Biologia del Desenvolupament 2, 193-199 (1984)
Societat Catalana de Biologia

Inmunocirugía en los cuerpos embrioides: Obtención de poblaciones puras de carcinoma embrionario

M. Monzó, I. Serra y B. Torras

Departamento de Anatomía Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, Casanova 153, Barcelona.

Abstract

Immunosurgery of embryoid bodies: isolation of embryonal carcinoma cells

Embryoid bodies (EB) are structures derived from an experimental teratocarcinoma. Morphologically, they are formed by pluripotent cells, called Embryonary Carcinoma (EC), and which are surrounded by a layer of endodermic cells.

In our laboratory and basing our findings on the technique of immunosurgery, we have begun a method which allows us to eliminate selectively the external cellular layer of the EB. In order to do this, we isolated, using discontinuous Ficoll gradients, a cluster of EB, made up exclusively of endodermic cells, which, injected in a rabbit, gives an antiserum which, in the presence of the complement and embryoid bodies eliminates the external layer.

In this piece of work we present the firts results obtained using this technique of immunosurgery.

Introducción

Los teratocarcinomas (TC) pueden obtenerse experimentalmente mediante el transplante ectópico de embriones normales de ratón, de 1 a 7½ días de evolución, en huéspedes histocompatibles, (Stevens, 1970; Solter et al., 1970, 1980, 1981). Una característica importante de estos tumores es que su pasaje intraperitoneal en ratones 129/Sv, provoca la aparición de una scitis, de la que se aislan unos agregados celulares, denominados Cuerpos Embrioides (EB), por su semejanza a embriones normales de ratón. (Stevens, 1959; Pierce et al., 1960). Morfologicamente están formados por una población de Carcinoma Embrionario, que está rodeada por una capa de células endodérmicas.

En los últimos años, se han realizado numerosas experiencias en las que se demuestra la existencia de similitudes: morfológicas, bioquímicas e inmunológicas entre las células de Carcinoma Embrionario, y las

células embrionarias de la masa interna del blastocísto. (Hogan, 1977; Solter and Damjanov, 1979; Martin, 1980 y 1983). La obtención de estas células embrionarias ha sido posible gracias a la técnica de inmunocirugía, mediante la cual, se destruye selectivamente la capa trofectodérmica del blastocisto, cuando se exponen frente a un antisuero específico y posterior fijación con el complemento, permaneciendo intactas las células de la masa interna. (Solter y Knowles, 1975).

En nuestro trabajo, basándonos en la técnica de inmunocirugía, describimos un método que nos permite obtener, a partir de los EB y por destrucción selectiva de su capa endodérmica, poblaciones puras de células de Carcinoma Embrionario.

Material y Métodos

Obtención y aislamiento de los EB: Los EB se mantienen "in vivo" mediante pasaje intraperitoneal en ratones 129/Sv. En nuestro laboratorio se realiza el pasaje aproximadamente cada 18 días, mediante lavado de la cavidad abdominal con Hank's BSS libre de Ca^{++} y Mg^{++}. El resultado es centrifugado en gradientes discontinuos de Ficoll a 18 g durante 15 min con el fin de separar las distintas poblaciones de EB existentes en el líquido ascítico. (Monzó et al., 1983). Los EB aislados en la banda de menor densidad del gradiente, son centrifugados de nuevo en gradientes de Ficoll discontinuos al 5 y 6% Vol/peso, a 18 g durante 15 mins, separándose de esta manera una población de EB formada casi en su totalidad por "vesículas endodérmicas".

Obtención de antisuero y complemento: Se han utilizado conejos Nueva Zelanda Albino, a los que se les ha inyectado, vía endovenosa, una concentración de "vesículas endodérmicas" de 4×10^4/ml. Se han realizado un total de tres inyecciones (una cada 15 días), y a los 10 días después de la última inyección se ha realizado la extracción sanguinea. El suero obtenido ha sido calentado a 56º C durante 15 min con el fin de inactivar el complemento. Como fuente de complemento, se ha utilizado suero fresco de conejo, obteniéndose una titulación ideal a 1 : 80.

