

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

E INMUNOLOGÍA



**"OBTENCION DE ANTIGENOS TUMORALES DE
MEMBRANA EN CELULAS DEL LINFOMA
MURINO L-5178Y MEDIANTE KCI"**

T E S I S

**Como requisito parcial para obtener el título de
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO**

PRESENTA:

VIANEY GONZALEZ VILLASANA

Director de Tesis

DRA. CRISTINA RODRIGUEZ PADILLA

CO-DIRECTOR: JOSE LUIS MENDEZ VAZQUEZ

San Nicolás de los Garza, N. L.,

Octubre de 2006

TL

QR188

.6

.G66

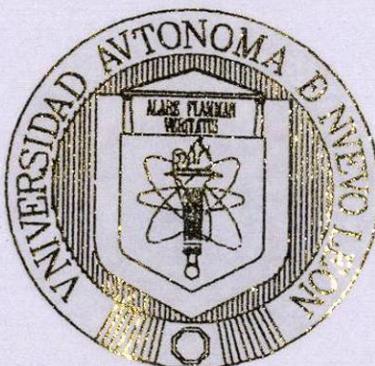
2006

c.1



1080092017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



**"OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS TUMORALES DE MEMBRANA EN CÉLULAS
DEL LINFOMA MURINO L-5178Y MEDIANTE KCl"**

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO

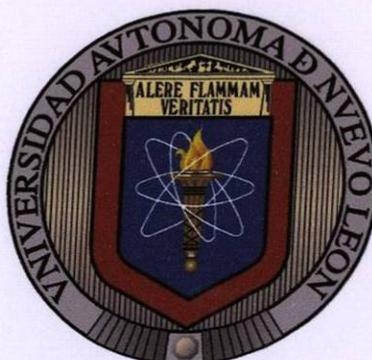
PRESENTA:
VIANEY GONZÁLEZ VILLASANA

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA

CO-DIRECTOR:
JOSÉ LUIS MÉNDEZ VÁZQUEZ

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L., OCTUBRE DE 2006

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**



**“OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS TUMORALES DE MEMBRANA EN CÉLULAS
DEL LINFOMA MURINO L-5178Y MEDIANTE KCI”**

T E S I S

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO

**PRESENTA:
VIANEY GONZÁLEZ VILLASANA**

**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA**

**CO-DIRECTOR:
JOSÉ LUIS MÉNDEZ VÁZQUEZ**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L., OCTUBRE DE 2006

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**



**“OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS TUMORALES DE MEMBRANA EN CÉLULAS
DEL LINFOMA MURINO L-5178Y MEDIANTE KCl”**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO**

**PRESENTA:
VIANEY GONZÁLEZ VILLASANA**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L., OCTUBRE DE 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



**“OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS TUMORALES DE MEMBRANA EN CÉLULAS
DEL LINFOMA MURINO L-5178Y MEDIANTE KCI”**

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO

PRESENTA:
VIANEY GONZÁLEZ VILLASANA

COMISIÓN DE TESIS:

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Presidente

M.C. José Luis Méndez Vázquez
Secretario

Dr. Reyes S. Tamez Guerra
Vocal

MC. Irma O. Martínez Vázquez
Suplente

[Handwritten signatures of the thesis committee members]

ÍNDICE

Sección	Página
DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
LUGAR DE TRABAJO	III
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	IX
Capítulo 1.	
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hipótesis.....	3
1.2. Objetivo general.....	4
1.3. Objetivos particulares.....	4
Capítulo 2.	
ANTECEDENTES	5
2.1. Sistema inmunológico.....	5
2.2. Inmunidad antitumoral.....	6
2.3. Mecanismos de escape tumoral.....	7
2.4. Antígenos tumorales.....	8
2.5. Inmunoterapia.....	10
2.6. Modelos murinos en la investigación del cáncer.....	11
2.7. Linfoma murino L-5178Y.....	12
2.8. Métodos para la purificación de proteínas de membrana.....	14
Capítulo 3.	
MATERIAL Y MÉTODOS	16

3.1. Línea celular tumoral.....	16
3.2. Animales de experimentación.....	16
3.3. Transplante y mantenimiento del linfoma murino L-5178Y en ratones Balb/c.....	16
3.3.1. Obtención de células del linfoma murino L-5178Y.....	16
3.3.2. Cuenta viable de células del linfoma murino L-5178Y.....	16
3.4. Obtención de antígenos de células del linfoma murino L-5178Y mediante el método de extracción con KCl.....	17
3.5. Obtención de células de timo y peritoneo (muestras control).....	18
3.5.1. Obtención de células de timo.....	18
3.5.2. Obtención de células de peritoneo.....	18
3.6. Obtención de antígenos de células de timo y peritoneo mediante el método de extracción con KCl.....	18
3.7. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	18
3.8. Cromatografía de exclusión molecular.....	19
3.8.1. Preparación de la matriz.....	19
3.8.2. Empaquetado de la columna.....	19
3.8.3. Fraccionamiento de las proteínas del extracto celular del linfoma murino L-5178Y.....	20
3.9. Análisis de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.....	20
3.9.1. Preparación del gel.....	20
3.9.2. Preparación de la muestra.....	21
3.9.3. Análisis de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE mediante el programa Quantity-One.....	21
3.10. Inmunización de ratones Balb/c con células inactivadas del linfoma murino L-5178Y.....	21
3.11. Titulación de anticuerpos mediante la prueba de ELISA.....	22
3.12. Determinación de antígenos tumorales del linfoma murino L-5178Y mediante Western blot.....	24
3.13. Determinación de β -actina mediante Western blot.....	25

Capítulo 4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1. Transplante y mantenimiento del linfoma murino L-5178Y en ratones Balb/c	27
4.1.1. Obtención de células del linfoma murino L-5178Y.....	27
4.2. Obtención de antígenos de células del linfoma murino L-5178Y mediante el método de extracción con KCl.....	27
4.3. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	30
4.4. Cromatografía de exclusión molecular.....	30
4.5. Análisis de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.....	31
4.6. Titulación de anticuerpos mediante la prueba de ELISA.....	35
4.7. Determinación de antígenos tumorales del linfoma murino L-5178Y mediante Western blot.....	35
4.8. Determinación de β -actina mediante Western blot.....	38

Capítulo 5

CONCLUSIONES	40
---------------------------	----

Capítulo 6.

PERSPECTIVAS	41
---------------------------	----

APÉNDICE	42
-----------------------	----

LITERATURA CONSULTADA	50
------------------------------------	----

DEDICATORIA.

A Dios: Por estar siempre conmigo, por todo lo que me ha dado y brindarme fuerzas para no desistir y cumplir mis objetivos.

A mis Padres: María Isabel Villasana de González y Fernando González Sánchez por confiar en mi y darme la oportunidad de estudiar una profesión lejos de casa, porque nunca escatimaron en esfuerzos, por guiarme por el buen camino con su ejemplo, por respetar y apoyar mis decisiones, por su paciencia y sus consejos, porque siempre fueron la inspiración que me dio fuerza en todo momento para cumplir esta meta y sobre todo gracias por todo su amor.

A mis hermanos Luis Mario y Fernando: Por creer en mí, por todo su cariño y porque han sido el motivo de mi superación.

A mi hermana Diana: Por sus incontables consejos, su compañía, cariño, apoyo y comprensión.

A mis Abuelos: María de la Luz Sánchez Reyes, Guadalupe González Cisneros e Ismael Villasana Sánchez por todos los buenos momentos vividos, enseñanzas que me brindaron, porque los amo y extraño.

A mi abuelita Juana Sánchez Velásquez: Por todo su apoyo, enseñanzas, consejos y el amor que me ha brindado.

A mis tíos Guadalupe Sánchez Velásquez y Velia Alejandro Rosales, Ma. Alicia Castorena Velásquez y Lino Martínez Quiroga: Por abrirme las puertas de su casa, sus consejos y su gran cariño.

AGRADECIMIENTOS.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas: Por la oportunidad de formar parte del mismo y todo el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

Al proyecto PAICYT No. SA1153-05 por el apoyo económico otorgado para el desarrollo de la presente investigación.

Al Maestro José Luis: Por haberme dado la oportunidad de estar en su laboratorio, por su asesoramiento científico y estímulo para seguir creciendo intelectualmente y su gran amistad.

A los Maestros Máximo E. Román Calderón, Irma Martínez Vázquez, Ma. Esther Treviño Holten y Laura Hernández López: Por su colaboración en el desarrollo de esta tesis, su disposición incondicional en aclarar mis dudas y su amistad.

A Diana Caballero, Nayelli, Karla y Gabby: Por compartirme sus experiencias y enseñanzas en el ámbito científico, por todo el apoyo brindado en esta investigación y su valiosa amistad.

A mis Amigos: Esther, Aracely, Regina, Manuel, Fernanda, Elio, Paola, Mayra, Enriqueta, Juan Manuel y Toño, por todo el apoyo que me brindaron, sus consejos y su gran amistad.

Al M.C. Víctor Aguirre y Dr. Benito Pereyra: Por su colaboración en el análisis de los geles mediante el software Quantity-One.

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE
INMUNOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E
INMUNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.**

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
Ag	Antígeno
APC	Células presentadoras de antígenos
BSA	Albúmina sérica bovina
°C	Grados centígrados
cm	Centímetro
Da	Daltones
Dr.	Doctor
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELISA	Enzyme Linked Inmunoabsorvent Assay
FasL	Ligando Fas
g	Gramos
h	Horas
H₂O_{dd}	Agua bidestilada
H₂O_{mQ}	Agua mili-Q
HCl	Ácido clorhídrico
IL-2	Interleucina 2
KCl	Cloruro de potasio
KDa	Kilo-Daltones
Kg	Kilogramos
L	Litro
LTc	Linfocitos T citotóxicos
M	Molar
mA	Miliamperes
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
NH₄Cl	Cloruro de amonio
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio

NaCl	Cloruro de sodio
Na₂HPO₄	Fosfato de sodio dibásico anhídrido
NaH₂PO₄	Fosfato de sodio monobásico anhídrido
NBT/BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato/nitroazul de tetrazolium
nm	Nanómetro
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
PBS	Buffer salino de fosfatos
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones de hidrógeno
PNP	Para-nitrophenyl phosphate
PSA	Persulfato de amonio
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAA	Antígenos asociados al tumor
TCR	Receptor de células T
TEMED	N,N,N,N-tetrametil-etilendiamina
Th1	Células T cooperadoras de tipo 1
Th2	Células T cooperadoras de tipo 2
TNF-β	Factor de necrosis tumoral-β
TSA	Antígenos específicos de tumor
V	Voltios
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
%	Porcentaje
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
W	Wats.

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla	Página
1. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	19
2. Esquema de inmunización de ratones Balb/c con células inactivadas del linfoma murino L-5178Y.....	22
3. Rendimiento celular obtenido de 5 transplantes del linfoma murino L-5178Y.....	27
4. Rendimiento del antígeno tumoral de células del linfoma murino L-5178Y por el método de extracción con KCl.....	29
5. Concentración de las muestras de antígenos de células tumorales, timo y peritoneo.....	30
6. Pesos moleculares estimados de las proteínas contenidas en los antígenos de células del linfoma murino L-5178Y no presentes en antígenos de timo y peritoneo.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura	Página
1. Composición química de la membrana plasmática.....	14
2. Inmovilización de ratones con un tubo <i>rodent restrainers</i> (Daigger).....	22
3. Distribución de la muestra control, antígeno tumoral y sustrato en la placa de ELISA.....	23
4. Ensamblaje y orientación de los elementos para la electrotransferencia.....	24
5. Cromatograma de la muestra de antígenos de células del linfoma murino L-5178Y.....	30
6. Análisis de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.....	31
7. Análisis proteico de las muestras de antígenos de células tumorales, timo y peritoneo en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.....	32
8. Esquema representativo de las proteínas diferentes encontradas en los antígenos de células del linfoma murino L-5178Y, timo y peritoneo.....	33
9. Titulación de anticuerpos mediante la prueba de ELISA.....	35
10. Determinación de antígenos tumorales del linfoma murino L-5178Y mediante Western blot con suero problema.....	36
11. Determinación de antígenos tumorales del linfoma murino L-5178Y mediante Western blot con suero control.....	36
12. Esquema de las proteínas detectadas mediante Western blot con suero problema.....	36

13. Esquema de las proteínas detectadas mediante Western blot con suero control..... 36

14. Determinación de β -actina mediante Western blot con anticuerpos monoclonales.:..... 39

RESUMEN.

La inmunología antitumoral está basada en la premisa de que existen antígenos tumorales específicos y asociados a tumor que pueden ser reconocidos por el sistema inmune y por consecuencia generar una respuesta contra las células neoplásicas. Los antígenos tumorales situados en la membrana plasmática son los de mayor interés en el campo de la inmunología tumoral, puesto que por su biolocalización pueden ser reconocidos con mayor facilidad por el sistema inmune. Por ello su identificación y obtención es fundamental para el desarrollo de vacunas inmunoterapéuticas contra el cáncer. El presente trabajo propone y describe un fácil y eficiente método empleando KCl para la obtención de antígenos tumorales presentes en la membrana plasmática de células del linfoma L-5178Y. Para la obtención de células tumorales se utilizó el modelo murino con linfoma L-5178Y establecido, en el que su mantenimiento se realizó por trasplante intraperitoneal seriado en ratones Balb/c. Los antígenos tumorales de esta línea y los antígenos de las células control (peritoneo y timo) se obtuvieron mediante el método para extracción de proteínas con KCl. El patrón de proteínas presentes en la muestra de antígenos tumorales y las muestras de antígenos control, se observó y analizó en geles de poliacrilamida SDS-PAGE utilizando el programa Quantity-One. Mediante Western blot se detectaron tres proteínas de membrana del linfoma murino L-5178Y de aproximadamente 117, 55 y 45 KDa, que no presentaron reacciones cruzadas con las muestras de antígenos control (se observaron en las membranas tratadas con suero de ratones inmunizados con células inactivadas del L-5178Y y no en las membranas tratadas con suero de ratones sanos). Estas proteínas corresponden a antígenos de membrana del linfoma murino L-5178Y. Estos antígenos son diferentes a los reportados por Weinhold *et al.*, en 1982 (de pesos moleculares de 71, 85 y 135) y el de Rabinovsky y Yang en 1986 (de 64 KDa). Actualmente en México no se han desarrollado metodologías exitosas para el aislamiento de antígenos tumorales de membrana plasmática, por lo que los resultados del presente trabajo pretenden servir de referencia y establecer las bases en la obtención y el desarrollo de antígenos tumorales que puedan servir de vacunas.

