

ESTUDIO DE LAS GLICOPROTEINAS DEL SISTEMA MAYOR DE
HISTOCOMPATIBILIDAD EN UNA LINEA TUMORAL HUMANA (MSM).
REGULACION POR AGENTES BIOLÓGICOS Y FARMACOLÓGICOS.

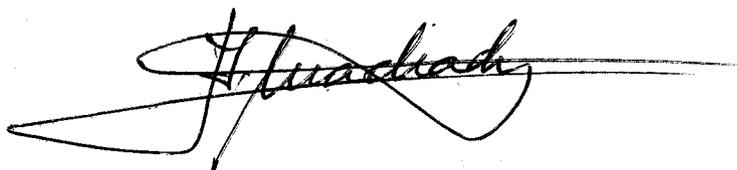
Maria Teresa Morales Suarez-Varela

Don ALBERTO MACHADO DE LA QUINTANA, Catedrático de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, como PONENTE de la Tesina: "ESTUDIO DE LAS GLICOPROTEINAS DEL SISTEMA MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN UNA LINEA TUMORAL HUMANA (MSM). REGULACION POR AGENTES BIOLÓGICOS Y FARMACOLÓGICOS", presentada por Doña MARIA TERESA MORALES SUAREZ-VARELA.

CERTIFICA::

Que esta Tesina reúne las condiciones necesarias para ser defendida ante el Tribunal que designe la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 2 de Setiembre de 1.986.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Machado', with a long horizontal flourish extending to the right.

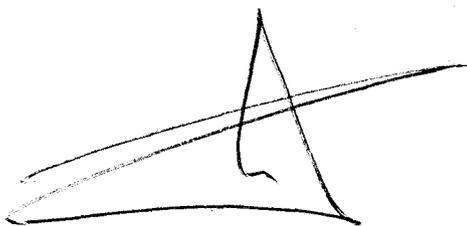
Fdo.: Don Alberto Machado de la Quintana.

Don JOSE PEÑA MARTINEZ, Catedratico Numerario de Bioquímica de la Facultad de Medicina de Córdoba y Doña CORONA ALONSO DIAZ, Profesora Contratada del mismo Departamento.

CERTIFICAN:

Que Doña MARIA TERESA MORALES SUAREZ-VARELA ha realizado bajo su dirección el presente trabajo, titulado: "ESTUDIO DE LAS GLICOPROTEINAS DEL SISTEMA MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN UNA LINEA TUMORAL HUMANA (MSM). REGULACION POR AGENTES BIOLÓGICOS Y FARMACOLÓGICOS", considerando que como Tesina reúne las condiciones necesarias para obtener el Grado de Licenciado.

Y para que así conste expiden el Certificado en Córdoba a día 2 de Setiembre de 1.986.



Fdo.: Don Jose Peña Martinez.



Fdo.: Doña Corona Alonso Diaz.

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor D. Jose Peña Martinez, por brindarme la oportunidad de introducirme en el campo de la Inmunologia Moderna y de trabajar bajo su direccion.

A la Dra. Corona Alonso Diaz, bajo cuya direccion en este ultimo año he llegado a realizar este trabajo.

Al Profesor D. Alberto Machado de la Quintana, por su apoyo en el desarrollo de esta tesina.

Al Dr. Rafael Solana Lara, por su ayuda prestada.

A D. Juan Carlos Morales Suarez-Varela, por su asesoramiento en informatica; y a D. Jose de Luque Villalba, por su colaboracion en la transcripcion del trabajo.

En general, a todos los miembros del Dpto. de Bioquimica de la Facultad de Medicina de Cordoba.

I N D I C E

-INTRODUCCION:

-CONSIDERACIONES GENERALES A CERCA DE LAS
NEOPLASIAS2

-COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD:

-Estructura Bioquimica de las Moléculas
Clase I12

-Localización de las Moléculas Clase I13

-Función de las Moléculas Clase I15

-Estructura Bioquimica de las Moléculas
Clase II16

-Localización de las Moléculas Clase II18

-Función de las Moléculas Clase II19

-OBJETIVOS26

-MATERIAL Y METODOS:

-MATERIAL:

-Material Biológico28

-Reactivos y Productos Químicos y Biológicos ...32

-Material de Vidrio, Plástico y otros34

-Aparataje35

-METODOS:

-Obtencion de la Linea Tumoral36
-Tiempo de Doblaje39
-Test de Exclusion del Tripan Azul39
-Tecnica de Inmunofluorescencia Indirecta con
Anticuerpos Monoclonales40
-Protocolo de Inducciones42
-Metodo de Congelacion43

-RESULTADOS:

-Establecimiento de la Linea Tumoral45
-Analisis Morfologico46
-Adherencia Celular46
-Efecto de la Congelacion sobre la Viabilidad
Celular47
-Estudio de la Capacidad Proliferativa47
-Efecto de la Congelacion sobre la Proliferacion
Celular47
-Estudio de la Expresion de las Moleculas Clase I
y Clase II48

-DISCUSION63
-CONCLUSIONES79
-BIBLIOGRAFIA82

I N T R O D U C C I O N

CONSIDERACIONES GENERALES A CERCA DE LAS NEOPLASIAS.

Los ultimos datos facilitadas por el Boletin de la Organizacion Mundial de la Salud, correspondiente a Mayo de 1.984, hablan de 4'3 millones de muertes de personas al año debidas principalmente a los 12 tipos mas importantes de cancer, de los que 2'3 millones pertenecen a los paises subdesarrollados.

La característica fundamental de la célula cancerosa es la pérdida de la capacidad de controlar su crecimiento y división. Las células malignas se dividen cuando y donde no deberían hacerlo, siendo el resultado de su proliferación desorganizada la formación de un tumor.

Si bien las causas de la enfermedad pueden ser amplias y diversas, todas ellas actúan sobre un sustrato genético común dentro de la célula. Existen dos hipótesis de trabajo principales que tratan de explicar el fenómeno tumoral sobre bases genéticas. Una de ellas supone que el cáncer se puede deber a la

acumulacion de mutaciones somaticas, de modo que los fenotipos cancerosos mas extremos serian el resultado de una serie progresiva de mutaciones. Sostiene la segunda hipotesis que la mayoria de los canceres se podrian originar por la insercion de material genetico nuevo, como consecuencia de la infeccion de celulas normales por virus tumorales. Aunque a la luz de las mas recientes investigaciones ninguna de las dos hipotesis parece explicar todos los tipos de cancer conocidos, ambas teorias no se excluyen mutuamente y es posible que ambos procesos desempeñen un importante papel en algunas clases de cancer.

Las propiedades que caracterizan a la celula tumoral resumidas en tres son: perdida del control del crecimiento, perdida del control posicional con la invasion y la metastasis, y capacidad de evadir la vigilancia inmunologica.

Dentro de los distintos tipos de tumores, los del Sistema Nervioso Central ocupan un lugar predominante debido a que por su localizacion y su elevada capacidad de crecimiento presentan un elevado grado de morbilidad y de mal pronostico. En una formacion como el cerebro, la malignidad de un tumor debe considerarse en dos sentidos:

1-caracter agresor de los componentes celulares.

2-importancia de la neoplasia por su localizacion.

Casi todos los tumores intracerebrales primarios son gliomas es decir tumores intraparenquimatosos que provienen de celulas neurogliales. La nomenclatura de los tumores que forman el grupo de los gliomas es multiforme aunque pueden dividirse en cuatro tipos fundamentales:

-Astrocitoma: grado 1,2,3 y 4. En orden ascendente de malignidad.

-Ependimoma.

-Oligodendroglioma.

-Meduloblastoma.

Otros tumores que constituyen el 15% de los tumores cerebrales primitivos son los meningiomas, siendo los meningosarcomas su variante maligna.

Los recientes avances en las tecnicas de cultivo "in vitro" han permitido el establecimiento de lineas celulares derivadas de tumores de diversos origenes lo que ha possibilitado el analisis de algunos de los complejos mecanismos moleculares implicados en la oncogenesis.

Así en la actualidad existen numerosas líneas celulares de diferentes orígenes utilizadas por distintos grupos de investigadores para profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la transformación celular y los relacionados con el escape de estas células a la vigilancia del Sistema Inmune.

Pese a las grandes dificultades que ello conlleva en los últimos años se han conseguido obtener numerosas líneas celulares derivadas de neoplasias de diferentes localizaciones.

El establecimiento de líneas celulares procedentes de gliomas ha sido comunicado por distintos investigadores (PONTEN 1.973; WESTERMARK y cols., 1.973; LINDGREN y cols., 1.975; WESTERMARK 1.973; ICARD y cols., 1.981), líneas en las que se han realizado estudios encaminados a determinar sus características básicas de crecimiento, diferentes parámetros del ciclo celular o alteraciones en el cariotipo (HOSHINO y cols., 1.972, 1.975; MARK y cols., 1.977; SANTONI y cols., 1.975 ICARD y cols., 1.981).

Sin embargo, para que se desarrolle un tumor, además de la transformación neoplásica, las células

tumorales han de ser capaces de evitar la vigilancia del Sistema Inmune.

Efectivamente a lo largo de la ultima decada se ha despertado un cierto interes por abordar el problema del cancer desde el punto de vista inmunologico. Existe el convencimiento de que en las celulas cancerosas hay algunas características que las distinguen de las celulas normales y que esta diferencia puede ser reconocida por el Sistema Inmune. La reaccion inmunologica contra las celulas cancerosas y la paradójica capacidad de muchos tumores de persistir a pesar de dicha respuesta, constituyen hoy dia uno de los mas interesantes temas de investigacion. Asi, preliminarmente se pusieron en evidencia una serie de mecanismos mediante los cuales las celulas tumorales pueden bloquear la funcion de las celulas inmunocompetentes. Un ejemplo seria la existencia de factores bloqueantes en el suero de pacientes cancerosos que impedirian el desarrollo de algunas actividades citotoxicas por parte de las celulas del Sistema Inmune (MONTERO 1.984; ARANDA 1.981).

Dentro de los mecanismos que el Sistema Inmune posee para defenderse de las agresiones extrañas,

existe un mecanismo que parece ser especializado en la defensa frente a células tumorales. Este mecanismo sería el llevado a cabo por linfocitos T citotóxicos constituyendo el más importante mecanismo específico de Vigilancia Inmune Antitumoral (PEÑA, 1.985a).

Los linfocitos T citotóxicos van a destruir células tumorales a las que reconocen de forma específica, reconocimiento que está gobernado por las moléculas del Sistema Mayor de Histocompatibilidad clase I. (ZINKERNAGEL y DOHERTY, 1.974).

COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

Los antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) están codificados por un grupo de loci genéticos muy unidos entre sí, que van a codificar moléculas cuya función será regular los procesos de reconocimiento de lo propio ("Self recognition") de forma que el Sistema Inmune desarrollara una respuesta efectiva para la destrucción de todo aquello que reconoce como extraño.

La búsqueda de este Sistema en el hombre fue a

partir del descubrimiento del MHC en el raton. Asi el primer aloantigeno humano conocido, Mac (en la actualidad HLA-A2) fue comunicado por DAUSSET en 1.958.

El grupo de loci que constituyen el MHC se divide en dos grupos principalmente:

CLASE I (su funcion sera regular el reconocimiento y lisis, por linfocitos T citotoxicos, de celulas extrañas).

CLASE II (fundamentalmente regular el reconocimiento de los antigenos extraños en las celulas portadoras de dichos antigenos por linfocitos T colaboradores).

Al realizar distintas funciones, los productos de estas clases se van a diferenciar en su composicion bioquimica, distribucion tisular y propiedades serologicas.

Ademas de los loci de la clase I y clase II en el segmento cromosomico hay otros loci, los mas importantes son los que codifican componentes del sistema de complemento, a estos se les denomina CLASE III y son considerados por la mayoria de los inmunologos como integrantes del MHC.

Gracias a estudios realizados en humanos, se demostro que los alelos que codifican los componentes del complemento Bf y C2 se encuentran ligados al complejo HLA (ALLEN,1.974; FU y cols.,1.974), asi mismo el C4 (RITTNER y cols.,1.975).

Complejo Mayor de Histocompatibilidad es un termino general se emplea para hacer referencia sin especificar a este grupo de loci en las distintas especies. Sin embargo en cada especie estudiada, el MHC tiene una denominacion concreta; asi en el hombre se denomina HLA, en el raton H2, en el perro DLA, en el cobaya GPLA,...

En 1.965 DAUSSET y cols. lanzaron la hipotesis de que los antigenos HLA estuvieran controlados por genes pertenecientes a un mismo sistema, al que llamo Hu-1. Esto fue corroborado por varios autores (Van ROOD y cols., 1.965 ; BATCHELOR y CHAPMAN, 1.967 ; AMOS, 1.968 ; CEPPELLINI y cols., 1.967) que llegaron a igual conclusion tras los resultados obtenidos en injertos de piel y riñon, realizados entre familias.

CEPPELLINI y cols. (1.967) propuso el modelo de dos loci, formados por genes situados en el mismo cromosoma, el termino HAPLOTIPO lo utilizo para

definir pares de antígenos codificados por genes situados en el mismo cromosoma.

Se denomina haplotipo HLA a la región genética de un cromosoma que contiene todos los genes HLA (menos los que los que codifican la beta-2-microglobulina). Estos genes se van a heredar como caracteres codominantes simples y de acuerdo con las leyes de Mendel (ALLEN y cols., 1.970; KISSMEYER-NIELSEN y cols., 1.971; LOW y cols., 1.974; HANSEN y cols., 1.975).

Se ha podido demostrar gracias al uso de híbridos de células somáticas que el sistema HLA se encuentra en el cromosoma 6 humano ligado al gen de la fosfoglutamasa-3 (PGM-3) (LAMM y cols., 1.971; JONGSMA y cols., 1.973; Van SOMEREN y cols. 1.974).

Lo mismo ocurre con el gen que codifica el polimorfismo del enzima glioxilasa-1-eritrocitaria (GLO) (WEITKAMP y cols., 1.976; MEERA KHAN y cols., 1.976; OLAISEN y cols., 1.976). Y el enzima 21-hidroxilasa (21-OH) se sitúa dentro del complejo HLA, cerca del que codifica C4A, de forma que la pérdida o mutación de este gen condicionaria la pérdida de 21-OH (WHITE y cols., 1.984).

Los genes del MHC abarcan dos grupos de loci geneticos cada uno de los cuales codificara una serie de glicoproteinas de la superficie celular con diferentes estructuras bioquimicas; asi el grupo de genes:

CLASE I esta compuesto por tres loci A,B y C; que codifican las moleculas HLA-A, HLA-B y HLA-C respectivamente.

