

14
2ej



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

"ZARAGOZA"

**MEJORAMIENTO DEL BIENSAYO A LA INDUCCION
DE RECEPTORES Fc PARA IgG EN CELULAS DE
MEDULA OSEA DE RATON, POR EL FACTOR
INDUCTOR DE RECEPTORES Fc (FcRI).**

T E S I S

Que para obtener el Título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a:

María Guadalupe Morales Hernández



México, D. F.

1988

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

I.-	RESUMEN	1
II.-	INTRODUCCION	3
III.-	METODOLOGIA	18
IV. -	RESULTADOS	23
V.-	DISCUSION Y CONCLUSIONES	40
VI.-	APENDICES	46
VII.-	BIBLIOGRAFIA	50

RESUMEN

Las células que componen el tejido sanguíneo son las rojas y las blancas. Las células rojas son los eritrocitos, los cuales se encargan principalmente del transporte de oxígeno por todo el cuerpo y por su parte las células blancas (macrófagos, granulocitos, linfocitos, células asesinas naturales) interactúan entre sí para proporcionar la defensa del organismo contra cuerpos extraños.

Actualmente se sabe que existen varios factores reguladores de la proliferación y diferenciación de las células que integran el tejido hematopoyético. Uno de los factores más conocidos y estudiados es el inductor a la proliferación y diferenciación de macrófagos y granulocitos llamado MGI. Durante mucho tiempo se le atribuyó a este factor la responsabilidad de la proliferación y diferenciación completa de estas células; sin embargo, recientemente se ha identificado a dos moléculas que intervienen en este mecanismo. Una tenía exclusivamente la función de inducir a la proliferación, mientras que la segunda molécula (FcRI) inducía la formación de receptores para Fc, produciendo de esta forma células funcionalmente maduras. Asimismo se ha encontrado que la producción de esta molécula es llevada a cabo por macrófagos.

Estos factores al igual que otros que intervienen en la defensa del organismo, como el interferón y la interleucina 2, son llamados genericamente modificadores biológicos. La mayoría de estos modificadores han mostrado gran importancia en el desarrollo de la medicina, tanto en el avance de la ciencia básica como en la fabricación de fármacos de suma utilidad. Debido a la importancia que presenta el factor FcRI como modificador biológico y con la finalidad de continuar con su estudio, se hace imperioso el desarrollo de un bioensayo eficaz, sencillo y reproducible. Por esta razón, en el presente trabajo se elaboró una técnica con estas características para evaluar la actividad del FcRI.

El diseño de esta técnica consistió en el mejoramiento del bioensayo ya existente de la detección de receptores Fc en células de médula ósea de ratón, inducidos por el FcRI, mediante la formación de rosetas eritrocitarias. Como el porcentaje de células con receptores para Fc puede variar tanto por el grado de activación de éstas, como por la edad del individuo, se dificulta la determinación de la nueva aparición de estos receptores inducida por el FcRI, sobre los valores ya existentes. Sobre todo cuando el grado de activación es tal que las células se encuentran activadas al máximo para la expresión de estos receptores. Para tratar de eliminar los valores iniciales de receptores para Fc al comienzo de nuestros experimentos se efectuó una preincubación con tripsina a distintas concentraciones, debido a que muchos de los receptores para Fc son sensibles a esta enzima. De esta forma se obtuvo una población celular homogénea al inicio de los experimentos y se facilitó la evaluación exclusiva de la actividad inductora del FcRI.

Cuando las células se cultivaron durante 4 días en presencia del FcRI se encontró que la actividad de este era significativamente mayor cuando se preincubaron las células mieloides con 0.008% de tripsina durante 5 min. Asimismo, previendo la utilización de técnicas cromatográficas durante el proceso de caracterización y purificación del FcRI que involucra la necesidad de efectuar un gran número de bioensayos, se diseñó el empleo de la técnica de microcultivos. Esta técnica utiliza poca cantidad de células de un solo animal para la realización de un bioensayo completo, lo cual da la apertura para el estudio de esta molécula en seres humanos donde se excluiría el problema de adquirir grandes cantidades de células mieloides, o de depender de cepas singénicas que en humanos es imposible.

Finalmente, creemos haber establecido una técnica sencilla, eficaz, reproducible que abre el campo para el estudio del modificador biológico llamado FcRI. Creemos que la purificación de este factor es importante no solo en el estudio de los procesos de diferenciación hematológica básica, sino también en la utilización de este factor con fines tanto diagnósticos, donde mediante con anticuerpos puedan ser detectados niveles anormales de este en el organismo, como terapéuticos en enfermedades donde un aumento de la cantidad de receptores inmunológicos sea de utilidad.