Test de Citotoxicidad: Los EB han sido expuestos a 200 μl de antisuero diluido con DMEM y FCS al 10% inactivado por el calor, y 5 mM de tampón HEPES a pH 7'3. Las diluciones utilizadas han sido de 1 : 2 a 1 : 1024. El tiempo de incubación ha sido de 30 min a 37º C en 5% de CO_2 y aire. Seguidamente se han realizado tres lavados de 5 min con 200 μl de DMEM. A continuación, se han incubado con 200 μl de complemento de conejo a dilución 1 : 80 con DMEM, durante 45 min a 37º C en 5% CO_2 y aire.

La lectura para determinar la extensión y localización de la muerte celular se ha realizado utilizando la tinción de Trypan Blue.

Crecimiento "in vitro" de las células de CE: Después de la exposición de los EB en la dilución ideal de antisuero y complemento, se obtienen las poblaciones de CE, los restos de células endodérmicas, se eliminan mediante pipeteo intenso. Las masas de CE se cultivan en DMEM + 10% FCS inactivado, en Petris Falcon a 37º C en 5% CO_2 y aire, durante 24 horas.

Resultados

Citotoxicidad: Cuando los EB han sido expuestos al complemento, previa incubación con el antisuero, se observa (Fig. 1) que la lisis total se obtiene hasta la dilución 1 : 32. La primera dilución en la que se obtienen masas de CE intactas y con muerte total de las células endodérmicas se observa en 1 : 128 (Fig. 2E), mientras que por debajo de este valor, va disminuyendo progresivamente el ataque inmunológico a las células endodérmicas (Figs. 2B a 2D). A partir de la dilución 1 : 700, no se observa ya muerte celular por citotoxicidad (Fig. 2A). Cuando las masas de CE han sido expuestas al antisuero y posterior incubación con el complemento, se aprecia (Fig. 1) la existencia de lisis total hasta 1 : 32 y estas permanecen ilesas a partir de la dilución 1 : 128. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos cuando se aplica la técnica de inmunocirugía en blastocistos con el fin de eliminar el trofectodermo, observándose que la dilución ideal está en 1 : 200,(Hogan et al., 1978).