CLASE II abarca tres loci geneticos separados, los loci DR, DP y DQ que codifican las moleculas de superficie HLA-DR,HLA-DP y HLA-DQ (PARK y cols.,1.978-1.980; PARK y TERASAKI 1.980; DUQUESNOY y cols., 1.979-1.980; SHAW y cols., 1.980; TERMYJTELEN y cols.,1.980).

Por la utilizacion de lineas mutantes y anticuerpos monoclonales se pudo demostrar que las especificidades DR, DP y DQ estan en distintas moleculas (SOLANA y cols.,1.984; FERNANDEZ y cols., 1.984).

-ESTRUCTURA BIOQUIMICA DE LAS MOLECULAS CLASE I.

Los Antigenos de Histocompatibilidad clase I estan formados por:

-una cadena principal de Peso Molecular=45.000 Daltons en la que reside el polimorfismo antigenico, se trata de una cadena glicosilada.

-una cadena secundaria de Peso Molecular=12.500 Daltons, de estructura igual a la Beta-2-microglobulina.

Se encuentran asociadas por interacciones no covalentes (CRESSWEL y cols. 1.973; NAKAMURO y cols. 1.973; GREY y cols. 1.973; TANIGAKI y cols. 1.973).

La cadena secundaria o ligera esta codificada en el cromosoma 15 del hombre por tanto no es codificada dentro del CMH (GOOTFELLOW y cols. 1.975). El estudio estructural de esta cadena demuestra una gran similitud en su secuencia de aminoacidos con los de la region constante de las Inmunoglobulinas (PETERSON y cols. 1.972) y con el tercer dominio extracelular de la cadena pesada (ORR y cols. 1.979 a).

En la estructura de la cadena pesada se distinguen tres porciones segun su situacion con relacion a la membrana celular:

PORCION EXTRACELULAR .-Es portadora de la especificidad antigenica. Es la mayor y consta de 283 residuos. Esta formada por tres dominios globulares: alfa-1, alfa-2 y alfa-3 (ORR y cols. 1.979 b,c; LOPEZ DE CASTRO y cols. 1.979).

PORCION TRANSMEMBRANICA.-Es hidrofobica puesto que se encuentra situada en la bicapa lipidica de la membrana celular y su funcion sera fijar la molecula a la membrana celular (SPRINGER y STROMINGER, 1.976).

PORCION INTRACITOPLASMATICA.-En ella se localiza el extremo C-terminal, es hidrofilica y su posible funcion sera interaccionar con las proteinas del citoesqueleto (SPRINGER y STROMINGER, 1.976).

-LOCALIZACION DE LAS MOLECULAS CLASE I

Se han localizado las moleculas clase I en casi todas las celulas nucleadas del organismo, a excepcion del trofoblasto placentario (AMOS y KOSTY, 1.980; LOKE y cols., 1.971; GOODFELLOW y cols., 1.976; KAWATA y cols.,1.984; REDMAN y cols.,1.984).

La expresion de las moléculas HLA clase I en los distintos órganos y tejidos de la economía ha sido estudiada por numerosos autores (SYBESNA y cols., 1.974; WILLIAMS y cols., 1.980; SCHMIDT y cols., 1.980; HART y cols., 1.981; ADINOLFI y cols., 1.982; NATALI y cols., 1.984) ha producido una gran controversia entre distintos autores la expresion de moléculas clase I en esperma (FELLOUS y DAUSSET, 1.970; HALLIN y cols., 1.974; ANDERSON y cols., 1.982-1.984).

Con el uso de Anticuerpos Monoclonales y gracias a los avances en el campo de la inmunohistoquímica se han localizado las moléculas clase I en casi todas las células nucleadas del organismo, puesto que algunas células no expresan clase I o su expresion es mínima, así ocurre con:

-el endotelio corneal, glándulas de Brunner duodenales, neuronas del SNC,...

Respecto al esperma parece ser que si bien en estado maduro no expresa moléculas clase I, las células espermáticas germinales si la expresan a nivel testicular (DAAR y cols., 1.984 a).

-FUNCION DE LAS MOLECULAS CLASE I

Su distribucion tisular respalda la funcion que a estos antigenos se les asigna actualmente.

Son los principales elementos de restriccion en la lisis, mediada por linfocitos T citotoxicos, de celulas infectadas por virus (ZINKERNAGEL y DOHERTY, 1.974), quimicamente transformadas (SHEARER, 1.974) o con degeneracion neoplasica (SCHMIDT y cols.,1.981). Para que se produzca la destruccion de estas celulas por los linfocitos T citotoxicos es necesario que posean identicos antigenos de histocompatibilidad clase I, a este fenomeno se le denomina de RESTRICION GENETICA.

Estas moleculas se encuentran exclusivamente en celulas nucleadas, que son los unicos elementos celulares capaces de ser infectados por virus o sufrir una degeneracion neoplasica.

Podemos concluir que actuan como elementos de restriccion en el reconocimiento y lisis, por linfocitos T citotoxicos, de celulas diana portadoras de antigenos menores de histocompatibilidad distintos a los propios (GORDON y cols,1.975; GOULMI y cols.,1.976,1.977; SINGAL y cols., 1.981; BEVAN,

1.975). Asimismo son los antígenos del trasplante puesto que los linfocitos T citotóxicos reconocen como extrañas a las células portadoras de antígenos de histocompatibilidad clase I distintos a los suyos.

De este modo puede explicarse la ausencia fisiológica de productos clase I en el trofoblasto, por este mecanismo se "protegería" del ataque de los linfocitos T citotóxicos, pues en definitiva, el feto se podría considerar como un "aloinjerto" que recibe la madre.

-ESTRUCTURA BIOQUÍMICA DE LAS MOLECULAS CLASE II.

La región HLA-D está formada por al menos tres subregiones principales: HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR, cada una de ellas contiene un grupo de genes que codifican tres familias de distintas moléculas clase II, DP, DQ, DR.

El estudio de estas moléculas se ha llevado a cabo con la utilización de Anticuerpos Monoclonales, para el aislamiento de las moléculas clase II, y con la electroforesis bidimensional se han ordenado los péptidos que las constituyen.

Todas las moléculas clase II son moléculas de la superficie celular que se encuentran unidas a la membrana celular, están constituidas por dos cadenas glicoproteicas unidas entre sí por enlaces no covalentes. Ambas son codificadas por genes pertenecientes al MHC.

Se las denomina: cadena alfa o pesada (Pm de 33.000-35.000Daltons) y cadena beta o ligera (Pm 27.000-29.000Daltons) (STROMINGER y cols. 1.975; SPRINGER y cols. 1.977; NADLED y cols. 1.981).

Ambas cadenas están formadas por varios dominios:

-dos dominios extracelulares (alfa-1,2 y beta-1,2), los dominios alfa-2, beta-1 y beta-2 están plegados a nivel de un puente disulfuro. Los dominios alfa -2 y beta-2 demuestran una gran homología con el dominio alfa-3 de la molécula clase I, por tanto también con la Beta-2-microglobulina y con la región constante de las Inmunoglobulinas (KAUFFMAN y STROMINGER, 1.982).

-un dominio que es la porción de cada cadena que atraviesa la membrana celular, es hidrofóbico.

-por último un dominio citoplasmático y de naturaleza hidrofílica.

La cadena beta es polimorfica y determina la especificidad serologica de los antigenos clase II, la cadena alfa de la molecula DR es mas constante que la beta (SILVER y FERRONE, 1.979) aunque la cadena alfa de la molecula DQ tambien exhibe un cierto polimorfismo (GOYERT y cols.,1.982; AUFRAY y cols., 1.983; HURLEY y cols.,1.984).

-LOCALIZACION DE LAS MOLECULAS CLASE II

Su distribucion es mas restringida que la de las moleculas HLA-clase I

Principalmente las moleculas HLA-DR estan expresadas en linfocitos B(SACHS y CONE, 1.973), linfocitos T activados (SCHIRRMACHER y FESTENSTEIN, 1.975; GREAVES y cols., 1.972), monocitos y precursores hematopoyeticos (ALPER y cols., 1.978; FERRORE y cols., 1.978, WINCHESTER y KUNKEL, 1.979; WINCHESTER, 1.980; ALONSO y cols., 1.985 a,b 1.986 a). En celulas epidermicas de Langerhans (KLARESKOG y cols., 1.977; ROWDEN y cols.,1.977) y en celulas endoteliales (HIRSCHBERG y cols.,1.979).

Han sido varios los estudios realizados (WIRMAN y cols.,1.978; WILLIAMS y cols.,1.980; NATALI y cols.,1.981 a,b; FUGGLE y cols.,1.983; DAAR y cols.,1.984 b) que han detectado expresion de moleculas HLA clase II en otras localizaciones como celulas dendriticas, celulas del epitelio normal de diferentes tejidos,...

Distintos estudios realizados parecen demostrar que los antigenos HLA-DQ solo se expresan en celulas del S.I., como son los linfocitos B (FESTENSTEIN y cols.,1.984), linfocitos T activados (NAVARRETE y cols.,1.985) y Monocitos (ALONSO y cols.,1.985 a,b 1.986 a).

-FUNCION DE LAS MOLECULAS CLASE II

La distribucion restringida de los antigenos clase II, sugiere una funcion mas especializada.

Intervienen en la presentacion del antígeno por el macrófago y otras células presentadoras de antígenos a los linfocitos T colaboradores para que se inicie la Respuesta Inmune. Es necesario que tanto la célula efectora como la presentadora deben poseer idénticas moléculas clase II, al menos las moléculas HLA-DR,a

este fenomeno se le denomina de *RESTRICCION EN LA COLABORACION DE LA RESPUESTA INMUNE*.

Las moléculas clase II actúan como elementos de restricción en las interacciones celulares necesarias para la presentación del antígeno al linfocito T. Y parece ser que tanto las moléculas HLA-DR como las HLA-DQ intervienen en la proliferación de linfocitos T en respuesta a antígenos virales y que son funcionalmente importantes en la presentación del antígeno al linfocito T colaborador (BALL y STASNY, 1.984).

SISTEMA MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y NEOPLASIA.

Dada la importancia de las moléculas HLA recientemente ha sido seguida la hipótesis de que la pérdida de estos antígenos H-2 clase I pueda ser responsable del escape de la célula tumoral a la vigilancia del Sistema Inmune, y principalmente por los linfocitos T citotóxicos.

FESTENSTEIN y cols.(1.982) y SCHMIDT y FESTENSTEIN (1.982) pusieron de manifiesto que la falta de expresión de los productos H-2K en determinadas leucemias de ratones de la cepa AKR de estas células leucémicas de ser destruidas por células T citotóxicas.

EISENBACH y cols. (1.983) demostraron la correlación que había entre el nivel de expresión de moléculas H-2 clase I en la capacidad metastizante de distintos clones de un tumor murino.

ROSLONIEC y cols. (1.984) demostraron la relación entre la falta de expresión de moléculas H-2D en linfomas de ratones SJL/J, y la gravedad de la neoplasia.

Podemos sacar como consecuencia de todos estos estudios la importancia que tiene la expresion o ausencia de expresion de las moleculas H-2 clase I, en el proceso de escape tumoral a la vigilancia del Sistema Inmune.

Experimentos realizados mas recientemente ponen de manifiesto, que la expresion de moleculas clase I es anulada en celulas de rata transformadas por el adenovirus-12 (virus altamente oncogenico); mientras que el tratamiento de estas celulas con el adenovirus-5 (no oncogenico) no altera la expresion de estas moleculas (SCHRIER y cols., 1.983).

BERNARDS y cols. (1.983) llegaron a igual conclusion, tratando ratas inmunocompetentes con el adenovirus-12 se producian tumores que ocasionaban la muerte del animal; pero si se las trataba con el adenovirus-5 eran rechazadas y destruidas por el Sistema Inmune.

EISENBACH y cols. (1.985) demostraron con clones derivados del tumor murino 3LL-LEWIS , que la variabilidad de expresion de los antigenos H-2K y H-2D, esta relacionada con el potencial metastizante del tumor, y esta es consecuencia de la incapacidad de los linfocitos T citotoxicos de reconocer y

destruir a las células tumorales.

Usando distintos modelos experimentales, HUI y cols. (1.984), y TANAKA y cols. (1.985) demostraron que a tumores que no expresaban moléculas H-2 clase I, se les transfectaban genes que codificaban estas moléculas, induciendo su aparición, y al expresar estas moléculas el Sistema Inmune actuaría sobre ellas destruyéndolas.

Habiéndose obtenido en los últimos años grandes avances en el conocimiento del importante papel que juegan los antígenos de histocompatibilidad murinos, son muy escasos los datos de los que en la actualidad se dispone en humanos, terreno en el que la investigación está en fase de iniciación.

Así, se han realizado estudios analizando el grado de malignidad tumoral y la expresión de antígenos HLA clase I y clase II. Se ha encontrado una gran heterogeneidad en la expresión de estos antígenos en tumores de diferentes localizaciones (NATALI y cols., 1.984; KAWATA y cols., 1.984; PEÑA y cols., 1.985; DOYLE y cols., 1.985 y GARCIA-ESPEJO y cols., 1.986) y en algunos casos se ha encontrado una estrecha relación entre el grado de anaplasia celular y el nivel de expresión de antígenos HLA clase I

(GARCIA-ESPEJO y cols., 1.986; HAMMERLING y cols., 1.985; PEÑA y cols., 1.985, 1.986 a y b). Estudios "in vitro" efectuados por MOORE (1.986) y PARMIANI (1.986) parecen confirmar la importancia de estas moléculas en los procesos de reconocimiento y destrucción de las células tumorales por el Sistema Inmune del huésped.

OBJETIVOS

Dada la importancia actual de las líneas celulares en el mejor análisis de los procesos implicados en la transformación neoplásica, el objetivo de este trabajo es establecer y caracterizar una línea celular procedente de un tumor maligno del Sistema Nervioso.

Igualmente considerando que las moléculas HLA clase I y clase II juegan un importante papel en las funciones de reconocimiento y destrucción de células tumorales, hemos estudiado la expresión de estas moléculas en la superficie de las células de la línea producida por nosotros, MSM, mediante Anticuerpos Monoclonales específicos y su modulación por el Ester de Forbol (TPA) y Gamma-Interferon humano.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

-MATERIAL

-MATERIAL BIOLÓGICO

-TUMOR: fue extraída la pieza tumoral, procedente de un paciente diagnosticado de masa intracraneal, en el Servicio de Neurocirugía del Hospital Regional "Reina Sofía". El estudio anatómo-patológico de la pieza reseca permitió establecer el diagnóstico de Glioma (Astrocitoma de grado 2).