INTRODUCCION

La sangre es un tejido líquido constituido por distintos tipos celulares que se encuentran suspendidos en el plasma sanguíneo. Circula por el sistema vascular, transportando oxígeno y sustancias nutritivas a todos los tejidos del cuerpo, así como también productos de excreción y de desecho, juega un papel esencial en la función integradora del sistema endocrino al distribuir las hormonas desde sus lugares de origen hasta los órganos efectores distantes (1).

El volumen de la sangre en los seres humanos es de 5 litros aproximadamente, lo que representa el 7% del peso corporal. Los eritrocitos constituyen el 45% de este volumen; los leucocitos y plaquetas solo el 1% y el resto el plasma sanguíneo, un líquido amarillento y transparente que constituye la matriz extracelular de este tejido (1). La mayoría de estos tipos celulares que circulan en el torrente sanguíneo permanecen un tiempo de su vida en el seno de otros tejidos, tienen una vida corta y son producidos continuamente a lo largo de toda la vida animal (2,3).

Los eritrocitos son los encargados de transportar la hemoglobina por todo el cuerpo. Las plaquetas, son corpusculos derivados de células gigantes denominadas megacariocitos, las cuales tienen la principal función de coagular la sangre; mientras que los leucocitos agrupan cinco tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos (2,4,5). Los tres primeros tipos se conocen genericamente como granulocitos, poseen numerosos lisosomas y vesículas secretoras o gránulos, recibiendo su nombre de acuerdo a las propiedades de tinción de estos. Los neutrófilos forman el grupo mas numeroso, engloban, matan y digieren bacterias. Por su parte los linfocitos que junto con los macrófagos constituyen basicamente el sistema inmune, y debido a sus funciones se clasifican en dos grupos: los

linfocitos B quienes son los encargados de la producción de anticuerpos como respuesta ante un antígeno, dando lugar a la inmunidad humoral; y los linfocitos T los cuales actúan mediante una interacción membrana-membrana al detectar al antígeno, y son los responsables de la respuesta inmune celular, dentro de este grupo se encuentran las células asesinas K (3,6,7). Los monocitos y macrófagos presentan una marcada heterogeneidad funcional y morfológica. Los monocitos son los fagocitos mononucleares circulantes, que al abandonar la corriente sanguínea se transforman en macrófagos, los cuales eliminan por fagocitosis a los microorganismos invasores, cuerpos extraños y residuos celulares (8). Además de estos componentes celulares mayoritarios existen otros dos grupos cuyo origen no ha sido claramente establecido. El primero perteneciente al grupo llamado de células asesinas, es denominado bajo el nombre de célula asesina natural (NK). Aunque existen diversas teorías sobre el origen linfocitario, o monocítico de estas células, se considera que pueden pertenecer a un grupo completamente aparte. Finalmente las células cebadas o mastocitos parecen tener asimismo un origen diferente al de los demás grupos celulares, aunque se ha postulado que pertenecen al de los granulocitos (9,10).

Se han aportado fuertes evidencias de la existencia de una célula pluripotente hematopoyética, precursora de todas las líneas celulares sanguíneas, no obstante ha existido fuerte debate acerca de la posible existencia de varias células precursoras pluripotentes para cada línea celular (11,12,13).

Mediante el estudio de ratones irradiados letalmente, se aportaron las primeras evidencias de la existencia de una célula precursora pluripotente. Al recibir un animal fuertes dosis radioactivas, este moría al no poder producir nuevas células sanguíneas; sin embargo, la muerte de este animal podía evitarse mediante el suministro de una suspensión de células provenientes de la médula ósea de animales sanos. Los animales así tratados sobrevivían mostrando en su bazo nódulos que representaban

pequeñas colonias de células precursoras de todo tipo de células sanguíneas, las cuales fueron llamadas Unidades Formadoras de Colonias del Bazo (CFU-S) (14). El carácter clonal de estas colonias fue demostrado por medio de marcadores cromosómicos inducidos por radiación (15).