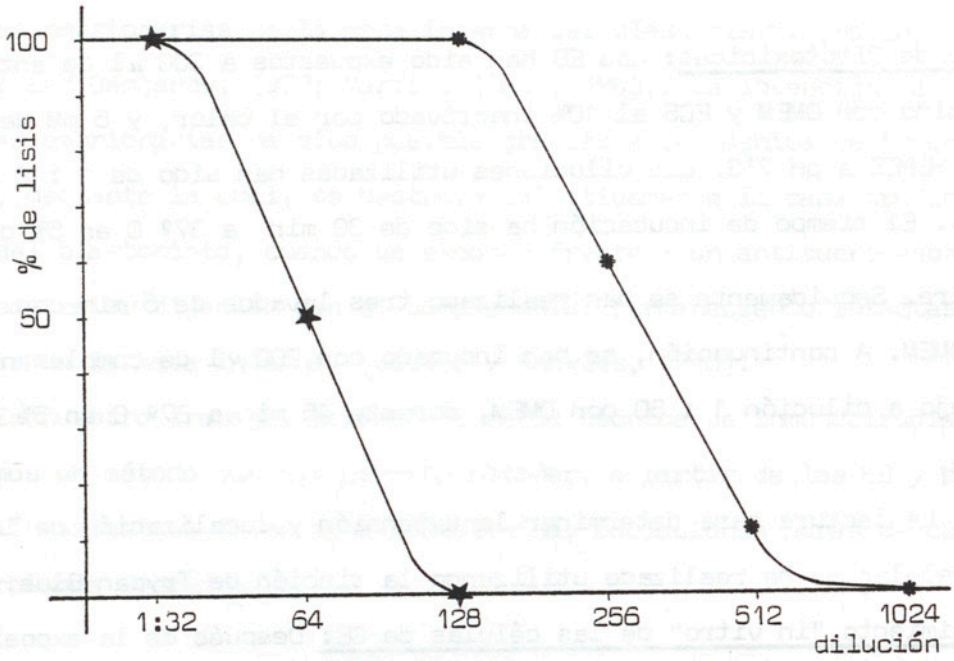

Fig. 1:
Citotoxicidad del antisuero de conejo y complemento, frente a los EB. ✱Curva de citotoxicidad para las células externas de los EB. ★Curva citotoxicidad para masas de CE.

Crecimiento "in vitro" de las células de CE: Cuando las masas de CE, obtenidas a partir de la dilución 1 : 128, han sido cultivadas en Petris Falcon, se ha observado que a las 12 horas aproximadamente, se anclan en el sustrato, y a las 24 horas han iniciado ya el crecimiento y diferenciación, (Figs. 3A y 3B). Sin embargo algunas masas de CE, a las 24 horas flotan libremente en el medio de cultivo conservando microscopicamente intacta su estructura.

Conclusiones

A partir de los EB, formados por "vesículas endodérmicas", es posible obtener un antisuero, que cuando es incubado con el complemento y EB, presentan un cierto grado de especificidad para las células endodérmicas que forman la capa externa de los EB, obteniéndose así masas celulares de CE, que conservan su viabilidad ya que cuando son transferidas a un medio de cultivo "in vitro" son capaces de crecer y diferenciarse, apareciendo un tipo celular morfologicamente semejante al endodermo original de los EB, de manera análoga a lo que sucede cuando las masas ce-

lulares internas del blastocisto, aisladas por inmunocirugía, son culti vadas "in vitro", regenerando el trofoblasto inicial. (Spielmann et al. 1980).

Dado que actualmente conocemos la existencia de distintos tipos morfológicos de EB, con capacidades distintas de diferenciación, pensamos que este método puede ser de gran utilidad para obtener poblaciones celulares de CE libres de presumibles células endodérmicas.