-ANTICUERPOS MONOCLONALES: se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: W6/32, L243, L227, EDU1, y Tu22; cuyas características quedan recogidas en la Tabla I.

En la Tabla II se recogen los porcentajes de células fluorescentes de la línea celular HOM-2, con los diferentes Anticuerpos Monoclonales anti-HLA utilizados en este estudio, a distintas diluciones

Hasta el momento de su utilización, los distintos anticuerpos monoclonales permanecieron conservados en un contenedor N2 líquido, en alícuotas de cien microlitros.

TABLA I

ANTICUERPOS MONOCLONALES MONOMORFICOS

NOMBRE	ESPECIFICIDAD	PROCEDENCIA	REFERENCIA
W 6/32	anti HLA-ABC	*ATCC (HB-95)	PARHAM y cols. 1.979.
L 243	anti HLA-DR	ATCC (HB-55)	LAMPSON y LEVY 1.980.
L 227	anti HLA-DR/DP	ATCC (HB-96)	LAMPSON y LEVY 1.980.
TU 22	anti HLA-DQ	ZIEGLER	ZIEGLER y cols. 1.981.
EDU 1	anti HLA-DR/DP	VILELLA	VILELLA y cols. 1.982.

*ATCC: American Tissue Culture Collection.

En la Tabla II se expresan los resultados como la media de los porcentajes obtenidos en cinco experimentos.

Como puede observarse para el Anticuerpo Monoclonal (Ac.Mo.) W 6/32 el porcentaje de células positivas comienza a descender a partir de la dilución 1/100 haciéndose nulo para la dilución 1/10.000. Se ha elegido la dilución 1/50 como óptima para la realización de todos los estudios posteriores.

Igualmente observamos como para el Ac.Mo. L 243 el porcentaje de células positivas comienza a descender a partir de la dilución 1/50 haciéndose nulo para la dilución 1/10.000. Se ha elegido la dilución 1/100 como óptima para la realización de todos los estudios posteriores.

Para el Ac.Mo. L 227 se ve como el porcentaje de células positivas comienza a descender a partir de la dilución 1/1.000, haciéndose nulo para la dilución 1/10.000. Se ha elegido la dilución 1/500 como óptima para la realización de todos los estudios posteriores.

Igualmente observamos como para los Ac.Mo. EDU 1 y TU 22, el porcentaje de células positivas comienza a descender a partir de la dilución 1/5.000, habiéndose elegido la dilución 1/1.000 como óptima para la realización de todos los estudios posteriores.

TABLA II

TITULACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES CON LA LINEA
CELULAR HOM-2.

DILUCION	W 6/32	L 243	L 227	EDU 1	TU 22
NETO	*95	92	93	95	96
1/2	95	86	89	96	92
1/10	99	98	93	98	84
1/50	98	87	93	97	90
1/100	76	91	86	99	84
1/500	55	70	84	98	87
1/1.000	36	59	68	95	97
1/5.000	2	8	2	86	39
1/10.000	0	0	0	79	14

*Porcentaje de células fluorescentes.

-REACTIVOS Y PRODUCTOS QUIMICOS Y BIOLOGICOS.

-AGUA: toda la utilizada fue sometida a bidestilacion, desionizacion, y en su caso esterilizacion en autoclave.

-PBS(SOLUCION SALINA TAMPONADA CON FOSFATOS): se utilizo el de la firma Oxoid(Ltd. London), suministrado en botes que contienen 100 tabletas. Para su preparacion se disuelve una tableta por cada 100 cc. de agua. Se dispensa en frascos y se conserva en frigorifico hasta su uso.

-ALBUMINA SERICA BOVINA(BSA)(Sigma)

-AZIDA SODICA(Merck).

-SOLUCION PBS/BSA/AZIDA SODICA: disolucion de PBS en un 1% de BSA y 0,02% de Azida sodica.

-DIMETIL SULFOXIDO(DMSO)(Sigma).

-MEDIO DE CULTIVO RPMI 1640 (Flow Laboratories): contiene glutamina y hepes, sirviendose liofilizado en sobres. Para su preparacion, el contenido de un sobre se disuelve en 980 ml de agua, a la que se añaden 20 ml de bicarbonato sodico al 7,5% (Flow Laboratories), 250 mg de Cefotaxima (Primafen, Hoechst) y 500 mg de Cloxacilina -

Ampicilina (Cloxamp, Beecham), facilitando su disolucion en un agitador magnetico, y finalmente, ajustando el pH final a 7,4 en un pHmetro (Crison 585). Posteriormente, es filtrado y conservado en frigorifico hasta su utilizacion.

-SUERO FETAL DE TERNERA (FCS) (Flow Laboratories): es servido en botes de 500 ml, para su utilizacion debe ser previamente descomplementarizado (calentamiento en agua a 56 grados C durante 30 minutos). Una vez descomplementarizado, se dispensa en tubos universales de plastico, en condiciones de esterilidad, y se conserva congelado hasta el momento de su uso.

-MEDIO DE CULTIVO ENRIQUECIDO CON FCS (10%).

-NITROGENO LIQUIDO: suministrado por el Centro Agropecuario de la Excma. Diputacion Provincial de Cordoba.

-ANTISUERO DE CABRA ANTI-INMUNOGLOBULINA DE RATON CONJUGADO CON FLUORESCINA (Meloy): con una concentracion de proteinas totales que oscila entre 60-70 mg/ml y un radio F/P=3,3.

-ACETATO DE 12-O-TETRADECANOIL FORBOL 13 (TPA) (Sigma): el TPA se preparo diluyendo una ampolla de 100 mg en 1 ml de DMSO ajustandose posteriormente con

PBS esteril hasta alcanzar una concentracion de 100 ng/ml.

-GAMMA INTERFERON HUMANO(Sigma):con actividad de 1000 UI/ml.

-AZUL TRIPANO(MERCK):se preparo diluyendo 1 g en 100 ml de agua bidestilada,desionizada y esteril.

-MATERIAL DE VIDRIO,PLASTICO Y OTROS.

-MATERIAL DE VIDRIO:pipetas Pasteur, pipetas de diversas capacidades(1,5,10 ml),matraces(100 ml),probetas(1l).

-MICRODISPENSADOR HAMILTON adaptado a JERINGA HAMILTON de 50 microlitros(Hamilton,Reno Nevada).

-PIPETAS AUTOMATICAS de diversas capacidades (Brand).

-TUBOS UNIVERSALES DE PLASTICO(Eurolab).

-PLACAS DE CULTIVO MICROTITER de 96 pocillos y fondo concavo(Soria Greiner).

-FRASCOS DE CULTIVO de 25 y 80 centimetros cuadrados (Costar).

-MALLA METALICA CON SOPORTE ADAPTADOR A TUBOS UNIVERSALES(No comercial).

-AMPOLLAS DE CONGELACION NUNC(Inter.Med.,1'8 ml).

-APARATAJE.

-MILLI-Q (Millipore,S.A.):para el filtrado y desionizacion del agua.

-DESTILADOR DE AGUA GP-G (Autostill Co.).

-AUTOCLAVE (Masia Industrial Medica).

-CENTRIFUGA IEC CENTRA 7-R (Hucoa-Erloss).

-CAMPANA DE FLUJO LAMINAR CLASS 100 (Gelaire).

-CITOCENTRIFUGA CITOSPIN (Shandon).

-BOMBA PERISTALTICA MASTERFLEX (Millipore): a la que se acoplan filtros STERIVEX-GS (Millipore) de 100 micras, utilizada para el filtrado del medio.

-MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES (Zeiss).

-MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES Y DE FLUORESCENCIA (Zeiss).

-ARCON CONGELADOR DE HASTA -80 GRADOS C CLIMATEST (Izasa).

-CONTENEDOR DE NITROGENO LIQUIDO (Union Carbide).

-METODOS.

-OBTENCION DE LA LINEA TUMORAL.

La linea MSM procede de un Glioma.

Para la obtencion de esta linea se siguio el siguiente proceso: la masa tumoral tras su reseccion es depositada en PBS esteril a baja temperatura. Inmediatamente se lleva al laboratorio donde la masa tumoral es depositada en una malla metalica con dispositivo acoplador a frascos universales de 25 ml. La masa es dislacerada mediante el uso de agujas esteriles de 0,5 por 16 mm, recibiendo abundantes irrigaciones con PBS esteril. Las celulas aisladas son separadas de los fragmentos de tejido no homogeneizado mediante sedimentacion de estos.

Posteriormente, las celulas son lavadas repetidas veces con PBS, hasta eliminar completamente todos los detritus.

Una vez lavadas, las células son resuspendidas en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero fetal de ternera.

Las células son sembradas en placas Costar de 24 pocillos, en volumen de 2 ml por pozo, y a una concentración de 500.000 células tumorales viables por pozo.

Todos los cultivos se realizaron en un incubador automático de CO₂, a 37 grados y en una atmósfera del 5% de CO₂.

Cada cuatro días, se procede a recambiar el medio de cada uno de los pocillos, aspirando 1 ml del volumen del pocillo y añadiéndole la misma cantidad de medio nuevo. Son realizados controles periódicos para determinar la viabilidad de las células mantenidas en cultivo, así como para detectar posibles contaminaciones en la placa. Estos controles son realizados mediante examen de cada uno de los pocillos al microscopio invertido, así como con la realización del test de exclusión del Tripan Azul.

Una vez que se detecta actividad proliferativa en alguno de los pocillos, las células son removidas del mismo y pasadas a un frasco de cultivo de 25 centímetros cuadrados de superficie. El medio es

igualmente recambiado en un 50% cada cuatro días, observando al microscopio invertido para evitar que el crecimiento de las células se haga confluyente. En este momento, las células son tripsinizadas y subcultivadas.

Para ello, los 5 ml de medio del frasco son extraídos, procediendo a lavar el mismo con 5 ml de PBS, a fin de eliminar los restos de suero fetal, que bloquearían la reacción enzimática. Son añadidos 2 ml de Tripsina 0,025%, e incubado el frasco durante un minuto a 37 grados, tras el cual, se golpea el mismo ligeramente sobre la palma de la mano, comprobando que las células se han despegado y se encuentran en suspensión. Rápidamente son añadidos 2 ml de medio conteniendo 10% de suero fetal de ternera, deteniendo de esta manera la actividad enzimática. Las células son pasadas a tres frascos de cultivo de iguales características, prosiguiendo el cultivo. Cuando la velocidad de crecimiento de las células se ha estabilizado y poseemos un stock suficiente, las células son subcultivadas en frascos de 80 centímetros cuadrados, asegurando una densidad suficiente que permita el crecimiento.

Conforme va creciendo el numero total de celulas en cultivo, se realiza una congelacion de las mismas en condiciones que aseguren el mantenimiento de la linea celular.

-TIEMPO DE DOBLAJE

Para calcular el tiempo de doblaje se cultivaron 10.000 cels. en un volumen de 1 ml en placas COSTAR de 24 pocillos determinandose en las horas sucesivas el numero de celulas presentes en el mismo. El ritmo de crecimiento de estas celulas nos daba una curva sigmoidal.

Los contajes se realizaron siempre por triplicado por tres observadores independientes.

-TEST DE EXCLUSION DEL TRIPAN AZUL:

De cada uno de los pocillos en los que se observo crecimiento celular se tomaron 50 microlitros de la suspension celular a los que se les añadieron 50 microlitros de Azul Tripano al 1%. A continuacion se estudio en el microscopio de fase el numero de celulas teñidas (celulas muertas) por cada 100 celulas contadas y se determino asi el porcentaje de viabilidad celular.

**-TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA
CON ANTICUERPOS MONOCLONALES:**

Se lleva a cabo en placa de cultivo de fondo en U (concavo) .

Una vez obtenidas, lavadas y debidamente asisladas las suspensiones de celulas tumorales (cinco millones de cels/ml), se siembran alicuotas de 50 microlitros/pocillo. Posteriormente, se añaden cada uno de los anticuerpos monoclonales (W6/32,L243,L227=50 microlitros/pocillo; EDU1 y TU22=1 microlitro/pocillo), agitando debidamente la mezcla.

En estas condiciones, se incuba la disolucion, a 4 grados, durante 60 minutos, al termino de los cuales se procede a lavar tres veces consecutivas la placa con 100 microlitros/pocillo de solucion de PBS/BSA/AZIDA, mediante centrifugacion (1.200 r.p.m., cinco minutos a cuatro grados), decantado rapido y agitacion cuidadosa de los botones celulares resultantes.

Una vez concluido el ultimo lavado, los botones celulares se agitan y resuspenden en 50 microlitros/pocillo de PBS/BSA/AZIDA, añadiendose posteriormente el segundo anticuerpo (antisuero de cabra anti-inmunoglobulina de raton conjugado con fluoresceina), a razon de tres microlitros/pocillo.

El conjunto se deja incubar nuevamente durante 20-30 minutos, a temperatura ambiente y protegido de la luz.

Finalizada la incubacion, la placa se lava de nuevo tres veces, en las mismas condiciones que antes, resuspendiendose el boton celular, resultante del ultimo lavado, en 50 microlitros/pocillo de PBS/BSA/AZIDA.

En estas condiciones, se procedera al contaje del contenido de cada pocillo, montado sobre una placa de Neubauer, en el microscopio de fluorescencia, dandose los resultados en porcentaje de celulas positivas o fluorescentes.

-PROTOCOLO DE INDUCCIONES.

-PRETRATAMIENTO DE LAS CELULAS CON ACETATO DE 12-O-TETRADECANOIL FORBOL 13:

Las células tumorales en fase de crecimiento exponencial fueron ajustadas a cinco millones de cels/10ml, se cultivaron en cuatro frascos de cultivo con medio RPMI 1640 con 10% de FCS. Posteriormente se añadieron 100 ng/ml del acetato 12-O-tetradecanoil forbol 13 (TPA) a tres de los frascos de cultivo.

Las células fueron recogidas de cada uno de los frascos de cultivo que contenían TPA, los días 1, 3 y 5. Posteriormente las células fueron lavadas dos veces con PBS/BSA/AZIDA y su concentración se ajustó a cinco millones de células/ml para realizar con posterioridad la inmunofluorescencia indirecta.