Capítulo 1.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un proceso por el cual las células normales son transformadas progresivamente en células malignas, debido a la adquisición secuencial de mutaciones que aparecen como resultado de un daño al genoma (3,9)

A nivel mundial anualmente se diagnostican más de 10 millones de personas con algún tipo de cáncer y la mitad de ellas mueren por la enfermedad. Se ha visto que la incidencia de los tumores varía en diferentes partes del mundo. En México se diagnostican anualmente más de 80 mil pacientes con diferentes tipos de cáncer, siendo los más frecuentes el cáncer del cuello de la matriz y glándula mamaria en mujeres y el de próstata y pulmón en hombres. La OMS, estima que para el año 2020, habrá por lo menos 15 millones de nuevos casos al año y de estos, el 70% vivirá en países en vías de desarrollo (29,39).

En las últimas tres décadas, el tratamiento terapéutico del paciente con cáncer se ha enriquecido progresivamente con una cuarta modalidad de tratamiento denominada *Inmunoterapia* que es utilizada para mejorar los resultados obtenidos con alguno de los tres tratamientos oncológicos convencionales como la cirugía, quimioterapia y radioterapia (5).

La inmunoterapia tiene como objetivo estimular y/o potenciar la respuesta inmune en el paciente para lograr la inhibición del crecimiento y la diseminación del tumor. Sin embargo, para que se desarrollen mecanismos inmunitarios contra tumores tiene que existir como requisito previo que las células tumorales contengan moléculas que sean reconocidas por el sistema inmunológico como extrañas: *antígenos tumorales*, los cuales aparecen como una consecuencia de la transformación maligna (7).

Aunque el producto de éstas transformaciones puede ser identificado tanto en el interior como en la superficie de las células malignas, los antígenos presentes en la membrana celular tienen mayor importancia en el campo de la

inmunoterapia ya que por su biolocalización pueden ser reconocidos con mayor facilidad por el sistema inmune, además si estos antígenos poseen una alta capacidad inmunogénica podrán despertar una respuesta inmune humoral y/o celular en contra del tumor (7).

Es importante entonces la identificación y purificación de antígenos tumorales presentes en la membrana plasmática capaces de ser reconocidos por las células T, ya que representan una alternativa potencialmente viable para el desarrollo de la inmunoterapia antitumoral. Existen relativamente pocos procedimientos publicados para extraer proteínas de membrana de manera eficaz y exitosa. El método que se propone y describe en este trabajo es fácil y eficiente.

Actualmente en México se han desarrollado pocas estrategias que impliquen el uso de antígenos tumorales como inmunoterapia contra el cáncer, por esto la presente investigación pretende también servir de referencia y establecimiento de las bases en la obtención de antígenos de células tumorales para el desarrollo de vacunas en humanos en nuestro país.

1.1. HIPÓTESIS

La obtención de antígenos tumorales de membrana de células del linfoma murino L-5178Y, es factible mediante el método para extracción de proteínas con KCl.

1.2. OBJETIVO GENERAL

Obtención de antígenos tumorales de membrana de células del linfoma murino L-5178Y mediante el método para extracción de proteínas con KCl.

1.3. OBJETIVOS PARTICULARES

- **Transplante y mantenimiento del linfoma murino L-5178Y en ratones Balb/c.**
- **Obtención de antígenos tumorales del linfoma murino L-5178Y mediante el método de extracción con KCl.**
- **Obtención de antígenos de las células de timo y células de peritoneo (muestras control) mediante el método de extracción con KCl**
- **Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.**
- **Análisis de los antígenos tumorales del linfoma murino L-5178Y mediante el sistema de cromatografía en columna.**
- **Análisis de los antígenos tumorales del linfoma murino L-5178Y, los antígenos de células de timo y los antígenos de células de peritoneo (muestras control) en geles de poliacrilamida SDS-PAGE mediante densitometría.**
- **Establecer diferencias y homologías entre las muestras de antígenos tanto de células tumorales del linfoma murino L-5178Y como de timo y peritoneo.**
- **Detección de antígenos tumorales del linfoma murino L-5178Y mediante Western blot.**

Capítulo 2.

ANTECEDENTES.

2.1. Sistema inmunológico.

Los antígenos tumorales de mayor relevancia en la actualidad son aquellos que se encuentran en la membrana celular y que además son reconocidos por los linfocitos T CD8⁺. La presentación de antígenos procesados como péptidos unidos a moléculas de MHC clase I ó II y el reconocimiento por las células T, es requisito indispensable para que se despierte una respuesta inmune eficaz contra tumores (1,33).

La respuesta inmune antitumoral mediada por linfocitos T, involucra la activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en presencia de antígenos tumorales unidos a una molécula de MHC clase II y I respectivamente. La activación total de los linfocitos T CD8⁺ para diferenciarse en linfocitos T citotóxicos (Tc) capaces de lisar células tumorales, requiere además la presencia de interleucina 2 (IL-2) e interferón γ (INF- γ) secretadas por las células T CD4⁺ (23,24).

Una vez activados los LTc se llevará a cabo el proceso de lisis de las células tumorales por dos vías: *Vía secretora*: proceso de exocitosis en el cual gránulos de perforina y granzimas son secretados en el sitio de contacto entre el LTc y su célula blanco. La perforina forma canales en la membrana plasmática produciendo choque osmótico y con esto la lisis de la célula, además permite la entrada de las granzimas. *Vía de Fas y su ligando (FasL)*: Esta vía produce en la célula blanco fragmentación del ADN, condensación de cromatina y fragmentación de laminina. Ambas vías convergen en la activación de caspasas, las cuales activan el daño celular (24).

La activación de linfocitos T cooperadores o helper CD4⁺ (LTh) contribuye a la eliminación de las células tumorales de manera indirecta. Estos linfocitos expresan una molécula co-estimuladora (B7) que se une a una parte del receptor de células T (CD28) durante la presentación del antígeno. La ausencia de esta señal puede originar anergia de las células T, un mecanismo potencialmente

responsable de la inducción de tolerancia para antígenos propios y posiblemente para antígenos tumorales (1,24).

En 1986 Mosmann *et al.*, identificaron clones de células Th murinas con distintos patrones de secreción de citocinas denominadas Th1 y Th2. Las células Th1 producen IFN- γ , IL-2, TNF- β , éstas intervienen en la diferenciación de los LTc, en la activación de células B y en la función fagocítica de los macrófagos. Las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y actúan sobre los linfocitos B para producir anticuerpos tipo IgE que se unen a células cebadas y promueven su desarrollo, además intervienen en la activación de eosinófilos (28).

Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ así como las citocinas producidas por Th1 y Th2 son mutuamente inhibitorios, no solo para su diferenciación si no también para su funcionamiento, estableciendo así un balance entre ellas y condiciones óptimas del sistema inmunológico para atacar a las células tumorales (23).

La regulación negativa de las células T CD8⁺ produce una baja inmunidad antitumoral. Una evidencia causal es la exposición de un huésped con tumor a dosis subletales de radiación ionizante, las cuales destruyen preferencialmente a las células CD4⁺ resultando en un aumento en la inmunidad mediada por células CD8⁺. En base a esto Awwad y North en 1988, propusieron que el tratamiento con anticuerpos anti-L3T4 (en humanos células T CD4⁺) en ratones con el linfoma L5178Y, resulta en la eliminación de linfocitos T CD4⁺ y por lo tanto en la regresión del tumor por parte de las células T CD8⁺, sin embargo este tratamiento es eficaz sólo cuando se trata de tumores en los que existe una regulación negativa de linfocitos T CD8⁺ (6).

2.2. Inmunidad antitumoral.

La respuesta inmune antitumoral es una red compleja formada por células y mensajeros químicos que actúan de manera colectiva para destruir o eliminar células dañadas o no propias (19).

Si las células tumorales actúan como antígenos extraños en el huésped, es posible que el sistema inmunitario sea capaz de reconocerlas y destruirlas antes de que formen tumores o destruirlos después de que se formen. Este papel del sistema inmunológico se conoce como inmunovigilancia. La idea surgió con Paul Ehrlich a comienzos del siglo pasado y esto condujo a Macfarlane Burnet y Lewis Thomas a proponer y desarrollar la teoría de vigilancia inmunológica (1,32).

Aunque todavía son escasas las pruebas directas de que la inmunovigilancia proteja a los individuos frente a tumores comunes, ciertas observaciones apoyan la validez de este concepto: a) Mayor Incidencia de tumores en individuos inmunodeprimidos, b) Los tumores aparecen con mayor frecuencia en el período neonatal y en edades avanzadas cuando el sistema inmunológico funciona con menos efectividad, c) Determinados tumores presentan infiltrados linfoides y esto representa generalmente un factor de buen pronóstico y d) La posibilidad de una recaída tardía (incluso luego de 20 años del primotratamiento), indicando en parte que hasta aquel momento las defensas del huésped han sido capaces de inhibir el crecimiento de la neoplasia (7).

2.3. Mecanismos de escape tumoral.

Por otra parte, aunque los tumores malignos puedan expresar antígenos tumorales que sean reconocidos como extraños y la vigilancia inmunológica pueda limitar el crecimiento de algunos tumores, está claro que el sistema inmunitario no impide la aparición de cánceres letales en el hombre.

Los procesos de escape tumoral a la vigilancia inmunológica pueden deberse a varios mecanismos: a) Escasa inmunogenicidad de los antígenos tumorales, b) Pérdida de la expresión de MHC, c) Disminución o pérdida en el tumor de la expresión de antígenos asociados al tumor, d) Liberación de factores inmunosupresores por los tumores (prostaglandina E2, IL-4 e IL-10), f) Enmascaramiento: las células tumorales pueden recubrirse con moléculas normales del hospedero contra la cual existe tolerancia, g) Inducción de apoptosis en los linfocitos T por expresión en la célula tumoral de moléculas como Fas ligando que al unirse con la molécula Fas presente en los linfocitos T induce señales en estos que lo llevan a la muerte celular programada, h) Rápida

proliferación celular que logra superar la capacidad de respuesta del sistema inmune, i) Tumores en sitios privilegiados y j) Liberación de antígenos específicos de tumor al torrente sanguíneo (33,35).

Es por esto que uno de los principales focos de atención de la inmunología de tumores, es comprender la forma en que las células tumorales son capaces de evadir la respuesta inmune para lograr desarrollar estrategias que aumenten la inmunogenicidad de los tumores y por lo tanto la respuesta inmunológica del paciente.

2.4. Antígenos tumorales.

Los antígenos tumorales son estructuras moleculares que aparecen como una consecuencia de la transformación de la célula cancerosa y son capaces de provocar el desarrollo de mecanismos inmunitarios (inmunidad celular y/o humoral) eficaces contra tumores (7). Por ello la aplicación de antígenos tumorales en pacientes con cáncer representa una estrategia importante en la reciente investigación en inmunoterapia contra cáncer.

Los cambios moleculares más frecuentes que pueden aparecer en la membrana celular y que determinan el comportamiento antigénico del tumor pueden ser: La pérdida de determinados antígenos presentes en células normales como ocurre con tumores que pierden los antígenos A, B y H característicos de los grupos sanguíneos, la presencia de neoantígenos que no son característicos del tejido normal, además de cambios en la estructura de elementos normales como los antígenos de histocompatibilidad o antígenos fetales presentes en células maduras (1).

Los patrones de expresión de éstos antígenos difieren entre tumores autólogos, heterólogos y tejidos normales. Los antígenos tumorales se clasifican con frecuencia en función fundamentalmente de estos patrones de expresión en: *Antígenos específicos de tumor (TSA)*: Antígenos que se expresan en células tumorales pero no en células normales. Estos son los antígenos que con mayor probabilidad despiertan la respuesta inmunitaria del huésped debido a que son reconocidos como extraños. *Antígenos asociados al tumor (TAA)*: Antígenos

tumorales que se expresan simultáneamente en las células normales del huésped y la expresión puede o no estar restringida al tipo de tejido del que se originó el tumor. Aunque algunos de estos antígenos son capaces de inducir una respuesta inmune, regularmente no lo hacen, debido a la tolerancia a lo propio (1,7).

El aislamiento y caracterización de antígenos tumorales es importante en la determinación del papel biológico que desempeñan en el crecimiento progresivo de un tumor y en la inducción de la inmunidad antitumoral. Se han realizado diversos estudios para la identificación y caracterización de antígenos tumorales con resultados poco alentadores lo que puede atribuirse a las limitaciones en las estrategias experimentales empleadas. Aún con esto se ha logrado determinar la presencia de una o varias glicoproteínas de membrana con propiedades inmunogénicas.

En 1980 el Dr. Ruiz Castañeda aisló a partir de la orina de pacientes con cáncer antígenos específicos para cada tipo de cáncer. Del sedimento urinario formado a partir de la primera orina de varios días, obtuvo una fracción peptídica que tras ser purificada a partir de filtración aplicó como vacuna reduciendo la actividad tumoral (12,13).

Ramos *et al.*, en 1980 determinaron que los antígenos tumorales específicos de las células del linfoma murino L-5178Y, capaces de inducir una respuesta inmunológica de rechazo, se encuentran ubicados en el glucocálix de estas células (34).

