pp 67-80
- 14.- Kooten Van C. and Banchereau J. CD40-CD40 Ligand: A Multifunctional Receptor-Ligand Pair. *Adv. Immunol.* 61: 1-77

- 15.- Stanmenkovic I, Clark, E. A. and Seed, B. A. B lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. 1989 EMBO J. 8, 1403-1410.
- 16.- Fanslow W., Clifford C., Seaman G., Alderson E. y Spriggs R. 1992 Recombinant CD40 ligand exerts potente biolog effects on T cells. J. Immunol 152:4262-.4269.
- 17.- Paulie S., Braesch-Andersen, Bjorck P. 1994 Antibodies to distinct epitopes on the CD40 molecule co-operate in stimulation and can be used for the detection of soluble CD40. Immunol. 83: 430-437
- 18.- Geha R., Narayanaswamy R., Erdyni T. 1994 Structure of the murine CD40 ligand gene. Mol. Immunol. 31:895-900.
- 19.- Jean-Yves N., Gauchat J., Aubry J., Mazzei G. 1993 Human CD40-ligand: Molecular cloning, cellular distribution and regulation of expression by factors controlling IgE production. FEBS 315: 259-226.
- 20.- Graf D., Muller S., Korthauer U., Kooten van C., and KroczeK. 1995 A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. Eur. J. Immunol 25:1749-1754.
- 21.- Pietravalle F., Lecoanet-Henchoz S., Bonnefoy J., Gauchat J. 1996 Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes. J. Biol. Chem., 27:5965-5967.
- 22.- Stanmenkovic I, Clark, E. A. and Seed, B. A. B lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. 1989 EMBO J. 8, 1403-1410.
- 23.- Caux C., Massacrier C., Dubois B., van Kooten C., Durand y Bancherau J. 1994 Activation of Human Dendritic Cells throug CD40 Cross-linking. J. Exp. Med. 180; 1263-1272.
- 24.- Alderson M., Armitage R., Tough J., W. Fanslow y Spriggs. 1993 CD40 expression by human monocytes: Regulation by cytocines and activation of monocytes by ligand for CD40. J. Exp. Med.: 669-674.
- 25.- Galy, A. H. y Spits H. 1992 CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells. J. Immunol. 25:733-737.
- 26.- Goodwin R., Smith C., Jerzy R., Grayson M., Crowe P., Ware C. 1991 Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor expression in T Lymphocytes. J. Immunol. 147:4229-4238.

- 27.- van Kooten, Gaillard C., Galizzi C, Ermann H., Fossiez P, F. Banchereau. 1994 B cell regulate expression of CD40 -ligand on activated T cell by lowering the mRNA level and through the release of soluble CD40. *Eur. J. Immunol.* 24:787-792.
- 28.- Lane P., Traunecker A., Hubele S., Inui S., Gray D. 1992 Activated human T cell express a ligand for the human B cell-associated antigen CD40 which participates in T cell-dependent activation of B lymphocytes. *Eur. J. Immunol* 22: 2573-2578.
- 29.- Lederman S., Yellin M., Krichevsky A., Belko J., Lee J., Chess L. 1992 Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cell that induces contact-dependent B cell differentiation (help). *J. Exp. Med.* 175:1091-1101
- 30.- Hodgkin P., Yamashita L., Coffman R., Kehry M. 1990 Separation of events mediating B cell proliferation and Ig production by using T cell membranes and lymphokines. *J. Immunol.* 145:2025-2034
- 31.- Gauchat J., Henchoz S., Fattah D., Mazzei G., Dash L., Page K., Solari R., Capron M., Jean- Yves B. 1995 CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils. *Eur. J. Immunol.* 25:863-865.
- 32.- Cocks B., de Wall-Malefyt R., Galizzi J. y Aversa G. 1993 IL-13 induces proliferation and differentiation of huma B cell activated by the CD40 ligand. *Inter. Immunol.* 5:657-663.
- 33.- Grammer A., Bergman M., Miura Y., Fujita K., Davis L., Lipsk P. 1995 The CD40 Ligand expressed by human B cell coestimulates B cell responses. *J. Immunol.* 154:4996-5010
- 34.- Pinchuk L., Klaus S., Magaletti D., Pinchuk G., J. Norsen, Clark E. 1996 Functional CD40 ligand expressed by human blood Dendritic cell is up-regulated by CD40 ligation. *J. Immunol.* 157: 4363-4370.
- 35.- Castle, B. E. Kishimoto, K. Stearns and Kehry. 1993 Regulation of expression of the ligand for CD40 on T helper lymphocytes. *J. Immunol.* 151:1777-1788.
- 36.- Yellin M., Sippel K., Covey L., Lee J., Clark E.,L. Chess, Lederman S. 1994 CD40 Molecules induce down-modulation and Endocytosis of T cell suface T cell-B cell activating molecule/CD40-L *J. Immunol.* 152:598-608.
- 37.- Stout R., Suttles J., Xu Jianchao, Grewal Y. y Flavell R. 1996 Impaired T Cell-Mediated Macrophage Activation in CD40 Ligand-Deficient Mice. *J. Immunol.* 156: 8-11
- 38.- Wagner D., Stout R. y Suttles J. 1994 Role of the CD40-CD40 ligand interaction of monocyte interleukin-1 synthesis. *Eur. J. Immunol.* 24: 3148-3154.