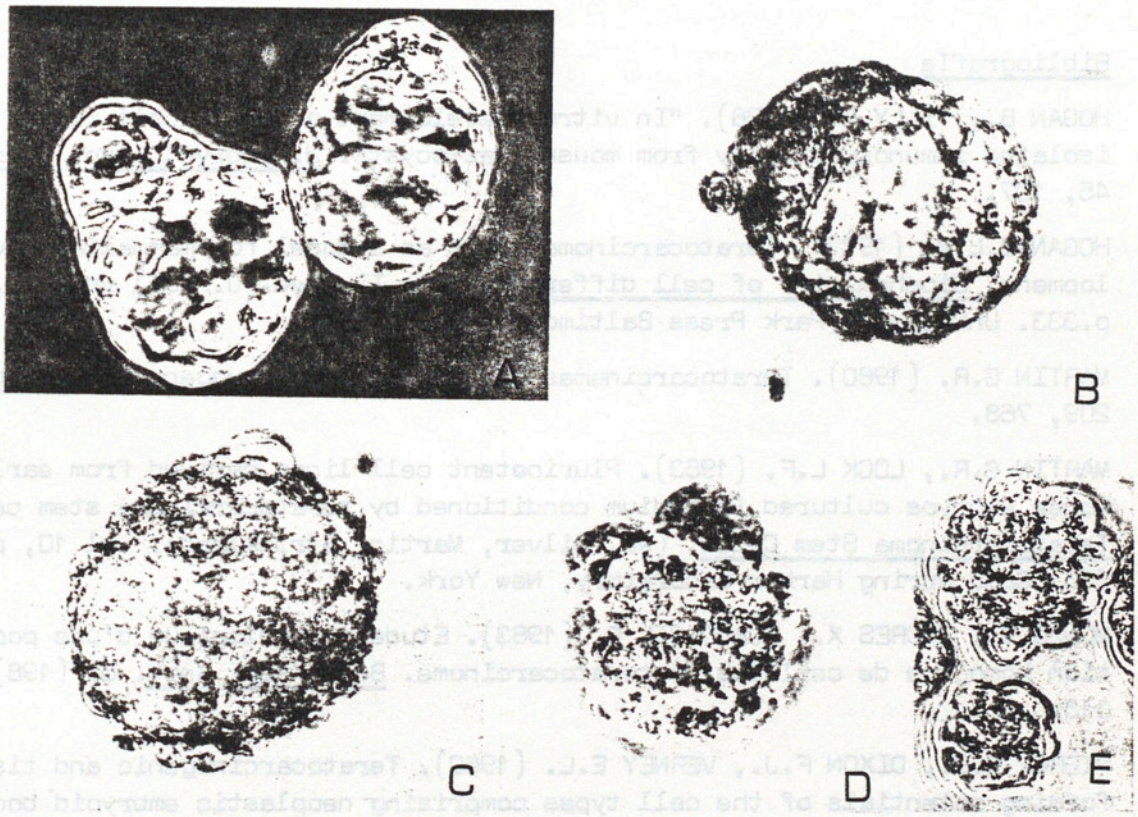

FIG. 2

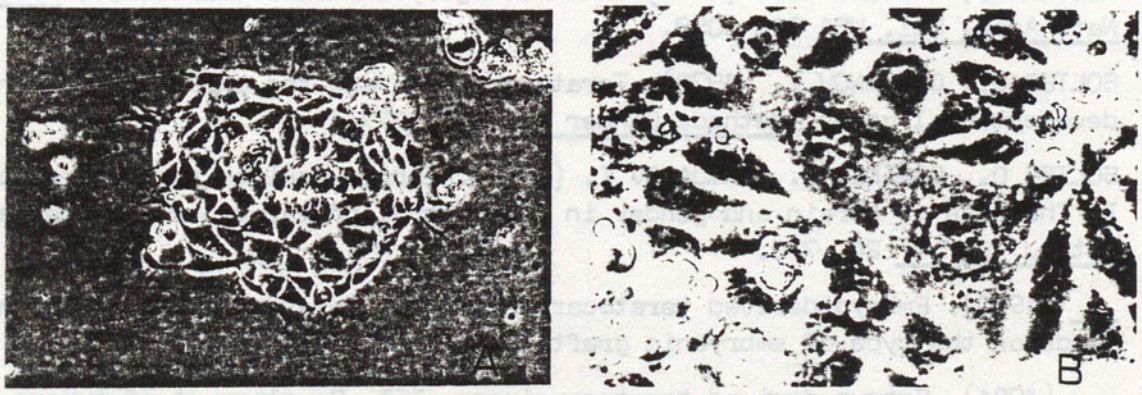

FIG. 3

Fig. 2: Efectos del antisuero y complemento en los EB.
2A, aspecto totalmente normal que presentan los EB a dilución 1 : 700. (x400).
2B, 2C y 2D, efectos de citotoxicidad a diluciones 1 : 512, 1 : 300, 1 : 200 respectivamente.
2E, masas de CE, obtenidas a dilución 1 : 128, (x500)

Fig. 3A y 3B: Crecimiento "in vitro" a las 24 h. de cultivo de las masas de CE, (3A x125; 3B x400).

Bibliografía

HOGAN B., TILLY R. (1978). "In vitro" development of inner cell mases isolated immunosurgically from mouse blastocysts. J. Embryol. exp. Morph. 45, 107.

HOGAN B.L.M. (1977). Teratocarcinoma cells as a model for mammalian development. Biochemistry of cell differentiation II. (ed. J.Paul) vol. 15, p.333. University Park Press Baltimore.

MARTIN G.R. (1980). Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. Science 209, 768.