Con experimentos de este tipo se ha demostrado que las células precursoras hematopoyéticas también se encuentran presentes en la circulación, aunque en menor número y que estas células pueden abandonar la corriente sanguínea y establecerse y proliferar en ciertos tejidos, como el bazo. Esta capacidad de colonización es importante durante el desarrollo embrionario de los tejidos hematopoyéticos; la formación de células sanguíneas ocurre inicialmente en las regiones extraembrionarias del mesodermo, posteriormente en el hígado y en el bazo, y finalmente en la médula ósea, donde persiste durante toda la vida adulta (14,16).

La relación de los linfocitos con la CFU-S fue un tema de controversia debido a que los progenitores linfoides no se encuentran en las colonias del bazo, lo cual sugirió la existencia de una célula precursora común más primitiva, denominada precursora común de la Unidad Formadora de Colonias Linfoides y Mieloides (CFU-L-M) (17,18).

Así mismo, se han desarrollado técnicas para la proliferación in vitro de las células precursoras de los elementos de la médula ósea. Mediante el cultivo de células mieloides en medios adaptados se ha registrado la presencia de células madres precursoras comprometidas o especializadas (CFU-C), capaces de originar in vitro colonias mixtas de granulocitos y macrófagos (19). También se ha encontrado células madre especializadas, que generan eritrocitos en presencia de eritropoyetina (CFU-E), o células precursoras de megacariocitos en presencia de megacariopoyetina que da lugar a las plaquetas (CFU-M) (19,20).

En los ensayos clonales in vitro para células precursoras de granulocitos, monocitos y macrófagos, se ha observado que la proliferación requiere de la presencia obligada de un factor

llamado "Colony stimulating activity" (CSA) (20,21, 22), también conocido como "Colony stimulating factor" (CSF) (23,24) o "Macrophage and granulocyte inducer" (MGI) (25,26), y que probablemente tienen relación con el llamado "Macrophage growth factor" (MGF) (27). El MGI es una sustancia normalmente producida por varios órganos del cuerpo, cuyo peso molecular varía de acuerdo con la fuente de obtención. Se ha identificado entre otros en el medio condicionado de fibroblastos de pulmón y de células epiteliales de riñón de ratón con un peso molecular de 70 y 22 Kd (Kilodaltones) respectivamente. Asimismo se ha encontrado que el medio condicionado de células epiteliales de pulmón de ratón contiene un MGI de peso molecular de 22 Kd lo que hace suponer que un mismo tipo de células que pertenezcan a distintos órganos puede producir el mismo MGI(28).

Los macrófagos normalmente pertenecen al tejido laxo, pueden encontrarse en alveolos pulmonares, en submucosas, en el aparato yuxtglomerular y otros espacios perivasculares, en travéculas del sistema óseo y tubulos renales (29); pero independientemente de su localización, sirven para mostrar y transportar antígenos o proteínas alteradas hacia células citotóxicas específicas (30). Los macrófagos se agrupan en reacciones inflamatorias subagudas o crónicas, que incluyen exudados, granulomas, grasa en venas y ateromas . Además como células efectoras expresan generalmente poca citotoxicidad, a menos que sean activados por ciertas sustancias que actúen directamente sobre ellos, tales sustancias pueden ser químicas como el tioglicolato, o de microorganismos como las Brucella, Listeria y Bacillus Calmette-Guerin (BCG) (31,32,33). El macrófago activado incrementa su capacidad microbicida (34), que trae como consecuencia un incremento en la endocitosis (33,35,36), en la expansión y adherencia al sustrato de cultivo (35,37), en la citotoxicidad (38,39,40), en la actividad para proliferar in vitro (41,42), en las enzimas lisosomales (41); en su volumen celular (43,44,45), en su actividad quimiotáctica (43,44), en el metabolismo de la glucosa

(34,46) y en una disminución de la actividad de la 5' nucleotidasa en la membrana (44,47). Sin embargo no todos los agentes utilizados para la activación de estos producen los efectos arriba mencionados (38,46). Actualmente se sabe que los macrófagos pueden secretar alrededor de 100 sustancias cuyo peso molecular presenta un rango de 32 (superóxidos) a 440 Kd (fibronectina), donde su actividad biológica abarca desde la inducción a la proliferación hasta ocasionar la muerte celular. Algunas de estas sustancias son el factor inductor de macrófagos y granulocitos (MGI), la eritropoyetina, los estimulantes de las células B y T, las lisosimas, el factor estimulador de la migración de polimorfos, el interferón, la timosina B4, el factor inductor de monocitopoyesis y el factor activador de neutrófilos (48,49,29,50)

Las moléculas que se combinan específicamente con los antígenos se denominan anticuerpos, y el conjunto de estas moléculas reciben el nombre de inmunoglobulinas. Estas inmunoglobulinas en los vertebrados superiores comprenden un grupo heterogeneo que constituye aproximadamente un 20% de las proteínas totales del plasma (51,52); las cuales tienen aproximadamente 2×10^7 sitios de combinación con los antígenos (53).