Weinhold y Wheelock, en 1982 identificaron antígenos del linfoma L-5178Y que son blanco para los linfocitos T CD8⁺ generados en la fase de latencia del tumor, con un peso molecular de 71, 85 y 135 KDa (44).

Rabinovsky y Yang en 1986 al determinar el efecto del suero de caballo y suero fetal bovino en la expresión de antígenos asociados a tumor y la tumorigenicidad de las células del linfoma L-5178Y identificaron un antígeno asociado al tumor, el cual es una glicoproteína con un peso molecular de 64 KDa (31).

2.5. Inmunoterapia.

El tratamiento actual de los pacientes con cáncer esta basado principalmente en la eliminación del tumor por medio de cirugía y/o en la destrucción de las células cancerosas por medio de quimioterapia y/o radioterapia (17). Sin embargo los linfocitos son células altamente sensibles a la destrucción por fármacos y radiación, lo que hace que estos tratamientos produzcan una inmunosupresión que frecuentemente lleva a una alta susceptibilidad a infecciones (33).

La historia de las primeras descripciones científicas que apuntaban hacia la posibilidad del uso de la inmunoterapia contra el cáncer, data desde los experimentos clásicos de Coley 1893., quien notificaba que filtrados de determinadas bacterias podían tener actividad antitumoral y en experimentos posteriores se sugirió que esta actividad estaba relacionada con la activación del sistema inmune (7,25).

Se pueden distinguir básicamente dos tipos de inmunoterapia: *Inmunoterapia activa e Inmunoterapia pasiva*; en la primera se estimula a los componentes del sistema inmunológico encargados de la respuesta antitumoral. Mientras que la segunda consiste en la transferencia de elementos exógenos a pacientes con cáncer para controlar el tumor (17,41).

Algunas formas de inmunoterapia son parte habitual del tratamiento de diferentes neoplasias, mientras que otras se encuentran en fase de ensayo preclínico o clínico. Dentro de éstas las más utilizadas en la actualidad son los interferones, interleucinas, factores estimulantes de colonia, en los que se logra una estimulación inespecífica, mientras que con el uso de los anticuerpos monoclonales y las vacunas obtenidas de lisados celulares, células completas irradiadas y antígenos tumorales se obtiene una estimulación específica (5).

En oncología, las vacunas son terapéuticas pues generalmente son administradas como terapia adyuvante de los métodos convencionales después de la aparición de la enfermedad. Éstas pueden clasificarse en: a) Vacunas celulares que pueden ser lisados o células completas y atenuadas (autólogas o heterólogas), b) Vacunas de células dendríticas cargadas con antígenos

tumorales, c) Vacunas de antígenos purificados o parcialmente purificados asociados a tumor, d) Vacunas con anticuerpos antiidiotipos, e) Vacunas con proteínas de shock térmico (30,41).

Las vacunas de células autólogas son preferidas por su compatibilidad con el sistema mayor de histocompatibilidad (HLA) de los individuos a tratar. En la actualidad existen ensayos con vacunas autólogas + BCG o citocinas (IL-2 GM-CSF) en melanoma, cáncer de colon y riñón; pero resulta difícil la obtención de células en cantidades suficientes a partir de biopsias, así como lograr el establecimiento de líneas celulares para la obtención de antígenos tumorales. Por esta razón la vía más eficiente para maximizar la respuesta inmune de los pacientes contra las células tumorales autólogas es la formulación de vacunas de células alogénicas que compartan antígenos HLA con el hospedero y que expresen en cantidades óptimas la mayoría de los antígenos asociados a tumor, que incluyen proteínas y carbohidratos (5).

En los 40's el Dr. mexicano Ruiz Castañeda descubrió proteínas que son eliminadas por las mujeres embarazadas a través de la orina y que denominó fetoproteínas, al poco tiempo observó que este factor peptídico no era exclusivo de las mujeres embarazadas, pues también se encontraba en personas con cáncer, por lo que aplicó estas proteínas como vacunas en pacientes con algún tipo de tumor (12,13).

2.6. Modelos murinos en la investigación del cáncer.

En 1915 el Dr. Yamagiwa desarrolló el primer modelo animal de la historia de la investigación oncológica, al aplicar a 137 conejos extractos de alquitrán de hulla directamente sobre la piel cada tercer día y durante tres meses. Al finalizar un año 7 de los animales tratados habían desarrollado carcinomas invasivos (46).

Los modelos murinos han sido empleados en investigaciones en cáncer desde 1894. Junto con ratas y otros roedores, los ratones son la especie más utilizada en la investigación médica, su talla pequeña y bajo costo los hacen ideales para los experimentos de laboratorio. La mayoría de los antígenos

tumorales han sido determinados en modelos murinos de tumores inducidos por carcinógenos o virus oncogénicos (10,37).

2.7. Linfoma murino L-5178Y

Dentro de los tumores inducidos químicamente se encuentra el linfoma L-5178Y. Alexander y Mikulski en 1961., describieron esta línea, la cual es una leucemia transplantable, que se originó a partir de un tumor tímico inducido con 3-metilcolantreno en ratones DBA/2 (H-2^d) (2). La línea tumoral puede mantenerse in vitro en medios de cultivo como Fischer y RPMI 1640 e in vivo mediante trasplantes seriados en ratones DBA/2 y Balb/c (15).

Este tumor es parecido al presentado en los humanos y proviene de células T de timo murino, es un tumor de células grandes poco diferenciadas, se desarrolla en ratones con un complejo mayor de histocompatibilidad H-2^d de los cuales fue obtenido. Se presenta en tres formas: dos locales y una generalizada, las primeras son ascitis y subcutánea sólida, y la segunda es la invasión de espacios porta en hígado, sinusoides de bazo y otros órganos (15).

La forma sólida del tumor es altamente vascularizada, el tumor es agresivo y rápidamente penetra en el tejido normal infiltrándolo. La causa de muerte del ratón es la generalización del proceso tumoral con la destrucción de médula ósea roja, trastornos cerebrales e insuficiencia policitémica y en caso de ascitis es la insuficiencia cardíaca por presión de vasos principales de parte del líquido ascítico. Las hembras son más susceptibles a desarrollar el linfoma L-5178Y que los machos (15).

En 1977 Siboo *et al.*, caracterizaron las células del linfoma murino L-5178Y mediante fagocitosis, métodos citoquímicos y técnicas de marcador de membrana y determinaron que estas células presentan características tanto de células B como de monocitos, ya que en la superficie de la membrana celular encontraron una inmunoglobulina que es producida por células B así como receptores comunes de células B y monocitos. Además de actividad enzimática y endocítica propias de monocitos (38).

La línea celular L-5178Y se ha empleado principalmente en el análisis de toxicidad celular (evaluación de drogas anti-neoplásicas) y estudios radiológicos. La variabilidad en la sensibilidad de las sub-líneas derivadas del L-5178Y (L-5178R y L-5178S) frente a agentes exógenos hace de esta un modelo interesante para el estudio de los fenómenos involucrados en la tumorigenicidad (8).

Además de la variabilidad observada entre sub-líneas, el linfoma L-5178Y posee la capacidad de entrar en “estado de latencia”, el cual podría definirse de acuerdo a Weinhold, Goldstein y Wheelock, como “el estado en el cual las células tumorales persisten en su hospedero por períodos prolongados de tiempo con un crecimiento neto mínimo”(45), este comportamiento tiene su equivalente clínico en el período de remisión, el cual puede haberse prolongado por años, antecede a la reaparición de tumores que se ha observado en pacientes con cáncer y se cree está relacionado con los mecanismos de evasión tumoral (43,45). El estado de latencia de el linfoma L-5178Y ha sido ampliamente estudiado, por lo que representa un modelo ideal para determinar la efectividad de tratamientos inmunoterapéuticos antitumorales (26).

Otra característica ampliamente estudiada de esta línea celular es su capacidad de generar nuevas variantes inmunogénicas al ser tratadas con agentes exógenos, lo cual es de gran interés para determinar los factores determinantes de la tumorigenicidad celular.

Hernández-López L.S en 1998 en su trabajo sobre “El efecto de la proteína de 20 KDa denominada oncotoxina sobre el crecimiento de un linfoma murino subcutáneo L-5178Y”, determinó que a una dosis de 20×10^6 células del linfoma L-5178Y se presenta el 100% de mortalidad en ratones Balb/c a los 30-40 días después de la inoculación del tumor. Con esta dosis evaluó el efecto de la oncotoxina de 20 KDa de *Bacillus thuringiensis var thuringiensis* a diferentes dosis, observando una regresión completa del tumor en 25 días aplicando una dosis de 1500 µg de oncotoxina/Kg de peso. Esta regresión fue dependiente de la dosis y durante un año no se observó recurrencia del tumor (21).

2.8. Métodos para la purificación de proteínas de membrana.

Los antígenos específicos y/o asociados a tumor en la superficie de la membrana celular son de gran interés en el campo de la inmunología tumoral, ya que pueden ser reconocidos con mayor facilidad por el sistema inmune debido a su ubicación. Por tal motivo la purificación de éstas proteínas (antígenos) ha sido de gran importancia para el desarrollo de vacunas antitumorales.

En la membrana celular se encuentran dos tipos de proteínas: *Proteínas de membrana periférica*: Son predominantemente hidrofílicas y se encuentran asociadas a la membrana a través de interacciones electrostáticas; además son fácilmente purificadas por métodos cromatográficos convencionales. *Proteínas integrales de membrana*: son anfipáticas; con una región hidrofílica expuesta al ambiente acuoso y una región hidrofóbica embebida en la matriz lipídica (40).

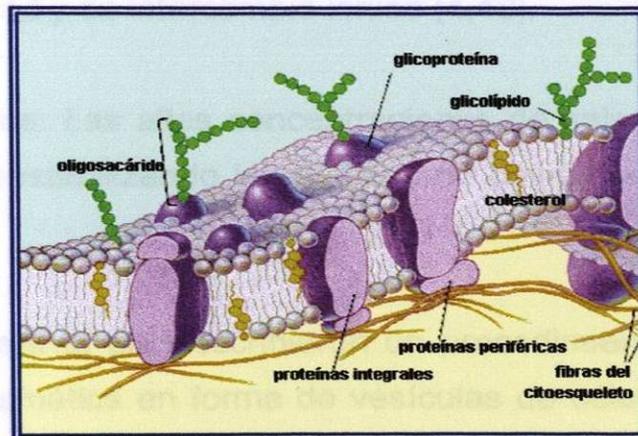


Figura 1. Composición química de la membrana plasmática.

Cada proteína posee características físicas únicas como la carga, tamaño y solubilidad, por lo tanto, no existe un protocolo estándar que pueda aplicarse rutinariamente para su purificación. Sin embargo puede lograrse mediante la combinación de los diferentes métodos existentes (4).

Detergentes: La integración de las moléculas de detergente en los lípidos de la membrana ocasiona una alteración de su estructura. Los lípidos forman en general micelas mixtas con el detergente, en tanto que las proteínas hidrofóbicas se cubren con una monocapa del mismo. Existe una variedad considerable de detergentes empleados en purificación de proteínas de membrana. Pueden ser

detergentes iónicos, como el SDS o el CTAB, o no iónicos, como la digitonina, el octilglucósido, el Lubrol, el Triton, y otros (4,40).

Centrifugación diferencial: Éste método se utiliza para preparar fracciones subcelulares o aislar organelos. Las proteínas de estas preparaciones pueden ser separadas utilizando diferentes métodos cromatográficos (4).

Cromatografía: Método físico de separación en el que los compuestos se distribuyen entre dos fases: *Fase estacionaria*, de gran área superficial y que puede ser líquida o sólida. *Fase móvil*, fluido que pasa a través o a lo largo de la fase estacionaria y puede ser líquida, gaseosa o en estado supercrítico. Existen diferentes tipos de cromatografía según las características de la muestra a purificar: Cromatografía en fase reversa, de exclusión molecular, de interacción hidrofóbica, de afinidad y de intercambio iónico (4,40).

Métodos salinos: Las altas concentraciones de sales como el KCl ó NaCl (>0.15M) actúan desestabilizando las uniones no covalentes de las proteínas de membrana (4).

En 1980 Torrent *et al.*, describieron un procedimiento para la purificación de la membrana plasmática en forma de vesículas de células del linfoma murino L-5178Y empleando un homogenizador Elvehjem. A partir de una suspensión celular de 30 ml a una concentración de $1-1.5 \times 10^8$ células obtuvo de 1-3mg/ml de vesículas de membrana plasmática (42).

Capítulo 3.

MATERIAL Y MÉTODO.

3.1. Línea celular tumoral:

La línea tumoral utilizada fue el linfoma murino L-5178Y, proporcionada por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

3.2. Animales de experimentación:

Se utilizaron ratones hembras de la cepa Balb/c (H-2^d) de 6-8 semanas de edad, mantenidos en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Se les proporcionó alimento comercial nutricubo (Purina de México S.A. de C.V.) y H₂O estéril (Laboratorios Monterrey).

3.3. Transplante y mantenimiento del linfoma murino L-5178Y en ratones Balb/c.

3.3.1. Obtención de células del linfoma murino L-5178Y.

Se realizó la metodología descrita por Hernández- López L.S., 1998, para lo cual se obtuvo el líquido peritoneal de un grupo de cuatro ratones Balb/c que se sacrificaron por dislocación cervical 13 días después de haber sido transplantados con células del linfoma murino L-5178Y. El área ventral de cada ratón se desinfectó con etanol al 70% y con tijeras de disección estériles se realizó un corte longitudinal a nivel abdominal dejando expuesto el peritoneo. Con una jeringa se administró vía intraperitoneal 6 ml de PBS estéril pH 7.2, se colectó el líquido peritoneal en un tubo FALCON de 50 ml y se colocó en hielo. Después se centrifugó a 2500 rpm/10 min a 4°C (Eppendorf 5804-R), para obtener el paquete celular (pellet) (21).