MARTIN G.R., LOCK L.F. (1983). Pluripotent cell lines derived from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells Teratocarcinoma Stem Cells. (ed. Silver, Martin, Strickland). vol 10, p. 625. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

MONZO M., ANDRES X., RUANO-GIL D. (1983). Etude morphologique d'une population homogene de cellules de teratocarcinome. Bull. Ass. Anat. 67 (198), 315.

PIERCE G.B., DIXON F.J., VERNEY E.L. (1960). Teratocarcinogenic and tissue forming potentials of the cell types comprising neoplastic embryoid bodies Lab.Invest. 9, 583.

SOLTER D., KNOWLES B.B. (1975). Immunosurgery of mouse blastocist. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 5099.

SOLTER D., DAMJANOV I. (1979). Teratocarcinoma and the expression of onco developmental genes. Methods Cancer Res. 18, 277.

SOLTER D., DOMINIS M., DAMJANOV I. (1979). Embryo-derived teratocarcinoma. I. The role of strain and gender in the control of teratocarcinogenesis. Int. J. Cancer 24, 770.

___ (1980). Embryo-derived teratocarcinoma. II. Teratocarcinogenesis depends on the type of embryonic graft. Inter. J. Cancer 25, 341.

___ (1981). Embryo-derived teratocarcinoma. III. Development of tumors from teratocarcinoma-permissive and non-permissive strain embryos transplanted to F_1 hybrids. Inter. J. Cancer 28, 479.

SPIELMANN H., MULLER V., Beckord W. (19805. Immunosurgical studies on inner cell mass development in rat and mouse blastocysts before and during implantation "in vitro". J. Embryol. exp. Morph. 60, 255.

STEVENS L.C. (1959). Embryology of testicular teratomas in strain 129 mice. J. Nat. Cancer Inst. 28, 1249.

___ (1970). The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and post-implantation mouse embryos. Dev. Biol. 21, 364.

Biologia del Desenvolupament 2, 201-205 (1984)
Societat Catalana de Biologia

CASEÏNO-QUINASES DE CÈL.LULES LEUCÈMIQUES

C. Martos, J.M. Pena, M. Plana, M.D. Guasch, A. Domingo i E. Itarte

Departament de Bioquímica, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona.

Abstract

Casein kinases from human leukemic cells

Total casein kinase activity present in human leukemic cells from patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) and acute myeloblastic leukemia (AML) is higher than that in normal peripheral blood leucocytes. This effects seems to be due to a marked increase in both casein kinase 1 (CK-1) and casein kinase 2 (CK-2) activities. The apparent molecular weight and Km for ATP of the enzymes from CLL and AML cells were similar to that of CK-1 and CK-2 from normal leucocytes. On the contrary the Km for casein of CK-1 from leukemic cells was lower than that from normal cells, whereas that of CK-2 was similar in both normal and leukemic cells. The results show the presence in leukemic cells of a form of CK-1 with altered affinity for its protein substrate, in addition to an increase in the total activity of both CK-1 and CK-2.

Introducció

La fosforilació-defosforilació de proteïnes és un mecanisme important de control de l'activitat cel.lular (Cohen, 1982). Les cèl.lules de mamífers contenen diversos tipus de proteïno-quinases entre elles les histono- (dependents i independents d'AMP cíclic) i les caseïno-quinases independents d'AMP cíclic (CK-1 i CK-2) les quals actuen diferentment sobre diversos enzims i altres proteïnes biològicament actives. En estudis anteriors haviem demostrat que tant a les leucèmies mieloide aguda, mieloide crònica i limfoide aguda i limfoide crònica la relació d'activitats caseïno/histono-quinàsiques total és més elevada que en els leucòcits polimorfonuclears o en els limfòcits normals (Pena et al., 1983).

En el present treball hem aprofundit en l'estudi de les CK-1 i CK-2 aïllades de leucèmies mieloide aguda (LMA) i limfoide crònica (LLC) i hem observat canvis en l'afinitat pel substracte proteic de la CK-1 en la leucèmia.