-PRETRATAMIENTO DE LAS CELULAS TUMORALES CON GAMMA INTERFERON:

Se siguió el mismo procedimiento pero tratando las células tumorales con 100 UI/10 ml. Tras 1, 2 y 3 días de tratamiento las células se recogieron y ajustaron a una concentración de cinco millones de células por mililitro para la realización de la inmunofluorescencia.

-METODO DE CONGELACION.

Preparacion del Medio de Congelacion, utilizamos dos tipos:

-Solucion o Medio A: RPMI 1640 con un 80% de FCS.

-Solucion o Medio B: RPMI 1640 con un 20% de dimetilsulfoxido (DMSO).

Seguidamente, resuspendemos las celulas en 0'5 ml del Medio A y se transfieren a ampollas de congelacion Nunc.

Inmediatamente antes de la congelacion se añaden otros 0'5 ml del Medio B.

Las ampollas asi preparadas se traspasan a una caja para congelacion a -80 Grados C (siguiendo la tecnica de Willians y cols., 1.984). Se dejaron en esta durante una hora antes de pasar a almacenarlas definitivamente en el contenedor de Nitrogeno liquido.

RESULTADOS

ESTABLECIMIENTO DE LA LINEA CELULAR.

La línea celular que hemos analizado en el presente trabajo deriva de un tumor de la glia, localizado en la línea media del cerebro y diagnosticado anatomopatológicamente como un glioma (Astrocitoma grado 2).

Tras la dislaceración y purificación de las células tumorales, 500.000 células viables por pocillo fueron adicionadas a placas COSTAR de 24 pocillos donde tras 15 días de cultivo se constató el crecimiento celular en tres de los pocillos que fueron posteriormente subcultivados como se indica en el Material y Métodos.

En la Figura I se muestran unas fotografías de la línea celular MSM, obtenida al microscopio invertido, durante un proceso de crecimiento en frascos de cultivo.

Una vez establecido el hecho de que estas células mantenían capacidad proliferativa "in vitro" estable durante un período superior a los 30 días diversas alícuotas fueron congeladas en Nitrógeno líquido en diferentes lotes y almacenadas para la realización de los diversos estudios presentados en este trabajo.

ANALISIS MORFOLOGICO

La mayoría de las células que predominan en el cultivo celular, como se indica en la Figura II, son células grandes, fusiformes que crecen formando monocapas de células adheridas al fondo de la placa. A lo largo del tiempo en que estas células se han mantenido en cultivo no se han observado cambios en su morfología. Tampoco observamos cambios en los distintos lotes congelados sucesivamente en este trabajo, ello nos indica que se trata de una línea celular estable posiblemente de origen monoclonal.

ADHERENCIA CELULAR.

Esta línea celular se adhiere a superficies de plástico, como la mayoría de células procedentes de gliomas descritas en la literatura. Son células fuertemente adherentes que condicionan su morfología.

En la Tabla III se observa la dinámica de adherencia de estas células a lo largo del tiempo.

EFECTO DE LA CONGELACION SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

Como se indica en la Tabla IV la viabilidad de estas celulas tras diferentes periodos de congelacion en Nitrogeno liquido no resulta afectada de manera significativa, siendo superior al 60% en la mayoria de los casos.

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA.

Se estudio la capacidad de proliferacion de estas celulas mediante la obtencion del Tiempo de Doblaje, esto es el tiempo en que se duplica el numero de celulas en un cultivo. Como se indica en la Tabla V el Tiempo de Doblaje de estas celulas es de 4 dias.

EFECTO DE LA CONGELACION SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR.

En la Tabla VI observamos como la linea celular MSM no experimenta modificaciones significativas en su capacidad de crecimiento tras permanecer congelada en Nitrogeno liquido durante diferentes periodos de tiempo.

Siguiendo la normativa de la ATCC (American Tissue Culture Collection) para que una linea celular pueda ser definida, debe tener la potencialidad de ser mantenida indefinidamente "in vitro". En general se acepta que una linea celular ha de tener capacidad para ser "pasada" al menos 70 veces desde su primer aislamiento; o bien, ser congelada y crecida sucesivamente durante nueve veces.

Nuestra linea no experimento deterioro de la capacidad proliferativa despues de mas de nueve congelaciones y posterior crecimiento.

ESTUDIO DE LA EXPRESION DE LAS MOLECULAS HLA CLASE I Y CLASE II.

Como puede observarse en la Tabla VII la linea celular MSM no expresa moleculas HLA clase I (HLA-ABC) ya que el porcentaje de celulas que reaccionan positivamente con el Ac.Mo. W-6/32 en ningun momento es superior al "background".

Igualmente esta linea celular tampoco expresa moleculas HLA clase II (HLA-DR,DP,DQ) estudiadas mediante su reaccion con los Ac.Mo. L-243, L-227, EDU-1 y Tu-22.

EFEECTO DEL TRATAMIENTO DE LA LINEA MSM CON GAMMA INTERFERON:

El tratamiento de las células de la línea MSM con 100 UI/ml de Gamma Interferon humano no ejerce ningún efecto inductor de la expresión de la expresión de moléculas HLA clase I o clase II. Como puede observarse en la Tabla VIII el patrón de reacción de esta línea celular con los distintos Ac.Mo. anti-HLA no se modifican tras la adición al cultivo de Gamma Interferon, es decir el porcentaje de células que reaccionan positivamente con los diferentes Ac.Mo. anti-HLA no experimenta variaciones significativas.

EFEECTO DEL TRATAMIENTO DE LA LINEA MSM CON TPA:

Como puede observarse en la Tabla IX el tratamiento de las células MSM con 100 ng/ml de TPA induce la expresión "de novo" de moléculas HLA clase I y clase II (HLA-DR/DP).

Se observa un incremento en el porcentaje de células que reaccionan positivamente con el Ac.Mo. W-6/32 tras tres días de tratamiento (40%) incremento que alcanza su máximo nivel al quinto día del tratamiento con TPA (80%).

Igualmente se observa al tercer día de tratamiento con TPA un incremento en el porcentaje de células que reaccionan positivamente (15%) con el Ac.Mo. anti HLA-DR L 243, incremento que alcanza su máximo nivel al quinto día de tratamiento (45%), fenómeno que puede observarse igualmente para los Ac.Mo. L-227 y EDU-1. El porcentaje de células que reaccionan con el Ac.Mo. anti HLA-DQ Tu-22 no se modifica tras el tratamiento con TPA.

En resumen el tratamiento con TPA de las células MSM induce una fuerte expresión de moléculas HLA-ABC, y una expresión moderada de moléculas HLA-DR/DP, no induciendo la expresión de moléculas HLA-DQ.



Fig. I.- a.

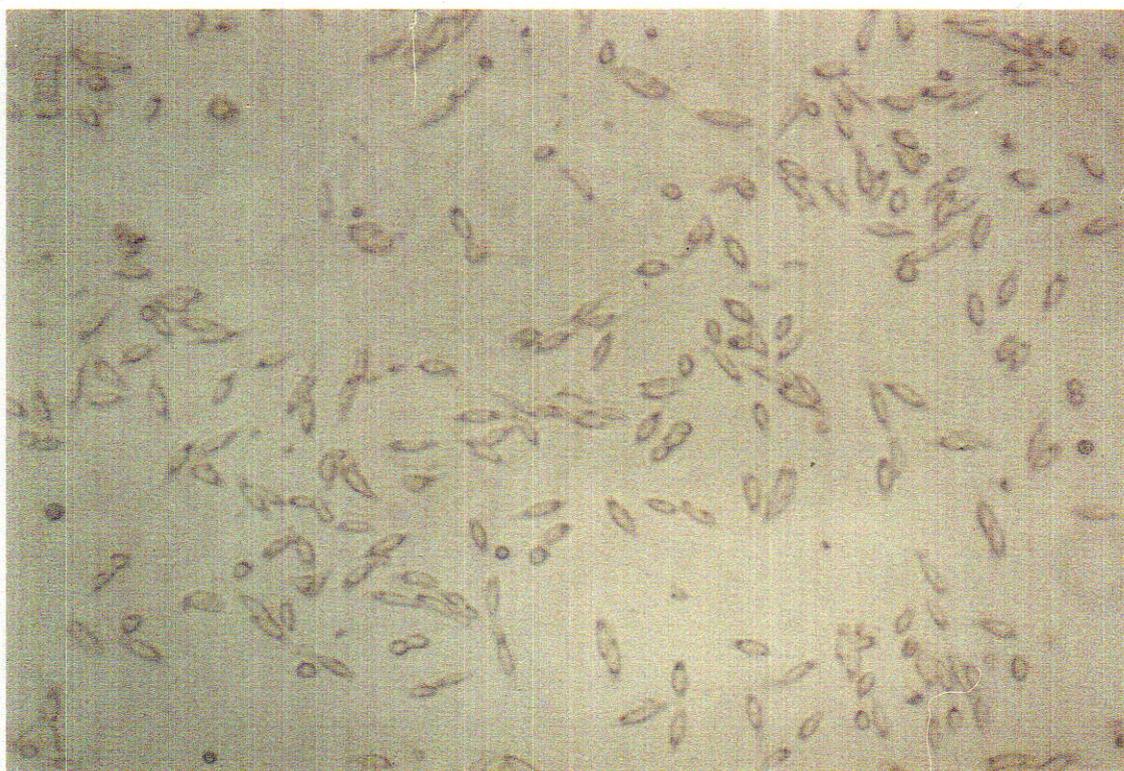


Fig. I.- b.

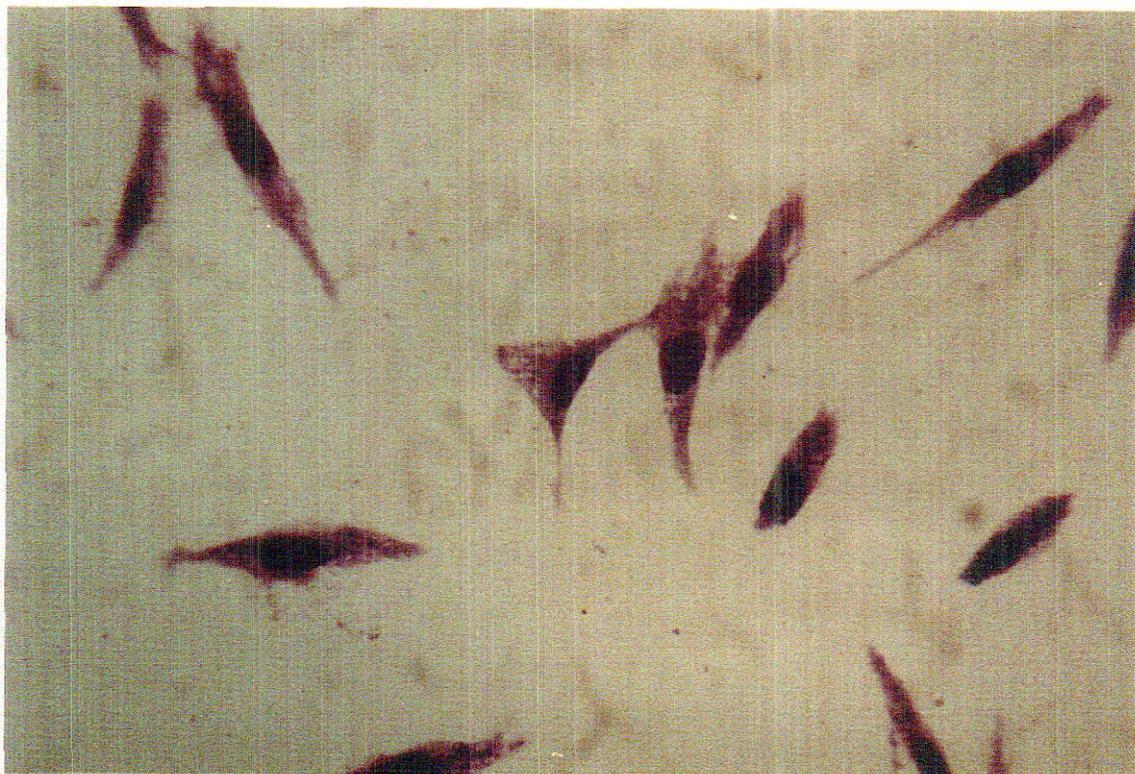


Fig. II.- a.



Fig. II.- b.



Fig. II.- c.



Fig. II.- d.

TABLA III:
DINAMICA DE ADHERENCIA DE LAS CELULAS MSM.

CONCENTRACION		TIEMPO			
		30min.	60min.	2h.	3h.
25.000	EXP.1	5	50	75	100
	EXP.2	4	50	72	98
	EXP.3	5	47	76	100
50.000	EXP.1	5	48	74	99
	EXP.2	6	52	75	98
	EXP.3	7	50	74	100
70.000	EXP.1	5	48	90	100
	EXP.2	6	50	88	97
	EXP.3	5	54	92	100
100.000	EXP.1	4	50	90	100
	EXP.2	5	50	86	98
	EXP.3	5	48	90	100

PORCENTAJE DE CELULAS ADHERIDAS

TABLA IV:

EFFECTO DEL TIEMPO DE CONSERVACION EN NITROGENO LIQUIDO SOBRE
LA VIABILIDAD CELULAR.

PORCENTAJE DE CELULAS VIABLES*			
TIEMPO	EXP.1	EXP.2	EXP.3
7 Dias	77	65	95
15 Dias	80	75	90
30 Dias	62	75	99
3 Meses	70	90	85
6 Meses	65	85	90

* Determinados por el Metodo de Exclusion del Tripan
Azul.

EXP:Experimento.

TABLA V:

CRECIMIENTO DE CELULAS MSM PROCEDENTES DE CULTIVOS DE UNA SEMANA.

TIEMPO	EXP. 1	EXP. 2	EXP. 3
0	50.000*	50.000	50.000
2 d.	60.000	55.000	50.000
3 d.	72.500	65.000	65.000
4 d.	115.000	90.500	90.000
5 d.	168.000	120.000	170.000
6 d.	225.000	260.000	275.000

* células viables / ml.

TABLA VI:

EFFECTO DE LA CONGELACION SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR.