3.3.2. Cuenta viable de células del linfoma murino L-5178Y.

La cuenta viable de las células se llevó a cabo diluyendo a 1:500 con PBS pH 7.2 estéril. A partir de ésta solución se preparó una dilución 1:2 con azul tripan (Sigma Chemical Co. # T8154). Después se colocó la muestra en la cámara de Neubauer (Hausser Scientific) y posteriormente se contaron las células viables en microscopio

óptico (Olympus) presentes en los 4 cuadrantes de la cámara. La viabilidad celular se determinó en base a la siguiente fórmula.

Fórmula:

$$\text{Cuenta celular/ml} = \frac{\text{No. células en 4 cuadrantes}}{4} \times \text{dilución azul tripán} \times \text{dilución muestra} \times 10^4$$

La cuenta se ajustó a 5×10^6 células en un volumen de 0.2 ml de PBS pH 7.2 estéril. Se inocularon intraperitonealmente ratones Balb/c de 6 a 8 semanas de edad, los cuales se mantuvieron en jaulas en grupos de cuatro y en condiciones asépticas (21).

3.4. Obtención de antígenos de células del linfoma murino L-5178Y mediante el método de extracción con KCl.

Las células obtenidas (sección 3.3.1), se trataron con solución de lisis e incubaron a temperatura ambiente por 10 min, después se centrifugaron a 2500 rpm/10 min a 4°C. Posteriormente se realizaron dos lavados con solución de Alsever estéril bajo las mismas condiciones. El paquete celular se colocó en un frasco de 100 ml (Wheaton) y se resuspendió con solución salina 0.9% (PiSA) agregando 9 ml de esta solución por cada ml de pellet. Después se agregó lentamente y en agitación constante KCl en estado reactivo hasta alcanzar una concentración de 3 M. Las células se incubaron a 4°C durante 16 h con agitación constante.

Posteriormente la suspensión celular se colectó en tubos para ultracentrífuga Beckman y se centrifugó a 40,000 rpm/2 h a 4°C. El sobrenadante se colocó en una membrana (Spectrum Laboratories Inc.) estéril con un poro de 12-14,000 Da y se dializó en contra de sucrosa al 50% por 16 h a 4°C. Posteriormente se reequilibró en contra de H₂O estéril por 16 h a 4°C. El material obtenido se centrifugó a 20,000 rpm/30 min a 4°C. El antígeno tumoral contenido en el sobrenadante se esterilizó por filtración (filtro Millex GS con poro de 0.2 µm) y se almacenó en alícuotas de 8 ml a -20°C hasta su uso.

3.5. Obtención de células de timo y peritoneo (muestras control).

3.5.1. Obtención de células de timo.

Se obtuvieron células de timo de un grupo de ratones Balb/c sanos de 6-8 semanas de edad, los cuales se sacrificaron por dislocación cervical. Los timos se extrajeron en condiciones de asepsia y se maceraron con PBS pH 7.2 estéril. La suspensión celular se tamizó a través de una malla del número 50 (Sigma) y las células se colectaron en un tubo FALCON de 50 ml (22).

3.5.2. Obtención de células de peritoneo.

La obtención de las células de peritoneo se realizó de acuerdo a la metodología indicada en el punto 3.3.1.

3.6. Obtención de antígenos de células de timo y peritoneo mediante el método de extracción con KCl.

La extracción se llevó a cabo según la metodología indicada en el apartado 3.4.

3.7. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

La cuantificación de proteínas de las muestras de antígenos obtenidos de células del linfoma murino L-5178Y, células de timo y peritoneo se realizó por el método de Bradford (11) utilizando albúmina sérica bovina como estándar a una concentración de 1 mg/ml (Tabla 1).

Después de agregar el reactivo de Bradford (BIORAD #235), las muestras se agitaron en vortex e incubaron 5 min en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU650). Se realizó una curva de calibración a partir de la cual se calculó la concentración de cada muestra.

Tabla 1

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Muestra	H ₂ O mQ μl	Estándar BSA μl	Muestra problema μl	Reactivo Bradford μl
Blanco	800			200
Tubo 1	796	4		200
Tubo 2	792	8		200
Tubo 3	784	16		200
Tubo 4	768	32		200
Tubo 5	736	64		200
Ag. tumoral dilución 1:50	780		20	200
Ag. de células de timo dilución 1:50	780		20	200
Ag. de células de peritoneo dilución 1:20	750		50	200

3.8. Cromatografía de exclusión molecular.

El patrón proteico de las muestras de antígenos de células del linfoma murino L-5178Y, se analizó mediante el fraccionamiento del extracto crudo del lisado celular por cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-75 como se indica en las siguientes tres secciones.

3.8.1. Preparación de la matriz.

Se prepararon 20 g de Sephadex G-75 en 200 ml de buffer Tris-HCl 20 mM pH 8.0/EDTA 1 mM dejándose reposar toda la noche a 4°C (4).

3.8.2. Empaquetado de la columna.

Se agregaron aproximadamente 20 ml de buffer Tris-HCl 20 mM pH 8.0/EDTA 1 mM en una columna de 40 cm de altura x 1 cm de diámetro (Pharmacia Fine Chemical). Después se agregó la matriz lentamente por el extremo superior de la columna, permitiendo la salida del buffer por el extremo inferior, de tal manera que la matriz se fue empaquetando. A medida que el extremo superior de la columna se fue quedando vacío más matriz fue agregada hasta lograr el empaquetamiento total. Posteriormente la columna se lavó con 2 volúmenes del mismo buffer a un flujo de 1 ml/min (4).

3.8.3. Fraccionamiento de las proteínas del extracto celular del linfoma murino L-5178Y.

Se agregaron 2 ml de la mezcla de proteínas de células tumorales L-5178Y a una concentración de 3 mg/ml. La muestra fue eluida con buffer Tris-HCl 20mM pH 8.0/EDTA 1 mM a un flujo de 0.3 ml¹/min utilizando una bomba peristáltica P1 (Pharmacia Biotech). Las fracciones se colectaron automáticamente en volúmenes de 2 ml y la detección de las fracciones eluidas se llevó a cabo con un detector de luz UV a 260 nm en el colector de fracciones de una forma automatizada (Gradi Frac System Pharmacia Biotech). Las fracciones fueron documentadas en un graficador (Rec 102 Pharmacia Biotech). El contenido proteico obtenido fue desalado en una columna PD10 (Amersham Pharmacia Biotech) colocando 2.5 ml de muestra y eluyendo con 3.5 ml de H₂O. El material obtenido se concentró por liofilización (Labconco) y almacenó a -20°C hasta su uso. (4).

3.9. Análisis de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

La observación y comparación de los patrones de proteínas de las muestras de antígenos de células tumorales, timo, peritoneo y las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular, se realizó mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

3.9.1. Preparación del gel.

Se prepararon geles de 18 x 20 cm al 15% de poliacrilamida. Los vidrios para electroforesis se montaron utilizando separadores y peine de 0.5 mm además de pinzas y agarosa al 1% para sellar los lados y el borde inferior de los vidrios.

Posteriormente se preparó la mezcla del gel separador, la cual se transfirió hasta 2 cm por debajo del borde superior de los vidrios, en seguida se agregó H₂O hasta cubrir el límite superior del gel (1 cm), se espero a que el gel polimerizará aproximadamente 45 min.

Una vez polimerizado, se preparó el gel concentrador. La capa de H₂O fue retirada utilizando papel filtro y la mezcla se transfirió sobre el gel separador e inmediatamente se colocó el peine adecuado. Una vez polimerizado, se retiró el

peine y se colocó en la cámara de electroforesis (C.B.S. Scientific Co.), la cual se llenó con buffer de corrida 1X (36).

3.9.2. Preparación de la muestra:

Se prepararon las muestras de: Ag de células tumorales del linfoma murino L-5178Y, timo y peritoneo (muestras control) agregando SDS-loading buffer 1X a cada una de las muestras, se homogenizaron y calentaron en baño maría por 5 min. Después se colocaron 30 µl de cada muestra por pozo incluyendo el marcador del peso molecular MultiMark Multi-Colored Standard (Invitrogen). El corrimiento de los geles se llevó a cabo a 80 V constantes hasta que el colorante azul de bromofenol llegó a la parte inferior del gel aproximadamente 2 h (36).

3.9.3. Análisis de las proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE mediante el programa Quantity-One.

El gel se desmontó con cuidado y se cortó una de sus esquinas para ubicar el orden de las muestras. Después se colocó en el colorante azul de Comassie R-250 y se agitó en un shaker (Orbit Shaker Lab-Line No. 3590) a 100 rpm por 2-4 h o toda la noche. El gel se retiró del colorante y se colocó en solución decolorante I, se agitó a 100 rpm durante 1-2 h. En seguida se colocó en solución decolorante II y se agitó a 100 rpm durante toda la noche (36). Los geles se escanearon en el densitómetro calibrado GS-800 (Bio-Rad) y se analizaron con el programa Quantity-One.

3.10. Inmunización de ratones Balb/c con células inactivadas del linfoma murino L-5178Y.

Se obtuvo el líquido peritoneal de un grupo de ratones Balb/c, los cuales se sacrificaron por dislocación cervical 13 días después de haber sido transplantados con células del linfoma murino L-5178Y. La obtención de las células tumorales se realizó de acuerdo a la metodología indicada en la sección 3.3.1. Estas células se inactivaron con formaldehído al 1% durante 24 h.

Se formaron dos grupos de 7 ratones, el primer grupo se inmunizó con 0.2 ml conteniendo 2×10^6 células del linfoma murino L-5178Y inactivadas, mientras que el segundo grupo se inmunizó con 0.2 ml de PBS pH 7.2 estéril. La

inmunización se realizó por vía intravenosa, aplicando calor a los ratones a través de una lámpara para dilatar las venas caudales. Los ratones se inmovilizaron para realizar la inoculación utilizando un tubo *rodent restrainers* de 1 x 3.5" (Daigger Catalogo No. TX9622E) (Figura 2).

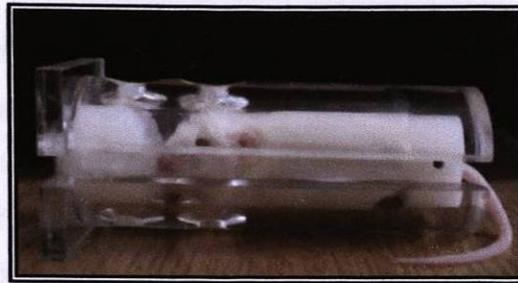


Figura 2. Inmovilización de ratones con un tubo *rodent restrainers* (Daigger). En la figura se muestra un ratón dentro del tubo rodent restrainers con únicamente el área caudal expuesta.

Se realizaron 4 inoculaciones una cada tercer día. Una semana después de la última inoculación se obtuvo sangre por punción cardiaca con una aguja de 25G X 16 (Tabla 2). La sangre obtenida se incubó a 37°C por 1 h. Posteriormente se centrifugó a 8000 rpm/1 min., para obtener el suero, el cual se almacenó a -20°C hasta su uso.

Tabla 2.

Esquema de inmunización de ratones Balb/c con células inactivadas del linfoma murino L-5178Y

Inoculaciones cada tercer día.	Células tumorales en 0.2 ml.	PBS pH 7.2 estéril.	Sangrado de ratones.
Grupo Control			
1 ^a		0.2 ml	
2 ^a		0.2 ml	
3 ^a		0.2 ml	
4 ^a		0.2 ml	Una semana después de la última inoculación
Grupo Problema			
1 ^a	2x10 ⁶ células		
2 ^a	2x10 ⁶ células		
3 ^a	2x10 ⁶ células		
4 ^a	2x10 ⁶ células		Una semana después de la última inoculación

3.11. Titulación de anticuerpos mediante la prueba de ELISA.

El antígeno tumoral del linfoma murino L-5178Y se preparó a una concentración de 6 µg en 100 µl con buffer carbonato/bicarbonato. Se agregaron 100 µl de antígeno tumoral a cada pozo en la placa de ELISA (Costar de Polivinilo de 96

pozos), se incubó a 4°C toda la noche. Se realizaron 4 lavados de 5 min con 150 µl de PBS-Tween 1X. La placa se incubó a temperatura ambiente por 1 h con 150 µl de BSA al 2% con PBS-Tween 1X, después se realizaron 4 lavados de 5 min con 150 µl de PBS-Tween 1X.

Los sueros control y problema se inactivaron a 56°C por 20 min. Posteriormente se prepararon diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000 con PBS-Tween 1X, se agregaron 100µl de la dilución correspondiente a cada pozo como se indica en la Figura 3. La placa se incubó toda la noche a 4°C, después se realizaron 4 lavados de 5 min con 150 µl de PBS-Tween 1X.

El anticuerpo secundario (IgG Anti-ratón) se preparó a una dilución 1:5000 con PBS-Tween 1X, a continuación se agregaron 100 µl a cada pozo. La placa se incubó a temperatura ambiente por 2 h en seguida se realizaron 4 lavados de 5 min con 150 µl de PBS-Tween 1X.

Se preparó el sustrato pNPP (Sigma Chem. Co. N2765), y se agregaron 100 µl a cada pozo. La placa se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente hasta que se observó un color amarillo en cada pozo. La reacción se detuvo agregando 25 µl de NaOH 1 M. La lectura se realizó en el lector de ELISA (Bio-Tek Instruments) a 405 nm y tomando como control los pozos 5A, 5B y 5C (16).

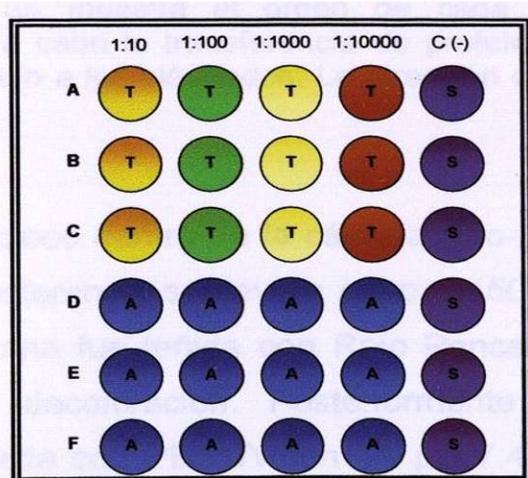


Figura 3. Distribución de la muestra control, antígeno tumoral y sustrato en la placa de ELISA. Las diluciones empleadas del suero control y problema fueron de 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000. T= Antígeno tumoral con suero problema, A= Antígeno tumoral con suero control, S= Sustrato (control negativo), orden de los pozos utilizados en la placa (A-F).