- 39.- Kiener P., Moran-Davis P., Rankin B., Wahl A. y Hollenbaugh A. 1995 Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 Induces Proinflammatory Responses in Human Monocytes. *J. Immunol.* 155: 4917-4925
- 40.- Tao X. y Stout R. 1993 T cell-mediated cognate signaling of nitric oxide production by macrophages. Requiriments for macrophage activation by plasma membranes isolated fromm T cell. *Eur. J. Immunol.* 23:2916-2921.
- 41.- Shu U., Kiiniwa M., Chang-You W., Maliszewski R., Vezzio N., Hakimi J., Gately M. y Delespesse G. 1995 Activated T cell induce interleukin -12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur. J. Immunol.* 25: 1125-1128.
- 42.- Kennedy M., Picha K., Fanslow W., Garabstein K., Alderson M., Clifford K., Chin W. y Mohler K. 1996 CD40/CD40 ligand interactions are required for T cell-dependent production of interleukin-12 by mouse macrophages. *Eur. J. Immunol.* 26: 370-378.
- 43.- Bonifaz A., Terrazas L. y Garcia T. medida de la linfoproliferación in vitro porreducción de sales de tetrazolium 1992 *Bioquimia* 17 No. 68:31-36
- 44.- Caux C., Massacrier C., Vanbervliet B., Dubois B., van Kooten C., Durand I. y Banchereau J. 1994 Activation of Human Dendritic Cells through CD40 Cross-linking. *J. Exp. Med.* 180:1263-1272.
- 45.- Bjorck P., Braesch-Andersen S. y Paulie S. 1994 Antibodies to distinct epitopes on the CD40 molecule co-operate in stimulation and can be used for the detection of soluble CD40. *Immunol.* 83:430-437.
- 46.- Kwekkboom J., Kasran D., Barcy A. y Boer F. 1993 Helper effector fuction of human T cells stimulated by anti-CD3 mAb can be enhaced by co-stimulatory signals and is partially depend on CD40-CD40 ligand interaction. *Eur. J. Immunol.* 24:508-517.
- 47.- Fanslow W., Clifford C., Seaman G., Alderson E. y Spriggs R. 1992 Recombinant CD40 ligand exerts potente biolog effects on T cells. *J. Immunol* 152:4262-4269.
- 48.- Rousset F., Garcia E. y Banchereau J. 1991 Cytokine-induced Proliferation and Immunoglobulin Production of Human B Lymphocytes Triggered trough their CD40 Antigen. *J. Exp. Med* 173: 705-710.
- 49.- Rousset F., Garcia E., Defrance T., Péronne C., Vezzio N. y Banchereau J. 1992 Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1890-93.
- 50.- Spriggs M., Armitage R., Strockbine L., Cliffor K., Maliszewski C. y Fanslow W. 1992 Recombinant Human CD40 Ligand Stimulates B Cell Proliferation and Immunoglobulin E Secretion. *J. Exp. Med* 176:1543-1550.

- 51.- Armitage R., Brian M., Spriggs M. y Fanslow W. 1993 Human B Cell Proliferation and Ig Secretion Induced by Recombinant CD40 Ligand are Modulated by Soluble Cytokines. *J. Immunol.* 150:3671- 3680.
- 52.- Maliszewski C., Grabstein K., Fanslow W., Spriggs M. y Sato T. 1993 Recombinant CD40 ligand stimulation of murine B cell growth and differentiation: cooperative effects of cytokines. *Eur. J. Immunol.* 23:1044-1049.
- 53.- Crawford D. y Catovsky D. 1993 In vitro activation of leukaemic B cell by interleukin-4 and antibodies to CD40. *Immunol.* 80:40-44.
- 55.- Banchereau J., Paolo de P., Vallé A., García E. y Rousset F. 1991 Long-Term Human B Cell Lines Dependent on Interleukin-4 and Antibody to CD40. *Sci.* 251:70-72.
- 56.- Foy T., Laman J., Ledbetter J., Claasen E. y Noelle R. 1994 gp39-CD40 interactions are essential for Germinal center formation and the development of B cell memory. *J. Exp. Med.* 180:157-163.
- 57.- Grabstein K., Maliszewski C., Kurt S., Sato T., Spriggs M., Fanslow W. y Armitage R. 1993 The regulation of T cell-dependent antibody formation in vitro by CD40 ligand and IL-2. *J. Immunol.* 150:3141-3147.
- 58.- Gascan H., Aversa G., Gauchat J., Vlasselaer P., Roncarolo M., Yssel H., Kehry M. y De Vries J. 1992 Membranes of activated CD4 T cells expressing t cell receptor (TCR) or induce IgE synthesis by human B cells in the presence of interleukin-4. *Eur. J. Immunol.* 22:1133-1141.
- 59.- Defrance T., Vanbervliet B., Briere F., Durand I., Rousset F. y Banchereau J. 1992 Interleukin 10 and Transforming Growth Factor beta Cooperate to induce anti-CD40-activated Naive human B cell to secrete immunoglobulin A. *J. Exp. Med.* , Vol 175. pp 671-682, 1992.
- 60.- Jumper M., Splawski J., Lipsky P. y Meek K. 1994 Ligation of CD40 induces sterile transcripts of multiple Ig H chain isotypes in human B cell. *J. Immunol.* 152:438-444.
- 61.- Yong L. 1997 Reuse of B lymphocytes in germinal centers. *Science.* 278:238-239.
- 62.- Rothstein T., Wang J., Panka D., Foote L., Wang Z., Stanger B. y Rothstein M. 1995 Protection against Fas-dependent Th1-mediated apoptosis by antigen receptor engagement in B cells. *Nat.* 374:163-165.
- 63.- Fachetti F., Appiani C., Salvi L. y Notarangelo K. 1995 Immunohistologic analysis of ineffective CD40-CD40 ligand interaction in lymphoid tissues from patients with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *J. immunol.* 154:6624-6633.