TIEMPO DE CONGELACION.	TIEMPO DE CULTIVO.					
	0	2	4	6	8 Dias	
	EXP.1	50.000	60.000	115.000	310.000	480.000
7 Dias	EXP.2	50.000	62.000	116.000	313.000	485.000
	EXP.3	50.000	60.000	114.000	307.000	475.000
	EXP.1	50.000	65.000	120.000	425.000	450.000
1 Mes	EXP.2	50.000	66.000	119.000	430.000	460.000
	EXP.3	50.000	65.000	122.000	422.000	445.000
	EXP.1	50.000	75.000	123.000	450.000	490.000
3 Meses	EXP.2	50.000	72.000	124.000	445.000	500.000
	EXP.3	50.000	77.000	125.000	452.000	500.000

TABLA VII:

EXPRESION DE MOLECULAS HLA EN MSM.

Ac.Mo.	ESPECIFICIDAD	PORCENTAJE
W 6/32	HLA-ABC	6
L 243	HLA-DR	3
L 227	HLA-DR/DP	1
EDU 1	HLA-DR/DP	0
Tu 22	HLA-DQ	0

Ac.Mo.: Anticuerpo Monoclonal.

TABLA VIII:

PORCENTAJE DE CELULAS MSM REACTIVAS POSITIVAMENTE CON Ac.Mo.
 TRAS EL TRATAMIENTO CON 100 UI/ml DE GAMMA-INTERFERON HUMANO.

Ac.Mo.	DIAS DE INCUBACION			
	0	1	2	3
W 6/32	6	8	7	3
L 243	3	2	5	3
L 227	1	1	7	8
EDU 1	0	1	3	3
Tu 22	0	2	0	0

Ac.Mo.: Anticuerpo Monoclonal.

TABLA IX:

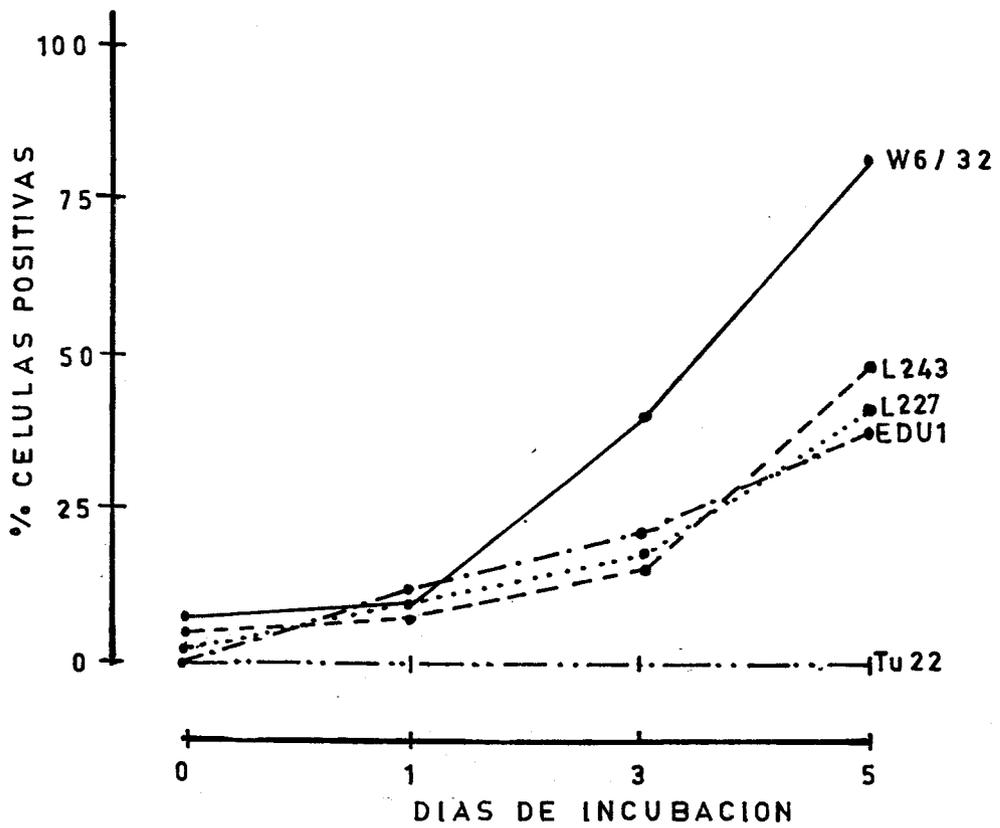
PORCENTAJE DE CELULAS MSM REACTIVAS POSITIVAMENTE CON Ac.Mo.
 TRAS EL TRATAMIENTO CON 100 ng/ml DE TPA.

DIAS DE INCUBACION				
Ac.Mo.	0	1	3	5

W 6/32	6	10	40	80
L 243	3	7	15	45
L 227	1	10	17	40
EDU 1	0	12	20	38
Tu 22	0	0	0	0

Ac.Mo.: Anticuerpo Monoclonal.

MS M+ 100 ng/ml TPA.



————— W6/32
----- L243
..... L227
- . - . - . EDU1
- - - - - Tu 22

DISCUSSION

La adaptacion de celulas tumorales a condiciones de cultivo "in vitro" supone hoy dia una de las bases de los estudios bioquimicos y moleculares en la oncologia moderna.

Asi, solo por citar un ejemplo, la mayoria de los avances realizados en el estudio del papel de los oncogenes en los procesos de transformacion neoplasica se han realizado utilizando lineas celulares de crecimiento "in vitro".

En el presente trabajo hemos adaptado a cultivo celulas tumorales procedentes de un glioma, analizando algunos parametros de su dinamica de crecimiento "in vitro" y estableciendo finalmente una linea celular de crecimiento continuo.

Esta linea celular es fuertemente adherente al plastico (Tabla III) lo que determina su morfologia que siguiendo a BIGNER y cols. (1.981), puede ser definida como "similar a fibroblastoma".

Estos autores definen 4 tipos diferentes de lineas derivadas de gliomas segun su morfologia: fibroblastica, epitelial, fascicular y glial.

En nuestra linea celular la poblacion predominante crece en monocapa de celulas bipolares o triangulares, con nucleos ovalados y abundantes figuras de celulas binucleadas y en procesos de mitosis. Facilmente visibles tanto al Microscopio Invertido como con la Tincion con Azul-Eosina(Figuras 1 y 2).

La mayoria de las celulas tumorales, e incluso celulas normales, poseen una capacidad limitada de crecimiento "in vitro" durante cortos periodos de tiempo, es lo que se denomina "cultivos primarios". Un cultivo primario seria considerado como tal hasta que existieran evidencias de que existen procesos de division celular, tras lo cual pasaria a ser considerado como linea celular.

Hoy dia, siguiendo las normas de la "American Tissue Culture Corporation" se pueden considerar dos grandes tipos de lineas celulares: de vida finita y lineas celulares de crecimiento continuo.

Ambas poseen capacidad de proliferar en condiciones de cultivo, pero mientras las primeras moririan tras un numero determinado de pases, las segundas se definen como aquellas que mantienen su capacidad de crecer tras ser pasadas al menos 70

veces o tras ser sometidas a 9 ciclos de congelacion-descongelacion en Nitrogeno liquido.

Asi pues tras establecer que estas celulas tumorales mantenian su viabilidad y mas aun, experimentaban crecimiento tras 30 dias de cultivo primario, realizamos una serie de experimentos encaminados a estudiar el efecto de la congelacion y la conservacion en Nitrogeno liquido sobre la viabilidad celular.

Como se indica en la Tabla IV tras ser sometidas a congelacion en Nitrogeno liquido siguiendo la metodica habitual en nuestro Departamento, indicada en Material y Metodos, y descrita por WILLIANS y cols. (1.983), la viabilidad resultante es superior al 60%, llegando en algunos casos a un 95% de viabilidad, siendo por tanto semejante a la observada por nosotros en otras lineas celulares utilizando este metodo de congelacion.

La viabilidad resultante es independiente del tiempo que estas celulas han sido conservadas en N₂ liquido (Tabla IV).

Igualmente tras el proceso de congelacion-descongelacion, estas celulas mantienen su capacidad proliferativa (Tabla VI).

incrementandose el numero de celulas segun una dinamica exponencial hasta cifras de aproximadamente 500.000/ml cuando estas celulas alcanzan la confluencia en el pocillo de la placa de cultivo.

Al analizar su dinamica de crecimiento (Tabla V) se observa que su tiempo de doblaje en la fase exponencial de crecimiento es de 48 horas, ligeramente inferior al de 66 ± 10 horas descrito por BIGNER y cols. (1.981) para distintas lineas celulares derivadas de gliomas.

Por ultimo, dentro de esta serie de estudios encaminados al establecimiento y definicion inicial de esta linea celular y con el objeto de definir si esta era una linea celular de vida finita o si por el contrario era de crecimiento continuo, un determinado lote de celulas congelado fue sometido de forma seriada a ciclos de congelacion-descongelacion y tras su posterior recuperacion nueva congelacion hasta un total de nueve. Nuestros resultados (Tabla VI) indican que las celulas mantienen su viabilidad y tambien su capacidad de crecimiento sin modificaciones significativas. Tampoco se observan alteraciones en la morfologia, ni en la forma de crecimiento.

Tras estos estudios pues podemos concluir que la línea celular MSM establecida a partir de células tumorales de un glioma es una línea celular de crecimiento continuo "in vitro" que nos permitiera estudiar diferentes compuestos bioquímicos y moleculares implicados en los procesos de oncogénesis.

Como se indica en la introducción, para que una célula normal forme un tumor maligno, no es solo necesaria la transformación neoplásica lo que conllevaría el crecimiento incontrolado de esa célula, sino que también ha de evadir la vigilancia inmune antitumoral. Si bien se han descrito diversos mecanismos por los cuales distintos tumores pueden bloquear determinados aspectos funcionales del Sistema Inmune, en los últimos años se han puesto de evidencia la importancia que juegan las moléculas del Sistema Mayor de Histocompatibilidad en el desarrollo y malignidad tumoral.

La existencia de estas moléculas en la membrana celular es imprescindible para que los linfocitos T del huésped puedan reconocer los antígenos extraños asociados al tumor y pueda por tanto iniciar una respuesta inmune eficaz que finalice con la

destrucción de la célula tumoral por los linfocitos T citotóxicos.

Así, en los últimos años, se ha sugerido que uno de los mecanismos por los cuales las células tumorales escapan a la vigilancia del Sistema, podría ser la pérdida de la expresión de las moléculas HLA-ABC. En este caso, los linfocitos T citotóxicos no podrían reconocer los antígenos tumorales, en asociación con las moléculas HLA clase I y de esta forma esas células tumorales serían resistentes a la acción tumoricida de los linfocitos citotóxicos.

En este sentido, diversos grupos de investigación entre los que se incluye nuestro laboratorio, ha comenzado el estudio de la expresión de los antígenos HLA en tumores humanos de diversos orígenes.

Así, FLEMING y cols. (1.981) realizaron estudios sobre cáncer de mama mediante técnicas de Inmunofluorescencia indirecta y demostraron que solo nueve de los diecisiete casos estudiados expresaban niveles detectables de moléculas HLA clase I. De igual modo WEISS y cols. (1.981) encuentran heterogeneidad al estudiar once carcinomas mamarios, siendo cinco negativos y seis positivos.

BHAN y DESMARAIS (1.983) analizan una serie de setenta y ocho casos de cancer mamario, de los cuales treinta y cinco expresaban menos de un veinticinco por ciento de HLA-ABC y el resto no lo expresaban. Estos autores estudiaron la posible correlacion existente entre la expresion antigenica y el grado de extension de la neoplasia, no hallando ningun tipo de correlacion entre estos parametros. NATALI y cols. (1.983) comunican resultados similares de heterogeneidad en la expresion de moleculas clase I en cancer mamario.

NATALI y cols. (1.984) analizan una amplia gama de neoplasias malignas de muy diversa procedencia, primarias y metastasicas, y la conclusion general es que las moleculas HLA clase I estan expresadas de forma heterogenea en los diversos tipos de neoplasia.

En este sentido, los trabajos realizados en nuestro Departamento a cerca de la expresion de moleculas HLA-ABC en tumores frescos del aparato digestivo, muestra concordancia en cuanto a la heterogeneidad de expresion antigenica HLA, pero se ha establecido una clara relacion entre la expresion de antigenos HLA-ABC y el grado de diferenciacion histologica de las neoplasias. Asi, aquellos tumores

mas indiferenciados (independientemente de su origen) son los que no expresan antígenos HLA clase I, mientras que los tumores mas diferenciados expresan niveles detectables de tales moléculas (GARCIA-ESPEJO y cols. 1.986).

La línea celular establecida por nosotros, MSM, procedente de un glioma humano (astrocitoma grado 2) carece de expresión superficial de las moléculas HLA clase I. En este sentido, la no expresión de moléculas HLA-ABC en la línea tumoral podría ser debido a dos posibles causas:

-Que las células tumorales hayan perdido la expresión de los antígenos HLA-ABC durante el proceso de tumorigénesis,

-Que las células tumorales pudieran proceder de una célula inmadura, la cual no expresara niveles detectables de tales moléculas.

En el caso de nuestra línea celular, es difícil establecer por cual de los dos mecanismos, se ha originado la no expresión de antígenos HLA clase I, ya que hasta el momento no se conoce en profundidad la expresión de moléculas HLA en las células normales de la glia.

Los estudios realizados a cerca de la expresion de antígenos HLA en el S.N.C., se han centrado fundamentalmente a nivel de las neuronas y duramadre. Asi, DAAR y cols. (1.984) establecen que las neuronas no expresan niveles detectables de antígenos HLA-ABC, mientras que la expresion de estos antígenos en duramadre es claramente evaluable. En lo que se refiere a las celulas gliales estos autores no han podido establecer resultados concluyentes, de expresion o no de moléculas HLA-ABC.

La no expresion de antígenos HLA clase I en la linea MSM podria estar relacionada con el grado de diferenciacion de las celulas tumorales, MSM deriva de un astrocitoma (grado 2), tumor maligno, y pobremente diferenciado, por lo que de acuerdo con lo establecido por GARCIA-ESPEJO y cols. (1.986) para neoplasias del aparato digestivo, cuanto menor es el grado de diferenciacion histologica, menor o nula es la expresion de moléculas HLA clase I.

En este sentido en nuestro laboratorio estamos realizando estudios a cerca de la expresion de antígenos HLA en tumores frescos del S.N.C.. Los resultados preliminares apuntan hacia una correlacion entre la ausencia de moléculas HLA-ABC y el grado de

malignidad del tumor. Asi, de quince tumores estudiados todos los benignos (6 meningiomas) expresan niveles altos de antígenos HLA-ABC, mientras que en ninguno de los malignos (1 meningosarcoma, 4 astrocitomas grado 2 y 4 astrocitomas grado 4) se observan niveles detectables de tales moléculas (R. SERRANO. Comunicacion Personal).