La unidad básica de una molécula de inmunoglobulina consta de cuatro cadenas polipeptídicas dispuestas en forma de Y (Fig. 1). Dos cadenas grandes pesadas H y dos cadenas pequeñas ligeras L (54,55). Cada cadena L y H de inmunoglobulina consta de una región variable, las cuales son los centros de unión al antígeno, de aproximadamente 110 residuos de aminoácidos en el extremo amino terminal, seguida de una región constante que tiene el mismo tamaño en la cadena L y es unas tres a cuatro veces mayor en la cadena pesada (56,57,58). Una parte de la región constante de las cadenas pesadas (Fig. 1) se denomina Fc o fracción cristalizante, la cual es el centro de unión para los componentes del complemento y diversos receptores de superficie celular (55).

Las inmunoglobulinas humanas están clasificadas en 5 clases

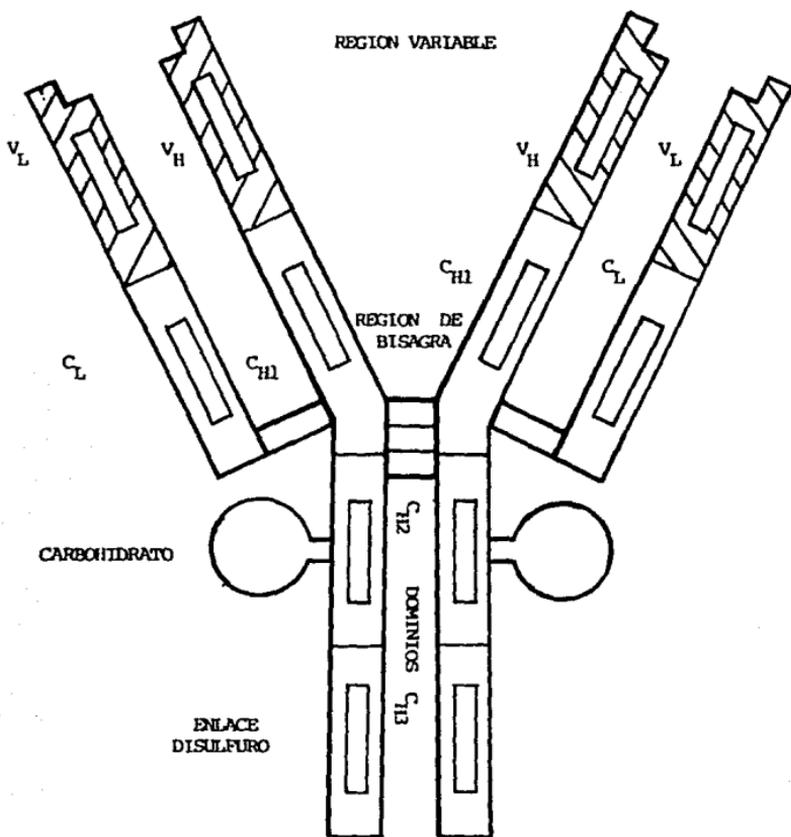


Fig. 1 Unidad básica de una inmunoglobulina.- Esta constituida por 4 cadenas polipeptidicas. Dos cadenas pesadas H y dos cadenas livianas L, distribuidas en forma de Y, unidas por enlaces disulfuro (region de bisagra). Consta de una region variable V y una constante C. La region V es el sitio por el cual el anticuerpo se une al antigeno, mientras que la region C, es el centro de union para los componentes del complemento y diversos receptores de superficie celular.

basadas en la estructura primaria de sus respectivas cadenas pesadas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM (57). Existen también 2 tipos de cadenas ligeras: Kappa y Lambda. En el suero humano aproximadamente el 65% de las moléculas de IgG tienen 2 cadenas pesadas gamma y 2 cadenas ligeras kappa mientras que el 35% tiene 2 cadenas pesadas gamma y 2 cadenas ligeras lambda. La misma distribución se aplica para las moléculas de IgA e IgM circulantes (59). De las inmunoglobulinas la IgG constituye la principal clase en la sangre y se produce copiosamente durante las respuestas inmunitarias secundarias (58). La IgG al igual que las otras clases de inmunoglobulinas colaboran en la preparación de todo microorganismo extraño al cuerpo para ser destruido por fagocitosis. La adición de moléculas de IgG a estos microorganismos y la unión aparentemente inmunoespecífica de éstos a las moléculas de IgG a través de su región variable Fab, provoca la adherencia de los microorganismos a los fagocitos a través de los receptores de la superficie celular por el extremo Fc de las moléculas de anticuerpo (60,61).