3.12. Determinación de antígenos tumorales del linfoma murino L-5178Y mediante Western blot

Se prepararon geles de 10 x 10 cm al 15% de poliacrilamida de las muestras de Ag tumoral del linfoma murino L-5178Y, timo y peritoneo (muestras control) incluyendo el marcador de peso molecular. La preparación y el corrimiento de los geles se realizó como se indica en la sección 3.8.

Se preparó el sándwich para la transferencia (Figura 4) colocando el gel, esponjas, papel filtro y la membrana de nitrocelulosa (Protran. Schleicher and Schuell Inc, ITEM No. 10402497) dentro de un recipiente con buffer de transferencia 1X.

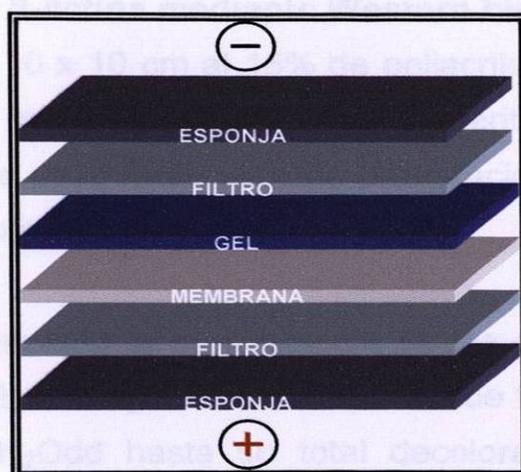


Figura 4. Ensamblaje y orientación de los elementos para la electrotransferencia. Se muestra el orden de cada uno de los elementos necesarios para llevar a cabo la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa con respecto a los electrodos. La dirección de la transferencia es del cátodo (-) al ánodo (+).

El sándwich se colocó dentro de la cámara (Bio-Rad), la cual se llenó con el mismo buffer. La transferencia se llevó a cabo a 150 V, 300 mA constantes a 4°C por 1 h. La membrana fue teñida con Rojo Ponceau, después se lavó con H₂O hasta su total decoloración. Posteriormente se bloqueó con leche descremada al 5% disuelta con PBS-Tween 1X pH 7.4 por 2 h. Se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS-Tween 1X pH 7.4.

Los anticuerpos primarios se prepararon (suero control y problema) a una dilución 1:20 con leche descremada al 2% disuelta con PBS-Tween 1X pH 7.4.

Después se agregó el anticuerpo primario correspondiente, se dejó en agitación constante a temperatura ambiente por 3 h ó toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS-Tween 1X pH 7.4.

En seguida se agregó el anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado a fosfatasa (Jackson Immuno Research Laboratorios Inc.) a una dilución 1:10 000 se dejó en agitación constante a temperatura ambiente por 2 h. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS-Tween 1X pH 7.4. Se agregó 3 ml del sustrato para fosfatasa NBT/BCIP (Sigma) y la reacción se detuvo con H₂O₂. (36).

3.13. Determinación de β -actina mediante Western blot.

Se prepararon geles de 10 x 10 cm al 15% de poliacrilamida de las muestras de Ag tumoral del linfoma murino L-5178Y, timo y peritoneo (muestras control), además del marcador de peso molecular. La preparación y el corrimiento de los geles se realizaron como se indica en la sección 3.8.

Concluido el corrimiento la transferencia de los geles se realizó como se indica en la sección 3.12. En seguida la membrana fue teñida con Rojo Ponceau, después se lavó con H₂O hasta su total decoloración. Posteriormente se bloqueó con leche descremada al 5% disuelta con PBS-Tween 1X pH 7.4 por 2 h. Se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS-Tween 1X pH 7.4.

Se preparó el anticuerpo primario o anticuerpo monoclonal contra la β -actina (Sigma) a una dilución de 1:5000 con leche descremada al 2% disuelta con PBS-Tween 1X pH 7.4, se agregó a la membrana y se dejó en agitación constante a temperatura ambiente por 1 h ó toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS-Tween 1X pH 7.4.

Después se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Amersham Biosciences. Code NA931.) a una dilución 1:10000. Se dejó en agitación constante a temperatura ambiente por 1 h. Se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS-Tween al 1X pH 7.4. Se agregó 3 ml del sustrato para

peroxidasa (Kit BM Chemiluminescence Blotting Substrate, Roche Diagnostics Corporation) y se dejó en agitación constante por un min.

La membrana se envolvió en plástico transparente y se colocó en el casete de revelado. Después el film se colocó sobre la membrana, el tiempo de exposición fue de 5 segundos. Posteriormente la membrana se colocó en solución reveladora, H₂O, solución fijadora y finalmente en H₂O por un min en cada paso. Las soluciones reveladora y fijadora se prepararon según las instrucciones del fabricante (Kodak Professional) (36,27).

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Transplante y mantenimiento del linfoma murino L-5178Y en ratones Balb/c

4.1.1. Obtención de células del linfoma murino L-5178Y.

El mantenimiento y obtención de células del linfoma L-5178Y fue cada 13-15 días, el número de trasplantes realizados fue de 20, utilizando una dosis de 5×10^6 células según el método empleado por Hernández López (21). El transplante y mantenimiento del linfoma murino L-5178Y se ha llevado a cabo empleando dosis de 5×10^6 (26), 1×10^7 (45), 2×10^6 (42). Sin embargo en estos reportes no proporcionan datos sobre el rendimiento celular obtenido de los trasplantes en ratones Balb/c y DBA/2, éste dato es de gran importancia para determinar la cantidad de antígeno tumoral que se puede extraer ya que en nuestro experimento se pretende obtener y estimar el rendimiento de antígeno tumoral a partir de células del linfoma murino L-5178Y. En la tabla 3 se muestra el promedio de células obtenidas de 5 trasplantes el cual fue de 530×10^6 células/ml.

Tabla 3.
Rendimiento celular obtenido de 5 trasplantes del linfoma murino L-5178Y.

No. de transplante	Células 10^6 /ml
1	920
2	700
3	150
4	730
5	150
Promedio	530

4.2. Obtención de antígenos de células del linfoma murino L-5178Y mediante el método de extracción con KCl.

De los 20 trasplantes realizados sólo en 5 de ellos se llevó a cabo la determinación por el método de Bradford, con el resto se realizó un pool de antígeno tumoral para emplearlo en los experimentos subsecuentes. En la tabla 4 se muestra el volumen celular, así como la cantidad y concentración de antígeno

tumoral del linfoma murino L-5178Y obtenido en cada transplante. La extracción con KCl propuesta en esta investigación es un buen método para la obtención de antígenos tumorales del linfoma murino L-5178Y ya que la concentración del antígeno tumoral del linfoma murino L-5178Y obtenido de cada transplante se mantuvo en los 500 $\mu\text{g/ml}$ esto debido a que cada cm^3 de paquete celular fue resuspendido en 9 ml de solución salina por lo que siempre se mantuvo la relación.

Cuando la cantidad de paquete celular fue mayor a 3 cm^3 se observó una fase mucosa (probablemente DNA) en cantidad considerable indicando la posible lisis celular, la cual se presentó cuando se agregó KCl en estado reactivo. Esta situación se presentó en el transplante No. 4, probablemente por que el espacio del recipiente (Wheaton 100 ml) en el cual se agitaron las células no fue suficiente para un mayor número de éstas, lo que provocó que se colisionaran contra la pared y por consecuencia ocasionara la lisis celular, por lo que es recomendable emplear un recipiente de mayor volumen cuando se utilicen más de 3 cm^3 de paquete celular.

Hasta el momento son relativamente pocos los datos reportados sobre la cantidad y concentración de antígenos tumorales o proteínas de membrana extraídas por otros métodos tales como filtración, inmunoprecipitación, detergentes como el NP-40, centrifugación diferencial, métodos salinos y cromatografía. Existe una gran variedad de métodos para el aislamiento de proteínas de la membrana plasmática pero frecuentemente no son aplicables a otro tipo de células que no sean aquellas a partir de las que fueron desarrollados. Son relativamente pocos los procedimientos publicados para la obtención de proteínas de membrana plasmática en células que contienen altos volúmenes de núcleo y citoplasma como las del linfoma murino L-5178Y.

La membrana plasmática de la línea celular L-5178Y/CA55 ha sido extraída debido a que es sensible a la L-asparaginasa pero el método empleado para ello es drástico para las células pues causa lisis total del núcleo (42). En 1980 Torrent *et al.*, describieron un procedimiento para la purificación de la membrana plasmática en forma de vesículas, a partir de células del L-5178Y, empleando un

homogenizador Elvehjem y obtuvieron de 1-3mg/ml de vesículas a partir de una suspensión celular de 30 ml a una concentración de $1-1.5 \times 10^8$ células pero no reportan el volumen final obtenido en el que se resuspendió la fracción proteica para obtener dicha concentración (42). Mientras que con el método con KCl empleando 1.5×10^8 células se obtienen 37.5 ml de proteínas periféricas de membrana a una concentración de 0.57mg/ml y una concentración final de 21.4 mg/37.5 ml

Rabinovsky y Yang en 1986 obtuvieron únicamente antígenos asociados a membrana mediante el empleo de Nonidet P-40, pues los detergentes actúan sobre los lípidos de la membrana ocasionando una disrupción de la estructura membranal (31). Los lípidos forman en general micelas mixtas con el detergente, en tanto que las proteínas hidrofóbicas se cubren con una monocapa del mismo. A diferencia de nuestros resultados, estos investigadores no mencionan el rendimiento proteico por cantidad de células utilizadas. El método con KCl propuesto en esta investigación, actúa desestabilizando las uniones no covalentes (principalmente electrostáticas) de las proteínas de membrana, haciendo que se liberen sólo las proteínas que se encuentran en la superficie de la membrana celular sin realizar cortes o formación de micelas (40) lo que facilitó la cuantificación real de antígeno libre de la membrana.

Tabla 4.

Rendimiento del antígeno tumoral de células del linfoma murino L- 5178Y por el método de extracción con KCl.

No. de transplantes	Volumen celular procesado (cm ³)	Volumen de Ag. tumoral obtenido (ml)	Concentración de Ag. tumoral (µg/ml)	Concentración total de Ag. tumoral (µg)
1	3	25	596	14900
2	1	10	542	5420
3	5	37.5	572	21450
4	6	45	200	9000
5	2	15	503.5	7552.5
Promedio		26.5	482.7	

4.3 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Los antígenos de células tumorales, timo y peritoneo se obtuvieron en una cantidad considerable mediante el método con KCl y se cuantificaron por el método de Bradford. En la tabla 5 se muestra la concentración de cada una de las muestras.

Tabla 5.
Concentración de las muestras de antígenos de células tumorales, timo y peritoneo

Muestras	Concentración (µg/ml)
Antígeno tumoral	600
Antígeno de Células de Timo	700
Antígeno de Células de Peritoneo	200

En base a estas concentraciones se determinó la cantidad de antígeno tumoral requerido para llevar a cabo su fraccionamiento (2 ml a una concentración de 3mg/ml) por cromatografía de exclusión molecular, así como la cantidad necesaria para el análisis comparativo de cada muestra en geles de poliacrilamida.

4.4 Cromatografía de exclusión molecular.

El análisis del patrón proteico de las muestras de antígenos de células del linfoma murino L-5178Y, se llevó a cabo mediante el fraccionamiento por cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-75.

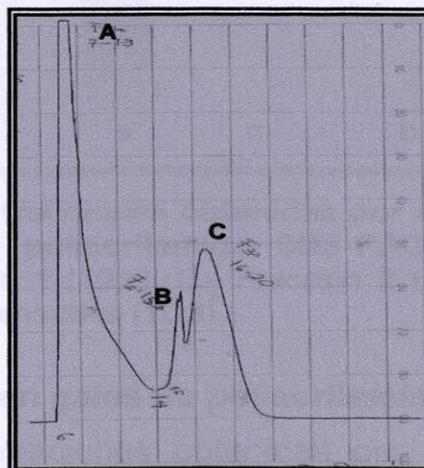


Figura 5. Cromatograma de la muestra de antígenos de células del linfoma murino L-5178Y. A.- Fracción 1, B.-Fracción 2, C.- Fracción 3

En la figura 5 se muestra el patrón obtenido, en el cual se observan tres fracciones. En la primera se esperaba encontrar las proteínas de alto peso molecular, en la segunda las de peso molecular medio y en la tercera las de bajo peso molecular.

Sin embargo, al hacer el corrimiento electroforético de las fracciones esto no se observó, ya que como se muestra en la figura 6, en la primera fracción aparece el patrón proteico de los antígenos tumorales de las células del linfoma murino L-5178Y y en las fracciones 2 y 3 se observan algunas bandas similares en peso molecular, sin embargo no se puede afirmar que se trate de las mismas proteínas ya que se obtuvieron de diferentes fracciones.

El patrón observado en el gel mostró que la separación cromatográfica sirvió únicamente para concentrar las proteínas en el pico 1 debido a que todas ellas tienen un rango molecular que la matriz G-75 (80,000-3,000 Da) no puede resolver.