En lo que se refiere a las moléculas HLA clase II, el estudio de su expresion en células tumorales esta en una fase de iniciacion centrandose fundamentalmente en los HLA-DR. Asi se han realizado investigaciones en melanomas (NATALI y cols. 1.981), tumores mamarios (SOLANA y cols. 1.986), coriocarcinomas (TROWSDALE y cols. 1.980) y tumores del sistema digestivo (GARCIA-ESPEJO y cols. 1.986), no habiendose encontrado uniformidad en los resultados. El porcentaje de células tumorales que expresan moléculas HLA-DR observado por los autores antes mencionados, oscila desde el 0-65% en los diferentes tumores de las diversas localizaciones . En este caso no se ha encontrado correlacion alguna entre la expresion de moléculas HLA clase II y ningun parametro clinico-patologico.

En la línea MSM hemos estudiado la expresión de antígenos HLA clase II, considerando separadamente cada una de las series de moléculas que componen esta familia, es decir, los antígenos HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ. Los resultados muestran (Tabla VII) que la línea MSM no expresa los antígenos HLA-DR/DP, así como tampoco los HLA-DQ.

Hasta el momento la expresión de las moléculas HLA-DQ en células tisulares normales o neoplásicas es poco conocida, dada la dificultad que conlleva conseguir reactivos biológicos que permitan identificar de forma independiente las moléculas HLA-DQ de las moléculas HLA-DR o HLA-DP. En nuestro estudio se ha utilizado un anticuerpo monoclonal, Tu-22, para identificar los antígenos HLA-DQ de forma independiente del resto de las moléculas HLA clase II, que es el único Ac.Mo. monomorfo existente en la actualidad.

En lo que se refiere a la distribución de los antígenos HLA-DR en células normales, esta parece estar limitada a los monocitos, linfocitos B, linfocitos T activados, precursores hematopoyéticos y células epiteliales de diferentes tejidos (ALONSO y cols. 1.985 a,b; 1.986 a; WILLIAMS y cols. 1.980;

FUGGLE y cols. 1.983; DAAR y cols. 1.984). Asi pues la no expresion de moléculas HLA clase II en células tumorales de diferentes orígenes, entre las que se incluiría nuestra línea MSM, no parece ser consecuencia de su pérdida durante el proceso de malignización, sino más bien el reflejo de lo que ocurre en las células tisulares normales.

La adaptación al crecimiento "in vitro" de células tumorales y su posterior establecimiento como líneas celulares, ha permitido, en los últimos años, la realización de diferentes estudios, encaminados a un mejor conocimiento de la biología de la célula tumoral. Así, diferentes líneas celulares, fundamentalmente derivadas de leucemias, han constituido inmejorables modelos para el estudio de la codificación genética y la regulación de la síntesis de los antígenos HLA. En este sentido, ha sido demostrado que la expresión de moléculas HLA clase II en células leucémicas puede ser regulada por agentes inductores de la diferenciación celular como es el éster de forbol TPA.

Así las líneas leucémicas promielocíticas HL-60 y ML-2, que constitutivamente no expresan moléculas HLA-DR, después del tratamiento con TPA, las células

se encuentran en un estadio posterior de maduración y si van a expresar los antígenos HLA-DR, de forma que su fenotipo se adapta al que corresponde a su nuevo status madurativo (ALONSO y cols. 1.986 b). De forma similar ocurre en líneas leucémicas de estirpe linfoide donde el TPA es capaz de inducir maduración de la línea leucémica linfoblástica B, NALM/6, inicialmente negativa para moléculas HLA-DQ, de forma que después del tratamiento se produce la expresión "de novo" de estos antígenos (NAVARRETE y cols. 1.986).

En este trabajo hemos estudiado el efecto del TPA, sobre la línea celular MSM, constitutivamente negativa tanto para las moléculas HLA-ABC, como para los antígenos HLA-DR o HLA-DQ, observándose que el TPA a la dosis empleada de 100ng/ml, induce después de tres días de tratamiento la expresión de moléculas HLA-ABC, expresión que alcanza su máximo nivel el día 5 postinducción (Tabla IX). Igualmente se observa que el TPA induce la expresión de moléculas HLA-DR y HLA-DR/DP, en una cierta proporción de las células MSM después de tres días de tratamiento, pero no de expresión de antígenos HLA-DQ.

Esta induccion diferencial de la expresion de las moleculas HLA clase II esta en concordancia con el hecho observado, para ciertos tipos de leucemias mieloblasticas en que el tratamiento con TPA es capaz de inducir "de novo" la expresion de moleculas HLA-DR pero no la expresion de antigenos HLA-DQ (ALONSO y cols. 1.986 b). La expresion de antigenos HLA-DR y no de los HLA-DQ en ciertas lineas celulares y celulas normales mielomonociticas corroboran la hipotesis propuesta por ALONSO y cols. (1.985 b, 1.986 a) de que la regulacion de la expresion de las moleculas HLA clase II, no se realiza de una forma coordinada, sino que cada una de las familias de antigenos HLA clase II estan sujetos a mecanismos de control independientes, como lo demuestra el hecho de que en celulas leucemicas y en celulas normales hematopoyeticas, estan expresadas solo una de las series de antigenos HLA clase II.

En lo que se refiere a la posibilidad de inducir la expresion de moleculas HLA, otro de los agentes mas empleados es el Gamma Interferon. Este, es un agente biologico producido por los linfocitos y se sabe que es capaz de incrementar la expresion de moleculas HLA en celulas de diferentes origenes.

En nuestro estudio hemos utilizado Gamma Interferon humano a dosis de 100 UI/ml, para tratar de inducir la expresion de antígenos HLA-clase I y clase II, en la linea celular MSM. Como se observa en la tabla VIII, el Gamma Interferon a la dosis empleada por nosotros, no posee efecto inductor de moléculas HLA ni clase I ni clase II en la linea MSM, despues de 1, 2 o 3 dias de tratamiento.

El Gamma Interferon, es conocido de inducir expresion de antígenos HLA-ABC en la linea leucémica K562, asi como tambien antígenos HLA-clase II en las lineas leucémicas mieloblasticas U937, KG-1, HL-60 y ML-2 (ALONSO y cols.,1.986b). Igualmente ha sido descrito un efecto inductor de antígenos HLA-DR en lineas celulares derivadas de melanomas humanos (PARMIANI 1.985).

La no induccion de antígenos HLA tanto ABC como DR o DQ en nuestra linea celular MSM, derivada de un glioma, podria estar relacionada con un efecto selectivo del Gamma Interferon, por células de determinadas estirpes, ya que hasta el momento solo se ha demostrado efecto inductor de antígenos HLA para células de estirpe mieloide y dermomelanocítica.

CONCLUSIONES

1-Se ha obtenido una linea celular, derivada de un tumor maligno glial, a la que se ha denominado MSM, compuesta por celulas adherentes y de morfologia fusiforme.

2-La linea celular MSM posee capacidad de crecimiento continuo "in vitro" estableciendose su tiempo de doblaje en 48h. Su viabilidad y capacidad de crecimiento no experimenta modificaciones tras ser sometida a ciclos de congelacion-descongelacion sucesivas.

3-La linea celular MSM no expresa antigenos HLA-ABC reconocidos por el Anticuerpo Monoclonal W-6/32, asi como tampoco ninguna de las series de antigenos HLA clase II reconocidos por los Ac.Mo. L-243 (antiDR), L-227 (antiDR/DP), EDU-1 (antiDR/DP) y Tu-22 (antiDQ).

4-Las moléculas HLA-ABC y HLA-DR son inducibles en esta línea celular por el tratamiento con el Ester de Forbol TPA, no teniendo este agente ningún efecto inductor de las moléculas HLA-DQ.

5-El agente biológico Gamma Interferon no induce la expresión "de novo" de antígenos HLA clase I y tampoco de HLA clase II en la línea celular MSM.

B I B L I O G R A F I A

ADINOLFI, M.; AKLE, C.A.; McCOLL, I.; FENSOM, A.H.; TANSLEY, L.; CONNOLLY, P.; HSI, B.L.; FAULK, W.P.; TRAVERS, P. and BODMER, W.F. (1.982), Expression of HLA antigens, beta-2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. *Nature*, 295:325.

ALLEN, F.; AMOS, D.B.; BATCHELOR, R.; BODMER, W.F.; CEPPELLINI, R.; DAUSSET, J.; ENGELFREIT, C.; JEANNET, M.; KISSMEYER-NIELSEN, F.; MORRIS, P.; PAYNE, R.; TERASAKI, P.; ROOD, J.J. Van; WALFORD, R.; ZMIJEWSKI, C.; ALBERT, E.; MATTIUZ, P.; MICKEY, M.R. and PIAZZA, A. (1.970), Joinreport of the fourth International Histocompatibility Workshop. En: *Histocompatibility Testing 1.970*, TERASAKI, P.I. (ed.), p.17, Munksgaard, Copenhagen.

ALLEN, F.H.Jr. (1.974), Linkage of HLA and GBG. *Vox Sang.*, 27:382.

ALONSO, M.C.; SOLANA, R.; TORRES, A.; RAMIREZ, R.; NAVARRETE, C.; PEÑA, J. and FESTENSTEIN, H. (1.985 a). Study of the antigenic profile of normal

myelo-monocytic progenitors and leukaemic cell lines using monoclonal antibodies. En: Leukocyte Typing II: Human myeloid and haematopoietic cells, REINHERTZ y cols., (eds), 3:306, Springer Verlag, New York.

ALONSO, M.C.; NAVARRETE, C.; SOLANA, R.; TORRES, A.; PEÑA, J. and FESTENSTEIN, H. (1.985 b). Differential expression of HLA-DR and HLA-DQ antigens on normal cells of the myelo-monocytic lineage. Tissue Antigens, 26: 310-317.

ALONSO, M.C.; NAVARRETE, C.; SOLANA, R.; FERNANDEZ, N.; TORRES, A.; PEÑA, J. y FESTENSTEIN, H. (1.986 a). Estudio de la expresion de los antigenos HLA clase II a lo largo de la diferenciacion mielo-monocitica. Inmunologia, 4,3: 99-106.

ALONSO, M.C.; SOLANA, R.; NAVARRETE, C.; and FESTENSTEIN, H. (1.986 b). Modulation of the expression of HLA molecules on leukaemic cell lines using phorbol ester TPA and gamma interferon. J. Inmunogenet., en prensa.

ALPER, C.A. (1.978). Inherited structural polymorphism in human C2: evidence for genetic linkage between C2 and Bf. *J.Exp. Med.*, 144: 1111.

AMOS, D.B. (1.968 a). The application of leukocyte typing to human skin homotransplantation. *En: Proc. 11th. Congr. Int. Soc. Blood Transf., KARGER, S. (ed.), No.29, Part 2, p.628, Basel, Sidney.*

AMOS, D.B. and KOSTY, D.D. (1.980). HLA: a central immunological agency in man. *Adv. Hum. Genet.*, 10: 137.

ANDERSON, D.J.; BACH, D.L.; YUNIS, E.J. and DEWOLF, W.C. (1.982). Major histocompatibility antigens are not expressed on human epididymal sperm. *J. Immunol.*, 129/2:452.

ANDERSON, D.J.; NARAYAN, P. and DEWOLF, W.C. (1.984). Major Histocompatibility antigens are not detectable on postmeiotic human testicular germ cells. *J. Immunol.*, 133/4:1.962.

ARANDA, E. (1.981). Accion del suero de pacientes con carcinoma de vejiga en la transformacion linfoblastica y en la accion de las celulas K. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina, Universidad de Cordoba.

AUFFRAY, C.; BEN-NUN, A.; ROUX-DOSSETO, M.; GERMAIN, R.N.; SEIDMAN, J.G. and STROMINGER, J.L. (1.983). Polymorphism and complexity of human DC and murine I-A alpha-chain genes. EMBO. J., 2:121.

BALL, E.J. and STASTNY, P.(1.984). Antigen specific HLA restricted human-T cell lines. II. A GAT-specific T-cell line restricted by a determinant carried by an HLA-DQ molecule. Immunogenetics, 20:547.

BATCHELOR, J.R. and CHAPMANN, B.A. (1.967). Genetic background and transplantation antigens. J. Clin. Pathol., 20:415.

BERNARDS, R.; SCHRIER, P.I.; HOUWELLING, A.; BOS, J.L.; EB, A.J. Van der; ZIJLSTRA, M. and MELIEF, C.J.M. (1.983). Tumorigenicity of cells transformed by adenovirus type 12 by evasion of T-cell immunity. Nature, 305:776.

BEVAN, H.G. (1.975). The MHC determines susceptibility to cytotoxic T-cells directed against minor histocompatibility antigens. *J. Exp. Med.*, 142:1349.

BHAN, A.K. and DESMARAIS, CH.L. (1.983). Immunohistologic characterization of major histocompatibility antigens and inflammatory cellular infiltrate in human breast cancer. *JNCI*, 71/3:507.

BIGNER, D.D.; BIGNER, S.H.; PONTEN, J.; WESTERMARK, B.; MAHALEY, M.S.; RUOSLAHTI, E.; HERSCHMAN, H.; ENG, L.F. and WIKSTRAND, C.J. (1.981). Heterogeneity of genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from Human Gliomas. *Journal of Neurophatology and Experimental Neurology*. 40/3 p.201-229.

CEPPELLINI, R.; CURTONI, E.S.; MATTIUZ, P.L.; MIGGIANO, V.; SCUDELLER, G. and SERRA, A. (1.967). Genetics of leukocyte antigens. A family study of segregation and linkage. *En: Histocompatibility Testing 1.967*, CURTONI, E.S.; MATTIUZ, P.L.;

MIGGIANO, V.; SCUDELLER, G. and SERRA, A. (1.967). Genetics of leukocyte antigens. A family study of segregation and linkage. En: Histocompatibility Testing 1.967, CURTONI, E.S.; MATTIUZ, P.L. and TOSSI, R.M. (eds), p. 149, Munkasgaard, Copenhagen.

CRESSWELL, P.; TURNER, M.J. and STROMINGER, J.L. (1.973). Papain solubilized HLA antigens from cultured human lymphocytes contain two peptide fragments. Proc.Natl. Acad. Sci. USA., 70:1603.

DAAR, A.S.; FUGGLE, S.V.; FABRE, J.W.; TING, A. and MORRIS, P.J. (1.984 a). The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. Transplantation, 38/3: 287.