Las moléculas de IgG tienen un peso molecular de 150 Kd. Se han identificado 4 subclases de IgG humana de acuerdo a ciertas diferencias antigénicas y estructurales que residen en la cadena pesada y se han designado como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (Fig.2). La distribución relativa de estas subclases entre las moléculas de IgG en el suero es del 65 a 70%, 23 a 28%, 4 a 7% y de 3 a 4% para las respectivas 4 subclases (62). Las 4 subclases difieren en ciertas propiedades biológicas. Las moléculas de IgG1, IgG3 e IgG4 poseen una configuración que les permite interactuar con los mastocitos de una especie no relacionada: el cobayo. En cambio la IgG2 carece de esta capacidad. Las 4 subclases pueden fijarse a los receptores Fc de neutrófilos, pero solo las subclases IgG1 e IgG3 pueden unirse a receptores de los monocitos. Todas ellas pasan a través de las membranas materno fetales, aunque todavía no se sabe en que medida se encuentran en la circulación fetal (62, 63). Este tipo de heterogeneidad en las subclases de IgG también

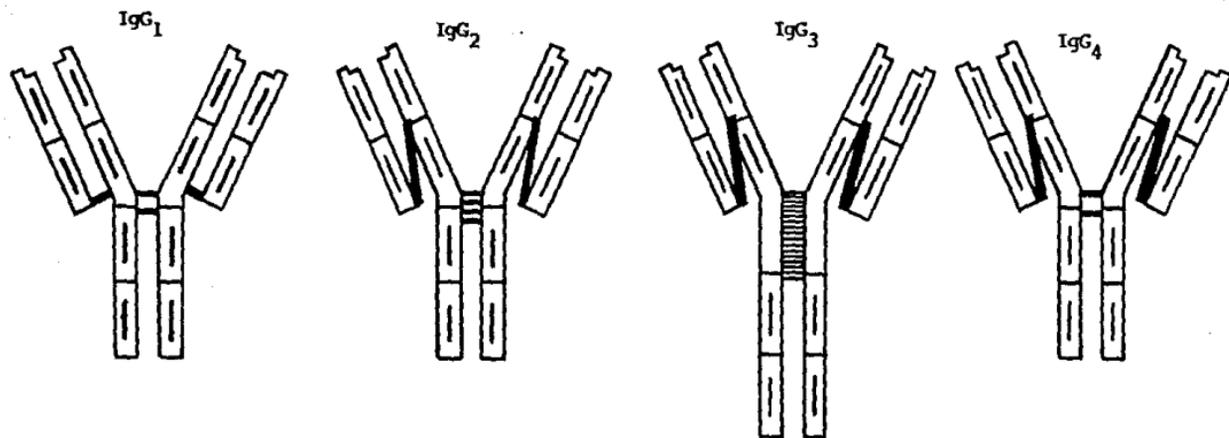


Fig. 2 Subclases de IgG humana.- Estas subclases se distinguen entre si porque presentan diferencias en el número y arreglo de enlaces disulfuro, que se encuentran uniendo la cadena pesada y la cadena liviana, y los enlaces que forman parte de la región de bisagra. Asimismo de la presencia o ausencia del dominio CH_4 .

es observado en otras especies, como lo es el ratón, el cobayo o el conejo (Fig 3) (64).

Los principales receptores de membrana característicos de la actividad biológica de las células fagocíticas son los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas y los receptores para el complemento (65). Aparentemente la función de estos receptores consiste en incrementar la respuesta inmune. Los receptores Fc fueron detectados en macrófagos de ratón por los años de 1960 y estas células fueron las que presentaron la mayor densidad de estos receptores (66). Estos juegan un papel importante no solo en la fagocitosis, sino también en el complejo inmune, la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo y muerte de parásitos (66).