- 64- Rathmell J., Townsend S., Xu J., Flavell R. y Goodnow C. 1996 Expansion or Elimination of B cells in vivo: Dual roles for CD40-and Fas (CD95) -ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell* 87:319-329.
- 65.- Gray D., Dullforce P. y Jainandusing S. 1994 Memory B cell development but not germinal center formation is impaired by in vivo blockade of CD40-CD40 ligand interaction. *J. Exp. Med.* 180:141-155.
- 66.- Meenakshi R., Aruffo A., Linsley P. y Noelle R. 1995 Studies on interdependence of Gp39 and B7 expression and function during antigen-specific immune response. *Eur. J. Immunol.* 25:596-603
- 67.- Barret T., Shu G. y Clark E. 1991 CD40 signaling activates CD11a/CD18 mediated adhesion in B cells. *J. Immunol.* 146:1722-1729.
- 68.- Klaus G., Holman M. y Jhavaral H. 1994 Properties of mouse CD40: the role of homotypic in the activation of B cells via CD40. *Eur. J. Immunol.* 24:2714-2719.
- 69.- Heath A., Wu W. y Howard M. 1994 Monoclonal antibodies to murine CD40 define two distinct functional epitopes. *Eur. J. Immunol.* 24:1828-1834.
- 70.- Ozaki M., Karlsson L. y Webb S. 1997 Antigen specificity of dual reactive T hybridomas determines the requirement for CD40 ligand-CD40 interactions. *J. Immunol.* 159:214-221.
- 71.- Koopmann J., Hammerling G. y Momburg F. 1997 Generation, intracellular transport and loading of peptides associates with MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 1997.
- 72.- Wubbolts R., Borja-Fernandez M. y Neefjes J. 1997 MHC class II molecules: transport pathways for antigen presentation. *Trends. Cell Biology* 7:115-118.
- 73.- Blum J., Cresswell P. 1988 Role intracellular proteases in the processing and transport of class HLA antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3975-3979.
- 74.- Villadangos J., Riese R., Christopol P. y Ploegh Hidde. 1996 Essential role for cathepsin S in MHC class II associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 4: 357-366.
- 75.- Villadangos J., Riese R., Christopol P. y Ploegh H. 1997 Degradation of mouse invariant chain: roles of cathepsins S and D the influence of major Histocompatibility complex polymorphism. *J. Exp. Med.* 186:549-560.
- 76.- Watts C. 1997 Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu. Rev Immunol.* 15:821-850.

- 77.- Wheeler K., Pound D., Gordon J. y Roy J. 1993 Engagement of CD40 lowers the threshold for activation of resting B cell via antigen receptor. *Eur. J. Immunol* 23:1165-1168.
- 78.- Kappler J., White J., Wegmann D., Mustain E. y Marrack P. 1982 Antigen presentation by I-A* B cell hybridomas to H-2 restricted T cell hybridomas. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 79:3604-3607.
- 79.- Brooks A. y McCluskey J. 1993 Class II-restricted presentation of hen egg lysozyme determinant derivated from endogenous antigen sequestred in the cytoplasm or endoplasmic reticulum of the antigen presenting cells *J. Immunol.* 150:3690-3697.
- 80.- Allen P., McKean D., Beck B., Sheffield J. y Glimcher L. 1985 Direct evidence that a class II molecule and a simple globular protein genate multiple determinants *J. Exp. Med.* 162:1264-1274.
- 81.- Moreno J., Adorini L. y Hammerling G. 1990 Co-dominant restriction by a mixed haplotype I-A determinant ($\alpha^k\beta$) for the lysozyme peptide 52-61 in H-2^k x H-2^b F1 mice *J. Immunol.* 132:1077-81.
- 82.- Koch N., Koch S. y Hammerling G. 1982 *Nature* 299:644
- 83.- Lemke H., Hammerling G. y Hammerling U. 1979 *Immunol. Rev.* 47:175.