DAAR, A.S.; FUGGLE, S.V.; FABRE, J.W.; TING, A. and MORRIS, P.J. (1.984 b). The detailed distribution of MHC class II antigens in normal human organs. Transplantation, 38/3: 293.

DAUSSET, J. (1.958). Iso-leuco-anticorps. Acta Haemat. (Basel), 20: 156.

DAUSSET, J.; IVANYI, P. and IVANYI, D. (1.965).
Tissue alloantigens in humans. Identification of a
complex system (Hu-1). En: *Histocompatibility Testing*
1.965, BALNER et al. (eds) p. 51, Munksgaard,
Copenhagen.

DOYLE, A.; MARTIN, J.; FUNA, K.;GAZDAR, A.; CARNEY,
D.; MARTIN, S.E.; LINNOILA, I.; CUTTITTA, F.;
MULSHINE, J.; BUNN, P. and MINNA, J. (1.985).
Markedly decreased expression of class I
histocompatibility antigens, protein, and mRNA in
human Small-cell lung cancer. *J.Exp.Med.*, 161:1135.

DUQUESNOY, R.J.; MARRARI, M. and ANNEN, K. (1.979).
Identification of HLA-DR associated system of B cell
alloantigens. *Transplant. Proc.*, 11: 1757.

DUQUESNOY, R.J. and MARRARI, M. (1.980). MB system.
En: *Histocompatibility Testing 1.980*. TERASAKI, P.I.
(ed). p. 552. UCLA Press, Los Angeles.

EISENBACH, L.; SEGAL, S. and FELDMAN, M. (1.983). MHC
imbalance and metastatic spread in Lewis lung
carcinoma clones. *Int. J. Cancer*, 32: 113.

EISENBACH, L.; HOLLANDER, N.; SEGAL, S. and FELDMAN, N. (1.985). The differential expression of class I MHC antigens controls the metastatic properties of tumor cells. *Transplantation Proc.*, XVII/1: 729.

FELLOUS, M. and DAUSSET, J. (1.970). Probable haploid expression of HLA antigens on human spermatozoon. *Nature*, 225:191.

FERNANDEZ, N.; SOLANA, R.; SACHS, J.A.; NAVARRETE, C. and FESTENSTEIN, H. (1.984). Characterization of 59 workshop monoclonal antibodies using panels of EBV transformed HTC's and deletion mutant cell lines. *Disease Markers*, 2:197.

FERRONE, S.; ALLISON, J.P.; PELLEGRINO, M.A. (1.978). Human DR (Ia like) antigens: biological and molecular profile. *Contemp. Top. Mol. Immunol.*, 7:239.

FESTENSTEIN, H.; SCHMIDT, W.; ALONZO, A. and LEBEN, L. (1.982). Influence of selective absence of H-2k on gross virus leukaemias in vitro and the implications for in vivo surveillance of leukaemia.

En: Protives of the biological fluids, 29th. Colloquium 1.981. PEETERS, H. (ed). p. 231. Pergamon Press. Oxford and New York.

FESTENSTEIN, H.; NAVARRETE, C.; JARAQUEMADA, D. and FAINBOIM, L. (1.984). The role of HLA class II antigens in cell mediated inmunity potential importance of the selective absence of HLA-DC antigens from acute leukaemias. Disease Markers, 2: 295.

FLEMING, K.A.; McMICHAEL, A.; MORTON, J.A.; WOODS, J. and McGEE, J.O'D. (1.981). Distribution of HLA class I antigens in normal human tissue and in mammary cancer. J.Clin. Pathol., 34: 779.

FU, S.M.; KUNKEL, H.G.; BRUSMAN, H.P.; ALLEN, F.G. and FOTINOC, M. (1.974). Evidence for linkage between HLA histocompatibility genes and those involved in the synthesis of second component of complement. J.Exp.Med., 140: 1108.

FUGGLE, S.V.; ERRASTI, P.; DAAR, A.S.; FABRE, J.W.;
TING, A. and MORRIS, P.J. (1.983). Localization of
major histocompatibility complex (HLA-A,B,C and DR)
antigens in 46 kidneys. *Transplantation*, 35/4: 385.

GARCIA-ESPEJO, R.; ALONSO, M.C.; SOLANA, R.; PERA, C.
and PEÑA, J. (1.986). Expression on HLA molecules
from Human fresh explanted digestive cancer. *J.
Immunogenetics*. (En prensa).

GOODFELLOW, P.N.; JONES, E.A.; HAYNINGEN, V.Van;
SOLOMON, E.; BURROW, M.; MIGGIANO, V. and BODMER,
W.F. (1.975). Beta-2-microglobulin gene is on
chromosome 15 and not on the HLA region. *Nature*, 245:
267.

GOODFELLOW, P.N.; BARNSTABLE, C.J.; BODMER, W.F.;
SNARY, D. and CRUMPTON, M.J. (1.976). Expression of
HLA system antigens on placenta. *Transplantation*,
22/6:595.

GORDON, R.D.; SIMPSON, E.; SAMELSON, L.E. (1.975). In
vitro cell-mediated immune responses to male specific
(H-Y) antigen in mice. *J.Exp.Med.*, 142: 1108.

GOULMY, E.; TERMIJTELEN, A.; BRADLEY, B.A. and ROOD, J.J. Van (1.976). HLA restriction on non-HLA-A,B,C, and -D cell mediated lympholysis (CML). *Tissue Antigens*, 8: 317.

GOULMY, E. TERMIJTELEN, A.; BRADLEY, B.A. and ROOD, J.J. Van. (1.977). Y-antigen killing by T-cells of women is restricted by HLA. *Nature*, 266: 544.

GOYERT, S.M.; SHIVELY, J.E. and SILVER, J. (1.982). Biochemical characterization of a second family of human Ia molecules, HLA-DS, equivalent to murine I-A subregion molecules. *J.Exp.Med.*, 156: 550.

GREAVES, M.F.; VERBI, W.; FESTENSTEIN, H.; PAPASTERIADIS, C.; JARAQUEMADA, D. and HAYWARD, A. (1.979). Ia-like antigens on human T-cells. *Eur.J.Immunol.*, 9: 356.

GREY, H.M.; KUBO, R.T.; COLON, S.M.; POULIK, M.D.; CRESWELL, P.; SPRINGER, T.; TURNER, M. and STROMINGER, J.L. (1.973). The small subunit of HLA antigens is Beta-2-microglobulin. *J.Exp.Med.*, 138: 1608.

HALLIM, A.; ABBASI, K. and FESTENSTEIN, H. (1.974).
The expression of the HLA antigens on human
spermatozoa. *Tissue Antigens*, 4: 1.

HAMMERLING, G. J. (1.985) HLA antigens in primary
colorectal carcinomas and metastases. *Symposium on
Histocompatibility antigens on tumours: Molecular
genetics and biology*. Granada, 1985.

HANSEN, H.E.; RYDER, L.P. and STAUB NIELSEN, L.
(1.975). Recombination between the second and the
third series of the HLA system. *Tissue Antigens*, 6:
275.

HART, D.N.J.; FUGGLE, S.V.; WILLIAMS, K.A.; FABRE,
J.W.; TING, A. and MORRIS, P.J. (1.981). Localisation
of HLA-A,B,C and DR antigens in human kidney.
Transplantation, 31/16: 428.

HIRSCHBERG, H.; MOEN, T. and THORSBY, E. (1.979).
Complement and cell mediated specified destruction of
human endothelial cells treated with anti-DRw
antisera. *Transplant. Proc.*, 11: 776.

HOSHINO, T.; BARKER, M.; WILSON, C.B.; BOLDREY, E.B.; FEWER, D. (1.972). Cell kinetics of human gliomas. *J.Neurosurg.* 37: 15-26.

HOSHINO, T.; WILSON, C.B.; ROSENBLUM, M.L.; BARKER, M. (1.975). Chemotherapeutic implications of growth fraction and cell cycle time in glioblastomas. *J.Neurosurg.* 43: 127-35.

HUI, K.; GROSVELD, F. and FESTENSTEIN, H. (1.984). Rejection of transplantable AKR leukaemia cells following MHC DNA-mediated cell transformation. *Nature*, 311: 750.

HURLEY, C.K.; GILES, R. and CAPRA, J.D. (1.984). The contribution of Monoclonal Antibodies to studies on the HLA-D region. *En: Disease Markers.* 2: 9-19.

ICARD, C.; LIEPKALNS, V.A.; YATES, A.J.; SINGH, N.P.; STEPHENS, R.E. and HART, R.W. (1.981). Growth characteristics of human glioma-derived and fetal neural cells in culture. *J. Neuropath. Exp.Med.N.*, 40/5: 512-525.

JONGSMA, A.; SOMEREN, H.Van; WESTERBELD, A.; HAGMEIJER, A. and PEARSON, P. (1.973). Localization of genes on human chromosomes by studies of human-chinese hamster somatic cell hybrids. Assignment of PGM3 to chromosome 6 and regional mapping of PGD, PGM1 and Pep-C genes on chromosome A1. *Humangenetik*, 20: 195.

KAUFFMAN, J.F. and STROMINGER, J.L. (1.982). HLA-DR light chain has a polimorphic N-terminal region and a conserved Ig-like C-terminal region. *Nature*, 297: 694.

KAWATA, M.; PARNES, J.R. and HERZENBERG, L.A. (1.984). Transcriptional control of HLA-A,B,C antigens in human placental cytotrophoblast isolated using trophoblast and HLA-specific monoclonal antibodies and the fluorescence activated cell sorter. *J.Exp.Med.*, 160: 633.

KAWATA, M.; SIZER, K.; SEKIYA, S.; PARNES, J.R. and HERZENBERG, L.A. (1.984). Limitation of differential expression of HLA-A,B,C antigens on choriocarcinoma cell lines by mRNA for HLA heavy chain but not by Beta-2-microglobulin. *Cancer Res.*, 44/9: 4011.

KISSMEYER-NIELSEN, F.; SVEJGAARD, A. and THORSBY, E. (1.971). Possibility of a third sub-locus. *Transplant. Proc.*, 3: 81.

KLARESKOG, L.; TJERNLUND, U.M.; FORSUM, U. and PETERSON, P.A. (1.977). Epidermal Langerhans cells express Ia antigens. *Nature*, 268: 248.

LAMM, L.U.; SVEJGAARD, A. and KISSMEYER-NIELSEN, F. (1.971). PGM-3: HLA is another linkage in man. *Nature (New Biology)*, 231: 109.

LINDGREN, A.; WESTERMARK, B.; PONTEN, J. (1.975). Serum stimulation of stationary human glia and glioma cells in culture. *Exp.Cell. Res.*, 95/311: 9.

LAMPSON, L.A. and LEVY, R. (1.980). Two populations of Ia like molecules on a human B-cell line. *J. Immunol.*, 125:293.

LOKE, Y.W.; JOYSEY, V.C. and BORLAND, R. (1.971). HLA antigens on human trophoblast cells. *Nature*, 232: 403.

LOPEZ DE CASTRO, J.A.; ORR, H.T.; ROBB, R.R.; KOSTYK, T.G.; MANN, D.L. and STROMINGER, J.L. (1.979). Complete aminoacid sequence of a papain solubilized human histocompatibility antigen HLA-B27. Isolation and aminoacid composition of fragments and tryptic and chymotryptic peptides. *Biochemistry*, 18: 5704.

LOW, B.; MESSETER, L.; MANSSON, S. and LINDHOLM, T. (1.974). Crossing-over between the SD-2 (FOUR) and SD-3 (AJ) loci of human histocompatibility chromosome region. *Tissue Antigens*, 4: 405.

MARK, J.; WESTERMARK, B.; PONTEN, J.; HUGOSSON, R. (1.977). Banding patterns in human glioma cell lines. *Hereditas*, 87: 243-60.

MEERA KHAN, P.; VOLTERS, P.; DOPPERT, W.S.; BIJNEN, B.A.; SCHREUDER, I. and ROOD, J.J. Van. (1.976). The locus for glyoxalase 1 (GLO) is between HLA-A and PGM-3 on chromosome 6 of man. En: Birth Deffects: Original Article Series, 12: 328.

MONTERO, M. (1.984). Estudio de la actividad de las celulas K y del efecto serico sobre dicha actividad en pacientes afectos de carcinoma de colon. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina, Universidad de Cordoba.

MOORE, M. (1.986) MHC class II antigens on colorectal carcinoma and malignant melanoma. En: MHC Antigens on Tumors. The London Hospital Medical College Bicentenary Scientific Meeting. Londres.

NADLER, L.M.; STRASHENKO, P.; HARDY, R.; TOMASELLI, K.J.; YUNIS, E.J.; SCHLOSSMAN, S.F. and PESANDO, J.M. (1.981). Monoclonal antibody indentifies a new Ia like polymorphic system linked to the HLA-D/DR region. Nature, 290: 591.

NAKAMURO, K.; TANIGAKI, N. and PRESSMAN, D. (1.973). Multiple common properties of human B2-microglobulin and the common portion fragment derived from the HLA antigen molecule. Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 70: 2863.

NATALI, P.G.; DE MARTINO, C.; QUARANTA, V.; NICOTRA, M.R.; FREZZA, F.; PELLEGRINO, M. and FERRONE, S. (1.981). Expression of Ia-like antigens in normal human nonlymphoid tissues. Transplantation, 31/1: 75.

NATALI, P.G.; QUARANTA, V.; NICOTRA, M.R.; APOLLONI, C.; PELLEGRINO, M.A. and FERRONE, S. (1.981). Tissue distribution of Ia-like antigens in different species: analysis with monoclonal antibodies. Transplant.Proc., XIII/1: 1026.

NATALI, P.G.; GIACOMINI, P.; BIGOTTI, A.; IMAI, K.; NG, A.K. and FERRONE, S. (1.983). Heterogeneity in the expression of HLA and tumor-associated antigens by surgically removed an cultured breast carcinoma cells. Cancer Res., 43: 660.

NATALI, P.G.; BIGOTTI, A.; CAVALIERE, R.R.; NICOTRA, M.R. and FERRONE, S. (1.984). Phenotyping of lesions of melanocyte origin with monoclonal antibodies to melanoma associated antigens and to HLA antigens. *JNCI*,73/1: 13.

NATALI, P.G.; BIGOTTI, A.; NICOTRA, M.R.; VIORA, M.; MANFREDI, D. and FERRONE, S. (1.984). Distribution of class I (HLA-A,B,C) histocompatibility antigens in normal and malignant tissues of nonlymphoid origin. *Cancer Res.*,44: 4679.