Los receptores Fc se han encontrado en una amplia variedad de células: macrófagos, granulocitos, células B y T, mastocitos, células asesinas naturales (NK) y células asesinas (K) (67). En macrófagos estos receptores intervienen para combatir infecciones parasitarias, en la remisión fisiológica de eritrocitos viejos, en donde estos eritrocitos son opsonizados por inmunoglobulinas autólogas *in situ*, promoviendo consecuentemente la fagocitosis por macrófagos hepáticos y del bazo (68,69,70).

La especificidad de estos receptores Fc para las subclases de IgG no es absoluta, existen distintas clases de receptores Fc (FcR para otras inmunoglobulinas, las cuales presentan una relación en su coexpresión. Esto puede reflejar funciones diferentes de los distintos tipos de FcR de acuerdo a las funciones efectivas de las diferentes clases de inmunoglobulinas (isotipos) (66). Los receptores Fc para la IgG que se encuentran sobre macrófagos y neutrófilos toman parte en la fagocitosis, sin embargo, de los receptores para la IgE depende la citotoxicidad directa contra parásitos. Los receptores para la IgE sobre mastocitos y basófilos juegan un papel importante en la liberación de mediadores químicos. Los linfocitos T y otras células han mostrado liberar factores que se unen a las

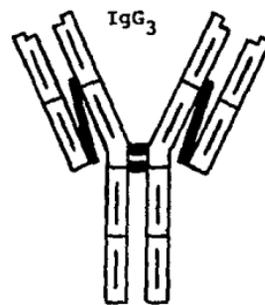
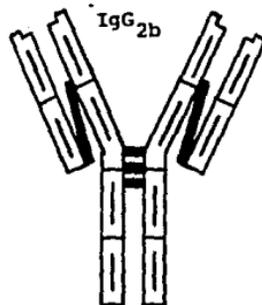
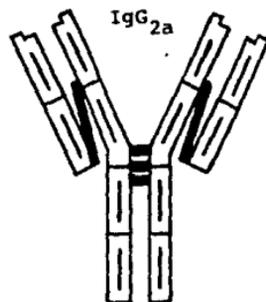
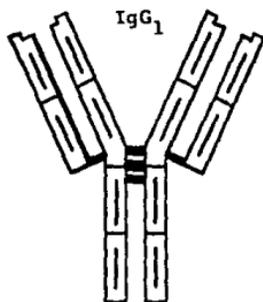
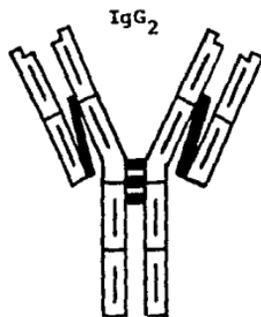
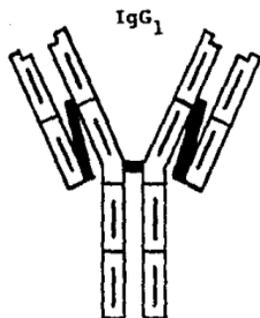
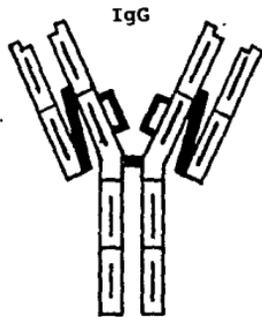
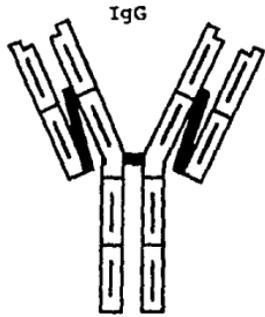
RATON**COBAYO****CONEJO****CABRA**

Fig.3 Subclases de IgG en ratón, cobayo, conejo y cabra.- La diferencia de las moléculas de IgG en estas especies varía en su estructura molecular y en el número de isotipos que llevan en sus genomas.

inmunoglobulinas (Ig-BF) que se involucran en la regulación de síntesis de un isotipo específico. La unión de este factor (Ig-BF) a la porción Fc de la inmunoglobulina muestra una especificidad isotópica ya sea para la IgA, IgE, IgG1 e IgG2 (67,71).

Por otra parte, se ha encontrado que la expresión de la mayoría de receptores Fc sobre la membrana de macrófagos de ratón se incrementa durante la ontogenia postnatal. Los receptores Fc para la IgA, IgM, IgE, IgG2a, IgG2b e IgG3 presentan tal incremento conforme avanza la edad, mientras los receptores para la IgG1 por lo contrario, sufren una disminución. Asimismo, los cambios observados en la expresión de estos receptores también corresponde estrechamente a los cambios de la actividad fagocítica (72).