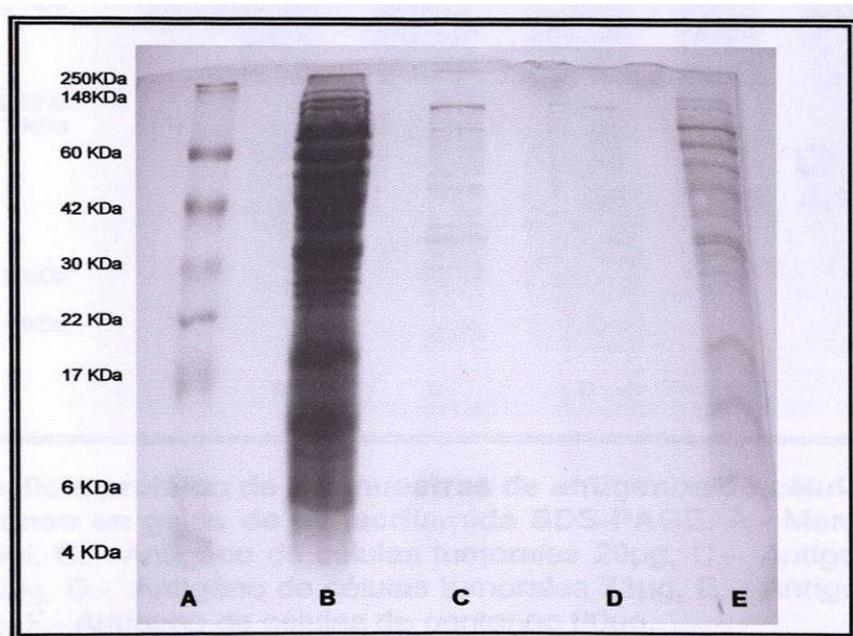


Figura 6. Análisis de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. A.- Marcador de peso molecular 8µl, B.- Fracción 1 (10µl), C.- Fracción 2 (10µl), D.- Fracción 3 (10µl), E.- Antígenos de células tumorales (10µl).

4.5 Análisis de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

De acuerdo a las concentraciones obtenidas por el método de Bradford, las muestras de los antígenos de las células tumorales, de timo y peritoneo, se

ajustaron a una concentración de 58, 58 y 60 μg respectivamente, ya que a estas concentraciones se logró una mejor resolución de las bandas de proteínas en el gel.

Las diferencias entre el patrón de proteínas de las células tumorales y el de las células de timo y peritoneo no se lograron observar claramente, debido a la complejidad de las muestras (Figura 7), por lo que los geles se sometieron a un análisis por densitometría utilizando el software Quiantity-One. El resultado mostró que el número de bandas en las muestras de antígenos de células tumorales, timo y peritoneo fue de aproximadamente 59,56 y 50 respectivamente. No se han encontrado reportes que muestren el patrón proteico membranal de esta línea celular así como su análisis por densitometría.

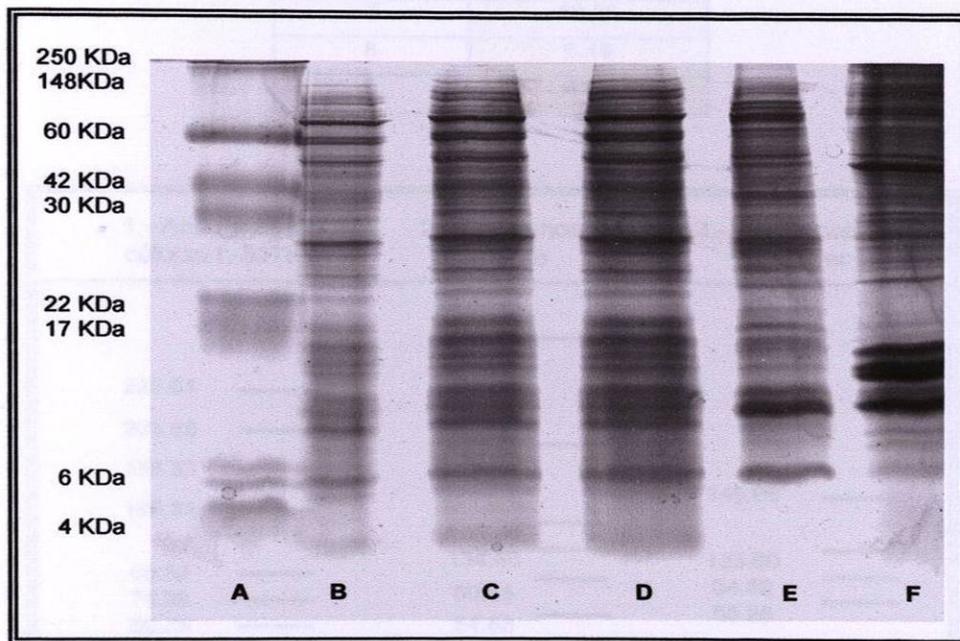


Figura 7. Análisis proteico de las muestras de antígenos de células tumorales, timo y peritoneo en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. A.- Marcador de peso molecular 20 μl , B.- Antígeno de células tumorales 29 μg , C.- Antígeno de células tumorales 58 μg , D.- Antígeno de células tumorales 73 μg , E.- Antígeno de células de timo 58 μg , F.- Antígeno de células de peritoneo 60 μg .

Los resultados del análisis de los geles de poliacrilamida, mostraron 9 bandas en la muestra del antígeno de células del linfoma murino L-5178Y no presentes en los antígenos de timo ni en los antígenos de peritoneo (Tabla 6). De las 56 bandas presentes en los antígenos de timo, 13 están ausentes en los antígenos de células del linfoma murino L-5178Y y de éstas solo 6 se encuentran en antígenos de peritoneo. De las 50 bandas presentes en antígeno de peritoneo

9 no se encuentran en los antígenos de células L-5178Y y de éstas 6 son similares a los antígenos de timo (Figura 8).

Tabla 6.

Pesos moleculares estimados de las proteínas contenidas en los antígenos de células del linfoma murino L-5178Y no presentes en antígenos de timo y peritoneo.

Antígenos de células L-5178Y	
No. de banda	Peso molecular
1	225.61
2	203.89
3	186.83
4	165.81
5	85.52
6	74.66
7	50.25
8	6.49
9	4.82

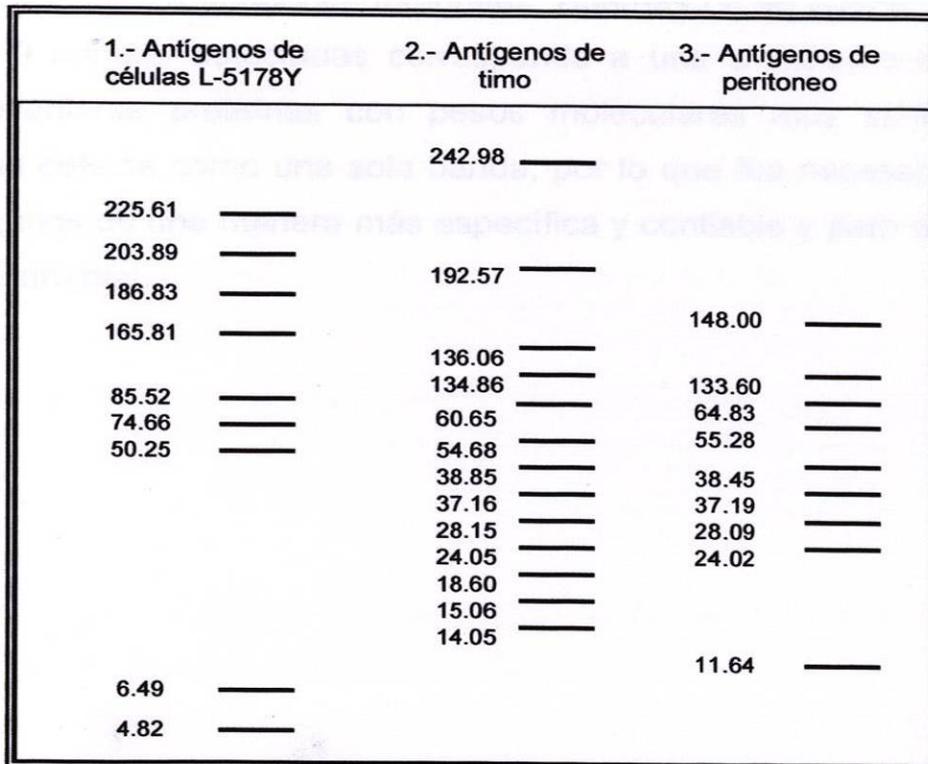


Figura 8. Esquema representativo de las proteínas diferentes encontradas en los antígenos de células del linfoma murino L-5178Y, timo y peritoneo. 1.- Proteínas presentes en los antígenos del L-5178Y, 2.- Proteínas presentes en los antígenos de células de timo, 3.- Proteínas presentes en los antígenos de peritoneo.

El porcentaje de similitud entre los antígenos de las células L-5178Y y los antígenos del timo fue de un 73%, mientras que con los antígenos de peritoneo fue de un 70%. La similitud anterior se puede entender ya que está reportado que el linfoma es un tumor de células T (timoma) por lo tanto presenta una mayor relación con el timo pues en éste los linfocitos T se encuentran en un 97% (22). Este tumor por lo general se origina en ganglios linfáticos pero en ocasiones aparece en otros tejidos linfoides como el peritoneo, sitio donde se estableció el linfoma y por lo tanto de donde se obtuvieron las células que se emplearon para esta investigación. La relación entre los antígenos de las células del L-5178Y y los de peritoneo es más baja que en la de timo debido a que en éste el porcentaje de linfocitos T es mucho menor que en el timo (22).

Por otra parte las diferencias entre las bandas de cada muestra se obtuvieron en base al peso molecular aproximado por lo que no se puede afirmar que todas o algunas de las proteínas encontradas únicamente en la muestra de interés corresponden a antígenos tumorales. Además no se puede saber si cada una de las 9 bandas detectadas corresponde a una o varias proteínas, pues pueden presentarse proteínas con pesos moleculares muy similares que la electroforesis detecte como una sola banda, por lo que fue necesario determinar dichos antígenos de una manera más específica y confiable y para ello se decidió realizar Western blot.

4.6 Titulación de anticuerpos mediante la prueba de ELISA.

Para llevar a cabo el Western blot se inmunizó un grupo de 7 ratones con células del linfoma murino L-5178Y inactivadas y una semana después de la última inmunización se obtuvieron 4 ml de suero (problema). De la misma forma y cantidad se obtuvo el suero de ratones sin inmunizar (control). La titulación de anticuerpos presentes en el suero problema se llevó a cabo mediante el inmunoensayo ELISA. Los resultados indicaron que las células tumorales inactivadas estimularon de manera adecuada la producción de anticuerpos. Además se logró determinar el rango de dilución del suero para ser empleado en el Western blot, el cual fue de 1:10 y 1:100 (Figura 9).

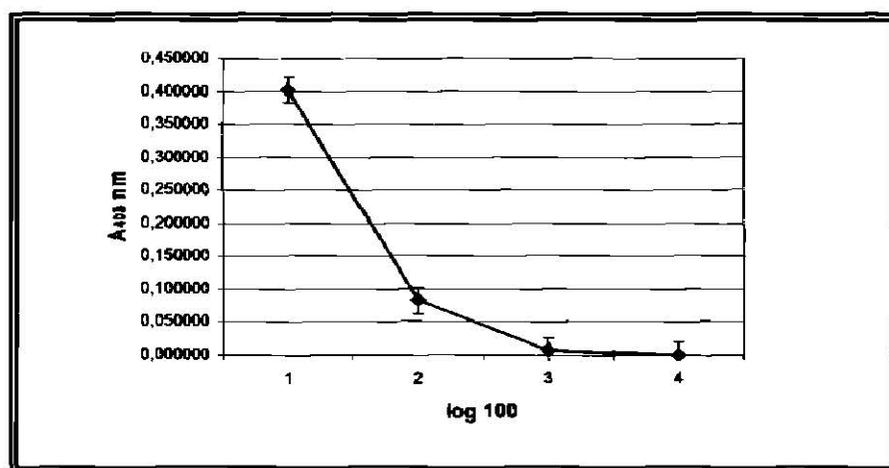


Figura 9. Titulación de anticuerpos mediante la prueba de ELISA. En el eje de las X se graficó diferentes diluciones del suero de ratones inmunizados con células inactivadas del Linfoma L-5178Y. En el eje de las Y se graficó la absorbancia a 405 nm

4.7 Determinación de antígenos tumorales del linfoma murino L-5178Y mediante Western blot

Para confirmar la presencia de los antígenos tumorales del linfoma L-5178Y de una manera específica, se realizaron Western blot de las muestras tanto de antígenos de células tumorales como de timo y peritoneo empleando como anticuerpo primario suero problema y suero control. Con el primero se observó un patrón de siete bandas en la muestra de los antígenos del L-5178Y (Figura 10) el cual no se aprecia en la membrana con suero control (Figura 11).

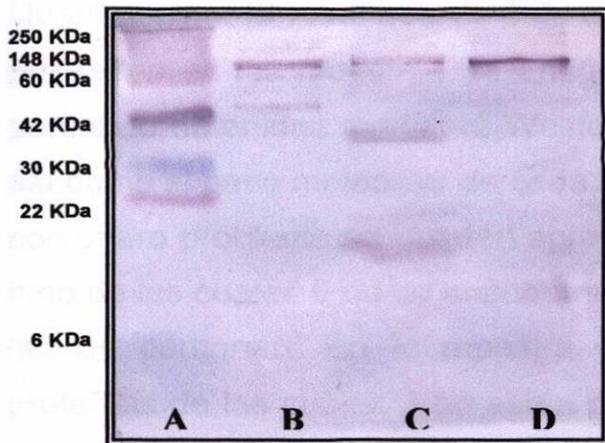


Figura 10. Determinación de antígenos tumorales del linfoma murino L-5178Y mediante Western blot con suero problema (obtenido de ratones Balb/c con el linfoma L-5178Y). A.- Marcador de peso molecular 8µl, B.- Antígeno de células tumorales 9µg, C.- Antígeno de células de timo 9µg, D.- Antígeno de células de peritoneo 9µg.