NAVARRETE, C.; FAINBOIM, L.; FESTENSTEIN, H.; LISTER, A.; AMESS, J. and GREAVES, M. (1.981). Selective expression of HLA-DR and HLA-MB antigens on acute leukaemic cells. En: *Leukaemia Markers*, KNAPP, W. (ed), p.65., Academic Press, London.

NAVARRETE, C.; FERNANDEZ, N.;ALONSO, M.C. and FESTENSTEIN, H. (1.986). Ontogenic and functional implications of the differential expression of HLA-DQ antigens on leukaemic cells. *Human Immunology*, 16:52.

OLAISEN, B.; GEDDE-DHAL, T. and THORSBY, E. (1.976).
Localisation of the human GLO gene locus. Human
Genet., 32: 301.

ORR, H.T.; LANCET, D.; ROBB, R.J.; LOPEZ DE CASTRO,
J.A. y STROMINGER, J.L. (1.979 a). The heavy chain of
human histocompatibility antigen HLA-B27 constains an
inmunoglobulin-like region. Nature, 282: 266.

ORR, H.T.; LOPEZ DE CASTRO, J.A. LANCET, D. and
STROMINGER, J.L. (1.979 b). Complete aminoacid
sequence of a papain solubilized human
histocompatibility antigen HLA-B27; 2. Sequence
determination and search for homologies.
Biochemistry, 18: 5711.

ORR, H.T.; LOPEZ DE CASTRO, J.A.; PARHAM, P.; PLOEGH,
H.L. and STROMINGER, J.L. (1,979 c). Comparison of
aminoacid sequences of two human histocompatibility
antigens, HLA-A2 y HLA-B27: location of putative
alloantigenic sites. Proc.Natl.Acd.Sci.USA., 76:
4395.

PARHAM, P.; BARNSTABLE, C.J. and BODMER, W.F. (1.979). Use a monoclonal antibody (W6/32) in structural studies of HLA-A,B,C antigens. *J. Immunol.*, 123:342.

PARK, M.S.; TERASAKI, P.I.; BERNOCO, D. and IVANYI, Y. (1.978). Evidence for a second B-cell locus separate from the DR locus. *Transplant.Proc.*, 10: 823.

PARK, M.S. and TERASAKI, P.I. (1.980). Second DR locus. En *Histocompatibility Testing 1.980*, TERASAKI, P.I. (ed), p.578, UCLA Press, Los Angeles.

PARK, M.S.; TERASAKI, P.I.; NATAKA, S. and AOKI, D. (1.980). Supertypic DR groups: MT1, MT2, and MT3. En: *Histocompatibility Testing 1.980*, TERASAKI, P.I. (ed), p854, UCLA Press, Los Angeles.

PARMIANI, G. (1.986). Cellular immune response to primary and metastatic cells: the human melanoma model. En: *International Conference on Biological and Therapeutic aspects of cancer metastasis*. Vitoria.

PEÑA, J.: "Bioquímica del Sistema Inmune". Bioquímica. E. Herrera. Interamericana. Madrid (1.985 a) cap.42 p.1007-1043.

PEÑA, J.; ALONSO, M.C.; SOLANA, R.; GARCIA-ESPEJO, R.; ROMERO, J.; RAMIREZ, R.; DIAZ-CASTELLANO, R. y PERA, C. (1.985). Heterogeneity in the expression of HLA molecules on cells from human fresh explanted digestive and mammary cancer. Symposium on Histocompatibility antigens on tumours: Molecular genetics and biology. Granada.

PEÑA, J. (1.986 a). Heterogeneity in the expression of HLA molecules on cells from human explanted digestive tumors. MHC Antigens on Tumors. The London Hospital Medical College Bicentenary Scientific Meeting. Londres.

PEÑA, J.; ALONSO, M.C.; SOLANA, R.; GARCIA-ESPEJO, R.; ROMERO, J.; RAMIREZ, R.; DIAZ-CASTELLANO, R. y PERA, C. (1.986 b). Heterogeneity in the expression of HLA molecules on cells from human fresh explanted

digestive cancer. En International Conference on Biological and Therapeutic aspects of cancer metastasis. Vitoria.

PETERSON, P.A.; CUNNIGHAM, B.A.; BERGGARD, I. and EDELMAN, G.M. (1.972). B2-microglobulin a free immunoglobulin domain Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 69: 1697.

PONTEN, J. (1.973). Human glia cells. En: Kruse P.F.; Patterson, M.K. Jr. (eds). Tissue culture, methods, and applications. New York: Academic Press, 50: 3.

REDMAN, D.W.G.; McMICHAEL, A.J.; STIRRATS, G.M.; SUNDERLAND, C.A. and TING, A. (1.984). Class I MHC antigens on human extravillous trophoblast. Immunology, 52: 4547.

RITTNER, Ch.; HAUPTMANN, G.; GROSSE-WILDE, H.; GROSSHANS, E.; TONGIO, M.M. and MAYER, S. (1.975). Linkage of HLA and genes controlling the synthesis of the fourth component of complement . En: Histocompatibility Testing 1.975, KISSMEYER-NIELSEN (ed), p.945, Munksgaard, Copenhagen.

ROOD, J.J. Van. LEEUWEN, A. Van: SCHIPPERS, A.;
VOOYS, W.H.: FREDERIKS, H.; BALNER, H. and EERNISSE,
J.G. (1.965). Leukocyte groups, the normal lymphocyte
transfer test and homograft sensitivity. En:
Histocompatibility Testing 1.965, BALNER, et al.
(ed), p.37, Munskgaard, Copenhagen.

ROSLONIEC, H.F.; KUHN, M.H.; GENYEA, C.A.; REED,
A.H.; JENNINGS, J.J.; GIRALDO, A.A.; BEISEL, K.W. and
LERMAN, S.P. (1.984). Agressiveness of SJL/J
lymphomas correlates with absence of H-2Ds antigens.
J. Immunol., 132: 945.

ROWDEN, G.; LEWIS, M.G. and SULLIVAN, A.K. (1.977).
Ia antigens on human epidermal Langerhans cells.
Nature, 268: 247.

SACHS, D.H. and CONE, J.L. (1.973). A mouse B-cell
alloantigen determined by gene(s) linked to the MHC.
J.Exp.Med., 138: 1289.

SANTONI, D.; WROBLEWSKA, Z.; GILDEN, D.H.; GIRARDI, A.; KOPROWSKI, I. (1.975). Human brain in tissue culture III-PML-SV40-induced transformation of brain cells and establishment of permanent lines. J. Comp.Neurol.161/317: 28.

SCHIRRMACHER, V. and FESTENSTEIN, H. (1.975). Activated lymphocytes express surface determinants with react with heterologous anti-B cell serum. J.Inmunogen.,2: 337.

SCHMIDT, G.M.; BROSS, K.; BLUME, K.G. and BEUTLER, E. (1.980). Demostration of HLA antigens on human skin fibroblast by the peroxidase-antiperoxidase method. Transplantation, 29: 344.

SCHMIDT, W.; ALONSO, A.; LEBEN, L. and FESTENTEIN, H. (1.981), Differential regulation of H-2 antigen expression in tumors and its biologic consequences. Transplant.Proc., XIII: 1814.

SCHMIDT, W. and FESTENSTEIN, H. (1.982). Resistance to cell mediated cytotoxicity is correlated with reduction of H-2K gene products in AKR leukaemia. *Inmunogenetics*, 16: 257.

SCHRIER, P.I.; BERNARDS, R.; VAESSEN, R.T.M.J.; HOUWELING, A. and EB, A.J. Van der. (1.983). Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells. *Nature*, 305: 771.

SHAW, S.; JOHSON, A.H. and SHEARER, G.M. (1.980). Evidence for a new segregant series on B-cell antigens that are encoded for in the HLA- D region and that stimulate allogeneic proliferative and cytotoxic response. *J.Exp.Med.*, 152: 565.

SHEARER, G.M. (1.974). Cell mediated cytotoxicity to trinitrophenyl-modified syngeneic lymphocytes. *Eur.J.Immunol.*, 4: 527.

SILVER, J. and FERRONE, S. (1.979). Structural polymorphism of human DR antigens. *Nature*, 279: 436.

SINGAL, D.P.; WADIA, Y.J. and NAIPAUL, N. (1.981). In vitro cell mediated cytotoxicity to the male specific (H-Y) antigen in man. *Hum.Immunol.*, 2:45.

SOLANA, R.; FERNANDEZ, N.; ALONSO, M.C.; NAVARRETE, C.; SACHS, J.A. and FESTENSTEIN, H. (1.984). Comparison of RIA and ELISA for screening class II monoclonal antibodies with EBV transformed cell lines. *Disease Markers*, 2: 33.

SOLANA, R.; ROMERO, J.; ALONSO, M.C. and PENA, J. (1.986). Heterogeneity in the line expression of HLA-ABC and Beta-2-microglobulin in human breast cancer. *J. Inmunogen.* (En prensa).

SOMEREN, H. Van; WESTERBELD, A.; HAGEMEIERS, H.; MEES, J.R.; MEERA KHAN, P. and ZAALBERG, O.B. (1.974). Human antigen and enzyme marker in man-chinese hamster somatic cell hybrids: evidence for synteny between the HL-A, PGM-3, ME and IPO-B loci. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, 71: 962.

SPRINGER, T. and STROMINGER, J.L. (1.976).
Detergent-soluble HLA antigens contain a hidrophilic
region at the COOH-terminus and a penultimate
hidrophobic region. Proc.Natl. Acad.Sci.USA., 73:
2481.

SPRINGER, T.A.; KAUFMAN, J.F.; TERHORST, C. and
STROMINGER, J.L. (1.977). Purification and structural
characterization of human HLA-linked B-cell antigens.
Nature, 268: 213.

STROMINGER, J.L.; CHESS, L.; HERMAN, H.C.; HUMPREYS,
R.E.; MALENKA, D.; MANN, D.; McCUNE, J.M.; PARHAM,
P.; ROBB, R.; SPRINGER, T.A. and TERHOST, C. (1.975).
Isolation of histocompatibility antigens and of
several B cell specific proteins from cultured human
lymphocytes. En: Histocompatibility Testing 1.975,
KISSMEYER-NIELSEN, F. (ed), p.179, Munskgaard,
Copenhagen.

SYBESNA, J.Ph.; KATER, L.; BORST-EILERS, E.; PLANQUE, B.A. De; SOELEN, T. Van and TUIT, G. (1.974). HLA antigens in kidney tissue. Localisation by means of an immunofluorescence technique. *Transplantation*, 17: 576.

TANAKA, K.; ISSELBACHER, K.J.; KHOURY, G. and JAY, G. (1.985). Reversal of oncogenesis by the expression of a MHC class I genes. *Science*, 228: 26.

TANIGAKI, N.; MIYAKAWA, Y.; YAGI, Y.; KREITER, W.P. and PRESMAN, D. (1.973). Radioiodinated soluble HL-A antigens: HL-A alloantigenic characterization and use in radionmunoassay *J.Immunol.Methods*, 3: 109.

TERMIJTELEN, B.A.; BRADLEY, B.A. AND ROOD, J.J. Van (1.980). A new determinant defined by PLT, coded for in the HLA region and apparently independent of the HLA-D and DR loci. *Tissue Antigens*, 15: 267.

TROWSDALE, J. TRAVERS, P.; BODMER, W.F. and PATILLO, R.A. (1.980). Expression of HLA-A,B,C and B2-microglobulin antigens in human choriocarcinoma cell lines. *J.Exp.Med.*, 152: 11s.

VILLELA, R.; YAGUE, J.; GALLANT, M.T.; VIVES, J. (1.983). The efficacy of hibridoma tecnologia in studing surface antigens in human T and B monocytes. *Inmunologia* 2:58.

WEISS, M.A.; MICHAEL, J.G.; PESCE, A.J. and DISPERSIO, L. (1.981). Heterogeneity of B2-microglobulin in human breast carcinoma. *Lab.Invest.*, 45: 46.

WEITKAMP, L.R. (1.976). Linkage of GLO with HLA Bf. Effect of population and sex on recombination. *Tissue Antigens*, 7: 273.

WESTERMARK, B. (1.973). The deficient density-dependent growth control of human malignant glioma cells and virus-transformed glia-like cells in culture. *Int.J.Cancer*, 12/438: 51.

WESTERMARK, B.; PONTEN, J.; HUGOSSON, R. (1.973). Determinants for the establishment of permanent tissue culture lines from human gliomas. *Acta Pathol. Microbial Scand*, 81/791: 805.

WHITE, P.C.; NEW, M.I. and DUPONT, B. (1.984).
HLA-linked congenital adrenal hyperplasia results
from a defective gene encoding steroid
21-hydroxylase, A cytochrome P-450. Third H-2 & HLA
Cloning Meeting, Strasbourg.

WILLIAMS, E.; OKOYE, R.; OLLIER, W. and FESTENSTEIN,
H. (1.983). A simple method for freezing cells in
liquid nitrogen. *J.Immuno.Meth.*, 65/262: 268.

WILLIAMS, K.A.; HART, D.N.J.; FABRE, J.W. and MORRIS,
P.J. (1.980). Distribution and quantitation of
HLA-A,B,C and DR (Ia) antigens on human kidney and
other tissues. *Transplantation*, 29/4: 274.

WIMAN, K.; CURMAN, B.; FORSUM, U.; KLARESCOG, L.;
MALMNASTJERNLUMD, U.; RASK, L.; TRAGARDH, L. and
PETERSON, P.A. (1.978). Occurrence of Ia antigens on
tissues of non-lymphoid origin. *Nature*, 276: 711.

WINCHESTER, R.J. and KUNKEL, H.G. (1.979), The human
Ia antigen. *Adv.Immunol.*, 28: 221.

WINCHESTER, R.J. (1.980). Aspects of surface membrane differentiation during maturation of human haematopoietic and tumour cells: the Ia system. *Curr.Top.Dev.Biol.*, 14: 115.

ZIEGLER, A.; UCHANSKA-ZIEGLER, B.; ROSENFELDER, G.; BRAUN, D.G.; WERNET, P. (1.981). Heterogeneity of established human hematopoietic cell line surface antigens by monoclonal antibodies and glycosphingolipid patterns. En: W Knapp, Ed. *Leukaemia markers*. New York, Academic Press.

ZINKERNAGEL, R.M. and DOHERTY, P.C. (1.974). Restriction of in vitro Tcell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or allogeneic system. *Nature*, 248: 701.