En el estudio de los receptores Fc y su unión con la IgG se ha encontrado que sobre distintos tipos celulares existen diferencias en la especificidad del enlace de estos receptores con la IgG monomérica, polimérica (agregados) o como complejo antigénico, donde tales diferencias dependen del tamaño de los agregados o del complejo inmune de tal forma que a mayor tamaño mayor afinidad (73,74,75,76,77). Se ha reportado que la interacción de monocitos humanos con IgG soluble polimérica induce una baja regulación de receptores Fc, acompañado de una co-modulación de receptores para el complemento. Esto a su vez produce una disminución en las funciones monocíticas tales como la fagocitosis mediada por receptores Fc, la liberación de metabolitos oxigenados seguido de una estimulación por agregados de IgG o zimosan opsonizado, así como el daño o muerte bacteriana. Para la IgG monomérica la modulación de receptores Fc depende de la vía de inmunoglobulina presente. Solo insoluble la IgG monomérica reduce la modulación de receptores Fc en monocitos (78,79).

Además se ha observado que al tratar la membrana de las células que contienen estos receptores con fosfolipasas, la actividad de los receptores Fc disminuye, siendo restaurada con

un detergente no iónico NP-40, lo cual indica la posibilidad de que los receptores se encuentren introducidos en la capa de lípidos de la membrana celular, la cual les proporciona un sosten para ejercer su actividad (74).

Se ha encontrado recientemente que en macrófagos de ratón y en líneas derivadas de macrófagos existen dos tipos de receptores Fc para distintas subclases de IgG. Uno de ellos FcR1 es sensible a proteasas y puede unirse a la subclase IgG2a en estado monomérico o polimérico, el segundo FcR2 es resistente a proteasas y puede unirse a agregados de las subclases IgG1 e IgG2b (80,81,82,83).

Ambos receptores difieren en sus características funcionales: El roseteo con IgG2a es inhibido a 4 ° C y si es tratado con tripsina o citocalasina B; sin embargo, el FcR2 para IgG1 e IgG2b no es afectado por estos tratamientos (84,85,86,87). El peso molecular encontrado para el FcR1 es aproximadamente de 60 a 70 Kd con un punto isoeléctrico (PI) que varía de 3.8 a 4.7 y para el FcR2 es aproximadamente de 65 Kd con un PI de 4.7 a 5.8 (73). El sitio de enlace del FcR1 para la IgG2a corresponde a la región del dominio CH2 y CH3, mientras que el FcR2 se une a través de la secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de la IgG1 e IgG2b. Aunque los fragmentos de enlace son específicos para ambos receptores, ellos difieren en cuatro aminoácidos, donde uno de ellos es la lisina (IgG2b), e isoleucina (IgG2a) que tienen carga diferente y probablemente esto implique la diferencia en su especificidad (88). Asimismo, las diferentes densidades de uno u otro receptor puede dirigir diferencias en su función (81).

La demostración de dos clases diferentes de receptores Fc sobre macrófagos de ratón abrió el camino para el estudio de la existencia de múltiples receptores sobre macrófagos de otras especies, las cuales han sido observadas con escasa sensibilidad a la tripsina (81). En fagocitos mononucleares humanos se han identificado tres tipos de receptores que se unen a la región Fc de la IgG. El primero tiene un peso molecular de 72 Kd es análogo al FcR1 de ratones y se une a IgG1 e IgG3 monomérica humana y a

la IgG2a de ratón con alta afinidad, su función es la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo. El segundo tiene un peso molecular de 40 Kd, es parecido al FcR2 de ratón, se une también a la IgG1 e IgG3 humana pero en forma de complejo inmune y con menor afinidad. Ambos receptores FcR2 de humano y de ratón se unen a la IgG1 e IgG2b de ratón. El tercero tiene un peso molecular aproximadamente de 51 a 73 Kd, se expresa principalmente en neutrófilos, células NK, células K y células T. Los últimos dos receptores son utilizados por los fagocitos mononucleares para la endocitosis del complejo inmune. La amplia distribución de varios receptores Fc sobre diversos tipos celulares sugiere, sin embargo, que otras funciones pudieran ser descubiertas para esta familia de moléculas. Además, el polimorfismo de los receptores Fc en el humano ha sido definido por el enlace de las subclases de IgG de ratón, adicionando a su vez la variación potencial funcional (89,90).