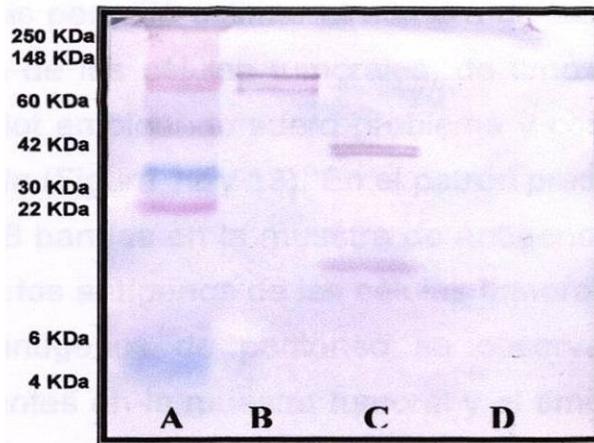


Figura 11. Determinación de antígenos tumorales del linfoma murino L-5178Y mediante Western blot con suero control (obtenido de ratones Balb/c sanos). A.- Marcador de peso molecular 8µl, B.- Antígeno de células tumorales 9µg, C.- Antígeno de células de timo 9µg, D.- Antígeno de células de peritoneo 9µg.

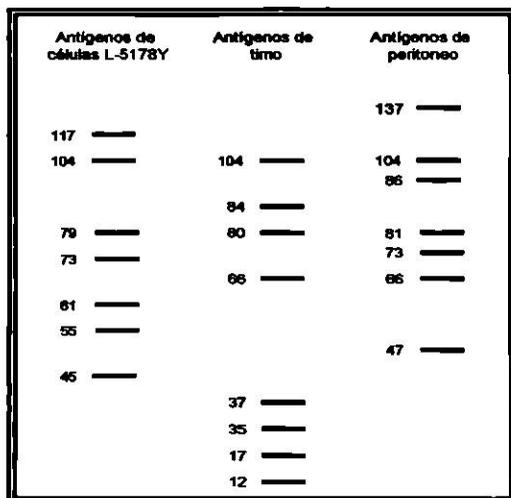


Figura 12. Esquema de las proteínas detectadas mediante Western blot con suero problema. La figura presenta las proteínas detectadas con suero problema en las muestras de los antígenos de células L-5178Y, timo y peritoneo, así como los pesos moleculares aproximados. En color rojo se señalan las proteínas de interés.

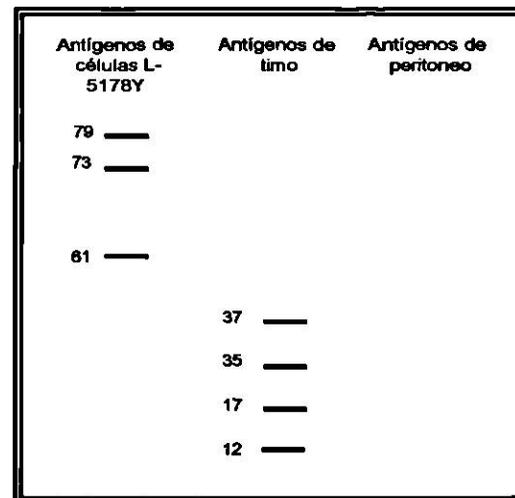


Figura 13. Esquema de las proteínas detectadas mediante Western blot con suero control. La figura presenta las proteínas detectadas con suero control en las muestras de los antígenos de células L-5178Y, timo y peritoneo, así como los pesos moleculares aproximados.

Las membranas se analizaron en el densitómetro empleando el software Quantity-One. El resultado de éste análisis permitió estimar el número de bandas presentes en las muestras de antígenos de las células tumorales, de timo y de peritoneo obtenidas mediante Western blot empleando suero problema y control, así como el peso molecular de cada banda (Figura 12 y 13). En el patrón presente con suero problema se pueden apreciar 8 bandas en la muestra de antígenos de timo de las cuales 5 no se encuentran en los antígenos de las células tumorales y las de peritoneo. En la muestra de antígenos de peritoneo se observan 7 proteínas de las cuales 3 no están presentes en la muestra tumoral y el timo. La muestra de antígenos de células del linfoma murino L-5178Y presentó 7 bandas de las cuales 4 de aproximadamente 117, 61, 55 y 45 KDa no se encuentran en el timo y el peritoneo. Mientras que en la membrana con suero control (Figura 13) se observaron solo 3 proteínas de peso molecular de 79, 73 y 61 KDa presentes en la muestra de los antígenos tumorales. En la muestra de antígenos de timo se observaron 4 proteínas de peso molecular de 37, 35, 17 y 12 KDa aproximadamente. En los antígenos de peritoneo no se observó ninguna banda.

En la membrana con suero problema y control no se esperaba una reacción con las muestras de antígenos de timo y de peritoneo ya que el suero problema solo debía presentar anticuerpos contra los antígenos presentes en la membrana de las células tumorales, pues la inmunización fue con estas células. En el caso del suero control tampoco debió presentarse reacción pues este anticuerpo se obtuvo de ratones singénicos sanos que jamás estuvieron expuestos a las células del tumor L-5178Y. Sin embargo no ocurrió así y puede deberse a que en el Western blot se emplearon anticuerpos policlonales (14,18) los cuales pueden causar reacciones inespecíficas con otros antígenos no relacionados con el utilizado en la inmunización. Por otra parte posiblemente los ratones Balb/c presenten anticuerpos producidos contra antígenos que dan reacción cruzada por alguna similitud a los de las células del linfoma L-5178Y como ocurre con los pacientes con cáncer de mama que presentan anticuerpos que reaccionan contra la proteína gp 120 del VIH. Esto es por la presencia de un retrovirus endógeno en los pacientes con cáncer de mama (14,18).

Debido a lo anterior las proteínas de la muestra de antígenos de las células L-5178Y presentes en la membrana con suero control, se descartaron quedando solo tres proteínas de aproximadamente 117, 55 y 45 KDa (Figura 12). Estas 3 bandas se encontraron en la muestra de antígenos de células tumorales y no en los antígenos de timo ni peritoneo empleando suero problema y estuvieron ausentes en la membrana con suero control. Lo que sugiere fuertemente que estas son las proteínas de interés ya que podrían ser antígenos tumorales de membrana asociados al linfoma L-5178Y. Estas proteínas son diferentes a los antígenos reportados por Weinhold *et al.*, en 1982 de pesos moleculares de 71, 85 y 135 KDa generados en la fase de latencia del tumor por ello la diferencia, ya que los probables antígenos encontrados en esta investigación corresponden a las células del L-5178Y que se encontraban formando el tumor ascítico (44).

Rabinovsky-Yang en 1986., identificaron un antígeno asociado al L-5178Y con peso molecular de 64 KDa, una proteína asociada a membrana diferente a las encontradas en este proyecto ya que estos investigadores utilizaron el detergente NP-40 y metodología diferente para la obtención de proteínas de membrana (31).

La línea L-5178Y también se ha tratado con mutágenos logrando la expresión e identificación de nuevos antígenos muchos de los cuales no se presentan en las células tumorales originales, como el antígeno de 80 KDa identificado por Grohmann *et al.*, en 1990 al tratar la L-5178Y con derivados del triazeno (20).

4.8 Determinación de β -actina mediante Western blot

La β -actina es la principal isoforma de las actinas citoplasmáticas, tomando en cuenta esto se decidió utilizar la presencia de esta actina como marcador de proteínas de membrana intracelular y citoplasmática en la muestra de antígenos tumorales del linfoma L-5178Y para comprobar que los antígenos tumorales obtenidos corresponden a proteínas de membrana descartando con ello que el método con KCl propuesto pueda presentar contaminación con otras proteínas evitando de esta manera que al utilizar antígenos tumorales obtenidos a partir de éste método como vacunas se presenten reacciones no deseadas. En la figura 14 se observó una reacción positiva en los carriles A, C y D ya que en éstos se

colocó una muestra con proteínas de citoplasma. Mientras que en el carril B, el cual corresponde a la muestra de antígenos de células tumorales, no se observó la presencia de β -actina; por lo tanto las proteínas de ésta muestra no pertenecen a citoplasma sino a membrana plasmática.

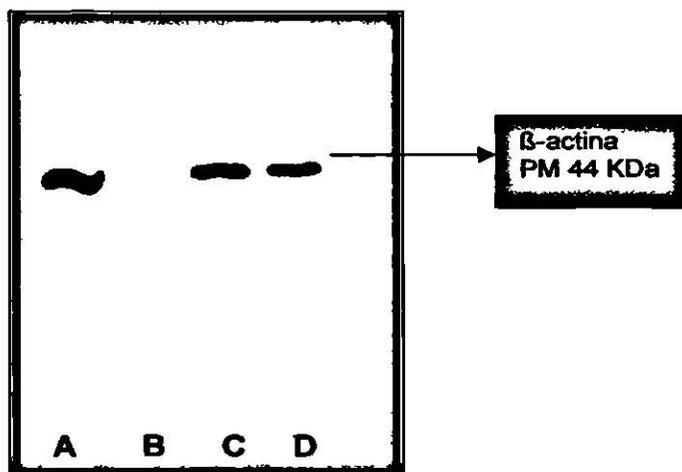


Figura 14. Determinación de β -actina mediante Western blot con anticuerpos monoclonales. A, C, D.- Controles positivos para β -actina, B.- Muestra de antígenos de células del linfoma L-5178Y.

Capítulo 5.

CONCLUSIONES

- 1.- El método con KCl propuesto en esta investigación permite la obtención de antígenos tumorales situados en la membrana celular del linfoma murino L-5178Y.
- 2.- El método para extracción de proteínas con KCl permite un alto rendimiento en la obtención de antígenos tumorales presentes en la membrana celular.
- 3.- Se logró obtener el patrón proteico membranal de la línea L-5178Y, mediante geles de poliacrilamida SDS-PAGE y mediante el análisis con el programa Quantity-One se obtuvieron los pesos moleculares aproximados de cada una de las proteínas que conforman la muestra de antígenos tanto de las células del linfoma murino L-5178Y, como de timo y de peritoneo.
- 4.- Se determinó el porcentaje de similitud entre las muestras de antígenos tumorales con las muestras de antígenos de timo (73%) y de peritoneo (70%) encontrando una gran similitud entre ellas, así como 9 proteínas presentes solo en antígenos de células del linfoma murino L-5178Y.
- 5.- Mediante el Western blot se lograron detectar tres proteínas de membrana de aproximadamente 117, 55 y 45 KDa presentes en las células del linfoma murino L-5178Y, las cuales podrían corresponder a antígenos tumorales. Éstas no se encontraron en los antígenos de timo ni en los de peritoneo.
- 6.- Se presentó reacción cruzada con ciertas proteínas de las muestras de los antígenos de células de timo y peritoneo empleando suero problema y suero control.
- 7.- Mediante la determinación de β -actina se comprobó que al emplear el método de extracción con KCl se obtienen solo proteínas de membrana y por lo tanto no presenta riesgos de contaminación con otros organelos celulares.

Capítulo 6.

PERSPECTIVAS

1.- Emplear geles bidimensionales para determinar la presencia de una o más proteínas presentes en una banda.

2.- Realizar ensayos *in vitro* e *in vivo* para evaluar la inmunogenicidad de las tres proteínas periféricas de membrana de aproximadamente 117, 55 y 45 KDa del linfoma murino L-5178Y mediante:

- Pruebas dérmicas al antígeno autólogo a las 24, 48 y 72 horas,
- Enumeración de linfocitos T específicos por el método de rosetas,
- Estimulación específica mediante la incorporación de Timidina tritiada o MTT.
- Regresión tumoral a partir de la aplicación del antígeno tumoral autólogo vía intratumoral en ratones Balb/c.

APENDICE

Soluciones para el trasplante y mantenimiento del linfoma murino L-5178Y en ratones Balb/c.

Etanol al 70% (1 L)

Etanol Absoluto	700 ml
H ₂ Odd	300 ml

PBS pH 7.2

NaCl	8.0 g
KCl	0.20 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
NaH ₂ PO ₄	0.20 g

Aforar a 1 L con H₂Odd

Soluciones para extracción de antígenos tumorales mediante KCl

EDTA 0.5 M pH 8.0

EDTA	7.4 g
H ₂ Odd	20 ml

Agregar perlitas de NaOH para disolver el EDTA. Ajustar el pH a 8.0 y aforar a 40 ml con H₂Odd

Solución de Alsever

Glucosa	20.5 g
Citrato de Sodio	8.0 g
Ácido Cítrico	0.55 g
NaCl	4.20 g
H ₂ Odd	1 L

Esterilizar en Autoclave a 110°C x 10 min.

Solución de lisis

NH ₄ Cl	0.829 g
--------------------	---------

NaHCO ₃	0.084 g
Dietilenglicol al 4%	4 ml
EDTA 0.5 M pH 8.0	20 µl

Aforar a 100 ml con H₂Odd

Solución de sucrosa al 50%

Sucrosa	200 g
H ₂ Odd estéril	400 ml

Soluciones para cromatografía de exclusión molecular

Buffer Tris-HCl 1 M pH 8.0

Tris-HCl	31.52 g
H ₂ Odd	100 ml

Ajustar el pH a 8.0 y aforar a 200 ml con H₂Odd

Buffer Tris-HCl 20 mM pH 8.0 (1 L)

Tris-HCl 1 M	20 ml
H ₂ Odd	980 ml

Sephadex G-75

Sephadex G-75	5.0 g
Buffer Tris-HCl 20 mM pH 8.0 con EDTA 1 mM	200 ml

Tris-HCl 20mM pH 8.0/EDTA 1 mM

EDTA 500 mM	1.8 ml
Tris-HCl 20 mM pH 8.0	900 ml

Soluciones para la inmunización de ratones Balb/c con células inactivadas del linfoma murino L-5178Y

Formaldehído al 1%

Formaldehído	1 ml
H ₂ O	100 ml

Soluciones para la preparación de geles de poliacrilamida SDS-PAGE

Acrilamida/bisacrilamida 30%

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	1g

Aforar a 100 ml con H₂O

Azul de Comassie

Azul brillante de Comassie R-250	0.25 g
Metanol	45 ml
H ₂ O	45 ml
Ácido Acético	10 ml

Buffer de corrida 1X

Buffer de Corrida 5X	20 ml
H ₂ O	80 ml

Buffer de muestra 1X

SDS 2%	2 g
β-mercaptoetanol 5%	*
Glicerol 10%	10 ml
Azul de Bromofenol 0.002%	0.002 g
Tris-HCl 0.0625 M pH 6.8	85 ml

*Por cada 950 µl de Buffer de muestra 1X añadir 50µl de β-mercaptoetanol

Buffer Tris-Base 0.5 M pH 6.8

Tris-Base 6.0 g

H₂Odd 80 ml

Ajustar el pH a 6.8 y Aforar a 100 ml con H₂Odd

Buffer Tris-Base 1.5 M pH 8.8

Tris-Base 18.2 g

H₂Odd 80 ml

Ajustar el pH a 8.8 y Aforar a 100 ml con H₂Odd

Buffer Tris-Glicina 5X

Tris-Base 15.1 g

Glicina 94 g

SDS al 10 % 50 ml

Ajustar el pH 8.3 ± 0.2 y aforar a 1 L con H₂Odd.

PSA 10%

PSA 1 g

H₂Odd 10 ml

SDS 10%

SDS 10 g

Aforar a 100 ml con H₂Odd

Solución decolorante I

Metanol 400 ml

Ácido Acético 70ml

Aforar a 1 L con H₂Odd

Solución decolorante II

Metanol 50 ml

Ácido Acético 70 ml

Aforar a 1 L con H₂Odd

Solución para gel concentrador de poliacrilamida

H ₂ O dd	1.4 ml
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	0.33 ml
Tris 0.5 M pH 6.8	0.25 ml
SDS 10%	0.02 ml
PSA 10%	0.02 ml
TEMED	0.002 ml

Solución para gel separador al 15% de poliacrilamida.

H ₂ O dd	1.2 ml
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	2.5 ml
Tris 1.5 M pH 8.8	1.3 ml
SDS 10%	0.05 ml
PSA 10%	0.05 ml
TEMED	0.002 ml

Soluciones para la titulación de anticuerpos mediante ELISA**Albúmina concentración 1mg/ml**

BSA	10 mg
H ₂ O dd	10 ml

Albúmina (BSA) dilución 1:20

BSA (1 mg/ml)	100 µl
Buffer de carbonato/bicarbonato	1.9 ml

Anticuerpo secundario (IgG anti-ratón) dilución 1:5000

IgG anti-ratón	1 µl
PBS Tween 1 X	5 ml

Buffer de carbonato/bicarbonato pH 9.6

NaHCO ₃	0.293 g
Na ₂ CO ₃	0.15 g

H₂Odd 90 ml

Ajustar el pH 9.6 y aforar a 100 ml

Buffer de sustrato

Dietanolamina 97 ml

H₂Odd 800 ml

Ajustar el pH a 9.8 y aforar a 1 L con H₂Odd

Hidróxido de sodio 1 M

Hidróxido de Sodio 2 g

H₂Odd 50 ml

PBS 0.15 M pH 7.2 (solución salina buferada de fosfatos)

NaCl 8 g

KCl 0.2 g

Na₂HPO₄ 1.15 g

KH₂PO₄ 0.2g

Ajustar el pH a 7.2 y aforar a 1 L con H₂Odd

Solución de lavado

PBS 1 L

Tween 20 0.5 ml

Sustrato pNPP

pNPP 1 pastilla

Buffer de sustrato 5 ml

Soluciones para la determinación de antígenos tumorales y β-actina mediante Western blot

Anticuerpo primario (suero problema y control) dilución 1:20

Leche descremada al 2% 9.5 ml

Suero inactivado 500 µl

Anticuerpo primario β -actina dilución 1:5000

Leche descremada al 2%	9.998 ml
Anticuerpo β -actina	2 μ l

Anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina dilución 1:5000

Leche descremada al 2%	9.998 ml
Anti IgG conjugado a fosfatasa	2 μ l

Anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa dilución 1:10000

Leche descremada al 2%	9.999 ml
Anti IgG conjugado a peroxidasa	1 μ l

Buffer de transferencia al 1X

Tris-Base 25 mM pH 8.3	3 g
Glicina 192 mM	14.4 g
Metanol 20%	200 ml
SDS 0.025%-0.1%	0.25 g

Aforar a 1 L con H₂O

Leche descremada al 2%

Leche descremada	2 g
PBS-Tween 1X pH 7.4	100ml

Leche descremada al 5%

Leche descremada	5 g
PBS-Tween 1X pH 7.4	100 ml

PBS 10X (solución stock)

NaCl	80 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g

Ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1 L con H₂O

PBS-Tween 1X pH 7.4 (Solución de lavado)

PBS 1X pH 7.4	100 ml
Tween 20 al 0.05%	50 μ l

Aforar a 1 L con H₂Odd.

Rojo de Ponceau-S (solución de trabajo)

Rojo de Ponceau-S stock	10 ml
H ₂ Odd	90 ml

Rojo de Ponceau-S (solución stock)

Rojo de Ponceau-S	2 g
Ácido tricloroacético	30 g
Ácido sulfosalicílico	30 g

Aforar a 100 ml con H₂Odd

LITERATURA CITADA

1. **Abbas AK, Lichtman AH y Pober JS.** 1997. Inmunología celular y molecular. Editorial Interamericana McGraw-Hill. Pp. 426-453.
2. **Alexander P y Mikulski B.** 1961. Mouse lymphoma cells with different radiosensitivities. *Nature*. 192:572-573.
3. **American Cancer Society, Inc.** 2002. The history of cancer. Disponible en el sitio de red: www.cancer.org.
4. **Amersham Pharmacia Biotech.** 2001. The Recombinant protein Handbook. Protein amplification and simple purification, vol. 18-1142-75.
5. **Arango PM y González SA.** 2002. Vacunas terapéuticas en cáncer. Ensayos clínicos actuales. *Rev cubana med.* vol.41, no.6. Pp. 1-7.
6. **Awwad M y North RJ.** 1988. Immunologically mediated regression of a murine lymphoma after treatment with anti-L3T4 antibody. *J. Exp. Med.* 168:2193 - 2206.
7. **Batista Duharte A.** 2003. Función del sistema inmune en la defensa contra tumores malignos. *Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED).MEDISAN7(2):75-88.* Disponible en el sitio de red: http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol7_2_03/san11203.htm.
8. **Beer JZ, Jacobson ED, Evans HH, Szumiel I.** 1984. X-ray and UV mutagenesis in two L-5178Y cell strains differing in tumorigenicity, radiosensitivity, and DNA repair. *Br J Cancer Suppl.* 6:107-11.
9. **Bertram JS.** 2001. The molecular biology of cancer. *Molecular aspects of medicine* 21:167-223.
10. **Beverly TA.** 2002. Tumor models in cancer research. Humana Press. Totowa, New Jersey Pp. 3-17, 23-69.
11. **Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72:248-254.
12. **Campoy JA.** 2004. Cáncer ¿Qué es y qué lo causa? (XVIII). El tratamiento del cáncer mediante vacunas elaboradas con antígenos de la orina. *Discovery Salud*, vol 57.

13. **Capistrán Alvarado S.** 2001. Uroterapia. Instituto Médico-Fundación. Disponible en el sitio de red: www.geocities.com/capistran2001/salvador.htm.
14. **Cruz SO; Perez GM; Izquierdo MM.** 1996. Evaluación de un sistema de Western blot (DAVIH- blot) para la confirmación de anticuerpos al VIH-1. *Revista Cubana Med. Trop.* 49(1): 28-31
15. **Daneri NA, Del toro AA; García VJ.** 1995. L-5178Y Lymphoma associated immunosuppression in Balb/c mice. *Biomed Pharmacother.* 49:39-44.
16. **Engvall E y Perlman P.** 1971. Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA). quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 9:971-4.
17. **Ferriols LF, Ferriols LR, and Colomina RJ.** 1997. Inmunoterapia tumoral. *Vacunas y Terapia Génica. Farm Hosp* 21(3):166-170.
18. **Garavito RE, Rojas A, Méndez PP, Iglesias GA.** 2002. Tolerancia inmunológica ¿Porqué convivimos com nuestros tejidos?. *Revista Colombiana de Reumatología*, vol 9. No.2.
19. **Greenfield R.** 1999. New approaches for treating cancer. *Drug and market development.* Pp.150 - 159.
20. **Grohmann U; Ullrich SJ; Mage MG; Appella E; Fioretti MC; Puccetti P; Romani L.** 1990. Identification and immunogenic properties of an 80 kDa surface antigen on a drug-treated tumor variant:relationship to MuLV gp70. *Eur. J. Immunol.* 20(3): 629-636.
21. **Hernández-López LS.** 1998. Efecto de una proteína de 20 KDa denominada oncotoxina sobre el crecimiento de un linfoma murino subcutáneo L-5178Y. Universidad Autónoma de Nuevo León., Monterrey, N. L. México.
22. **Hudson L y Hay FC.** 1980. *Practical Immunology.* Blackwell Scientific Publications. 2ª Edition. Pp 21-26, 348.
23. **Iáñez PE.** 1999. Procesamiento y presentación de antígenos. Curso de Inmunología general. Universidad de Granada España. Disponible en el sitio de red: http://fai.unne.edu.ar/biologia/inmunologia/inmunoienez/cap_09.htm.
24. **Lillehei KO, Liu Y y Kong Q.** 1999. The annals of toracic surgery. Current perspectives in immunotherapy. 68:528 - 533.

25. **López BM.**1996. Mito y realidad de las vacunas contra el cáncer. Mundinteractivos, S.A. Madrid España. Disponible en el sitio de red: www.elmundo.es/salud/1996/186/01188.html.
26. **Marsilli MA, Robinson MK, Truitt GA y Wheelock EF.** 1983. Elimination of L-5178Y cells from tumor-dormant DBA/2 mice by specific active immunotherapy. *Cancer Res.* 43:15-21.
27. **Millipore.** 2005. Protein Blotting Handbook. Fifth Edition. Pp. 10-56 , U.S.A.
28. **Mosmann TR, Cherwiniski H, Bond MW, Giedlin MA y Coffman RL.** 1986. Two types of murine helper T cell clone: definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The journal of immunology* 136:2348 - 2357.
29. **OMS.** 2004. Incidencia Mundial del Cáncer. Disponible en el sitio de red: www.who.int/mediacentre/releases/2003/pr27/es/index.html.
30. **Osanto S.** 1997. Vaccine trials for the clinician: Prospects for tumor antigens. *The oncologist* 2:284-299.
31. **Rabinovsky ED y Yang TJ.** 1986. Effects of horse and fetal calf serum on the expression of tumor-associated antigen and tumorigenicity of L5178Y leukemia/lymphoma cells. *Leuk Res.* 10(11):1331-1340.
32. **Ramírez AJ.** 2002. Inmunopatología de los tumores. Universidad del País Vasco España. Pp 35-44. Disponible en el sitio de red: www.drscope.com/privados/pac/generales/inmunopatologia/tumores.htm.
33. **Ramírez FA.** 2004. Efecto del inmunomodulador T-activina sobre la respuesta inmune celular de ratones inmunosuprimidos con el linfoma L-5178Y. Universidad de Colima, Colima.
34. **Ramos DM, Gómez EH, Hernández DJ, Tapia AL y Feria VA.** 1980. Ubicación de los antígenos tumorales en las células del linfoma murino L5178Y. *Arch. Invest. Méd.* 11(3):425 - 434.
35. **Salazar OF.** 2000. El sistema inmune, herramienta estratégica en la batalla contra el cáncer. *Rev. chil. pediatr.* 71(4):296-306.
36. **Sambrook J y Russell DW.** 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition ed, vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press., New York.

- 37. Segovia AJ y Mora TF.** 2000. Constitución genética y factores ambientales en medicina, Serie Científica Madrid, Madrid, España.
- 38. Siboo R, Gill P y Burke B.** 1977. Characterization of L5178Y leukemic cells by phagocytosis, cytochemical methods, and membrane marker techniques. *Cancer Res.* 37(10):3607 - 11.
- 39. SSA.** 2001. Compendio de cáncer/RHNM/2001/Morbilidad/Mortalidad, Dirección General de Epidemiología, México. Disponible en el sitio de red: www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/rhnm-01/rhnm-01.htm.
- 40. Thomas TC y McNamee MG.** 1990. Purification of membrane proteins. *Methods in enzymology.* 182:499-525.
- 41. Torrella A y Noris GE.** 2004. Vacunas en melanoma. *Oncología* 27(3):108-113.
- 42. Torrent QM, Rivera FM y Grau OM.** 1981. Murine leukemic lymphoblasts: Homogenization and fractionation procedures for plasma membrane vesicles isolation. *Analytical Biochemistry.* 114:228-234.
- 43. Trainer DL y Wheelock EF.** 1984. Characterization of L5178Y cell phenotypes isolated during progression of the tumor-dormant state in DBA2 mice. *Cancer Res.* 44:2897 - 2906.
- 44. Weinhold KJ y Wheelock EF.** 1982. Cross-reacting antigens on L5178Y cells which serve as targets for cytotoxic T-lymphocyte lysis during establishment of the tumor dormant state. *Cancer Res.* 42 (9): 3607-3616.
- 45. Weinhold KJ, Goldstein LT y Wheelock EF.** 1979. The tumor dormant state. Quantitation of L5178Y cells and host immune responses during the establishment and course of dormancy in syngeneic DBA/2 mice. *J. Exp. Med.* 149:732 - 744.
- 46. Yamagiwa K y Ichikawa K.** 1918. Experimental study of the pathogenesis of carcinoma. *Cancer Res.* 3:1-29.