Los receptores para Fc son comunmente demostrados por medio de la técnica de rosetas eritrocitarias. Cuando los eritrocitos son cubiertos con anticuerpos, éstos se unen a la superficie de los leucocitos dando lugar a lo que se ha denominado roseta; considerandose como tal, a aquella célula con mas de tres eritrocitos adheridos en su membrana (91). Otras técnicas menos comunes para su valoración son con fluoreseceinatos de anticuerpo (92), por radioisotopos (80,93) o por anticuerpos monoclonales (88).

Dependiendo del método usado y de la especie que se examine, el macrófago posee aproximadamente 10^7 receptores en su membrana. Además, mediante el complejo soluble peroxidasa-antiperoxidasa se ha podido demostrar que hay un mayor número de receptores en macrófagos que en granulocitos, los cuales a su vez presentan una mayor frecuencia de tales receptores que los linfocitos (94). La regeneración selectiva de estos receptores después de la unión con complejos inmunes, puede ser un fenómeno que se relaciona con el tamaño o la cantidad total del material ingerido (95).

Por otra parte, existen evidencias de que no solo el MGI es el responsable de la diferenciación completa de macrófagos y granulocitos, se ha encontrado recientemente una molécula denominada FcRI la cual es capaz de inducir la aparición de receptores Fc en estas células. Esta molécula se obtuvo a partir de una línea celular de tipo macrófágico WR19m, mantenida in vitro y activada por lipopolisacaridos de origen bacteriano (LPS). También se ha encontrado que este factor pierde su actividad biológica al ser sometido al tratamiento proteolítico y al calor, lo que indica que es de naturaleza proteica (96). Así mismo, se ha identificado que el FcRI es independiente del factor inductor de macrófagos y granulocitos (MGI), puesto que este no induce la formación de colonias al utilizar la técnica en bicapa de agar (96). Por otra parte, se ha identificado a las células macrófágicas maduras como las productoras del factor FcRI lo cual implica un posible mecanismo de autorregulación de inducción de receptores Fc en leucocitos (97).

El factor FcRI se ha identificado en distintas fuentes de origen murino y humano. Entre las fuentes de origen humano se encuentran los fluidos corporales tales como los sueros, medios condicionados por pulmón estimulado in vitro con LPS de origen bacteriano y la orina humana normal. Entre las fuentes murinas están los medios condicionados de macrófagos residentes, los medios condicionados de pulmón endotóxico y suero (97,98,99).

Como el factor FcRI es una molécula recientemente identificada, y debido a su importancia biológica se hace imperativo su estudio, por lo que se requiere el establecimiento de una técnica altamente sensible a su presencia para poder caracterizarlo y posteriormente purificarlo. Por lo anterior, en el presente trabajo se pretendió establecer una técnica eficaz para su monitoreo biológico.

Es conocido que la cantidad de células con receptores para Fc en leucocitos depende tanto de la edad del sujeto (72), como su

estado de salud, o su estado de activación inmunológica (99), lo que hace que dentro de una población determinada pueda existir una gran heterogeneidad en la cantidad de estos receptores (100). Debido a la variabilidad esperada en la cantidad de receptores para Fc presentes en las células fagocíticas provenientes de ratones de cepa abierta, se hace difícil la evaluación de la actividad inductora del FcRI, por carecer de un valor de referencia al inicio de los experimentos. Para homogeneizar el número de receptores en estas células se les sometió a un pretratamiento enzimático con tripsina, ya que se sabe que muchos de los receptores para Fc son sensibles a esta proteasa (81). Se esperaba de esta forma que al eliminar gran parte de los receptores para Fc, la aparición de nuevos receptores sea asociada en su totalidad a la actividad inductora del FcRI independientemente del origen de las células. Además, previendo que para el estudio bioquímico de esta molécula se tendrían que utilizar técnicas cromatográficas que por necesidad implicaría el obtener el factor FcRI altamente diluido, se hace necesario el diseño de una técnica confiable y rápida para su detección. Aunado a esto, el análisis de muchas fracciones bioquímicas implica un alto gasto tanto de reactivos como de animales de experimentación. En consecuencia en este trabajo también se desarrolló una técnica de microensayos.

Es importante señalar que la caracterización y purificación de este factor es primordial debido a que en un futuro pudiera el FcRI ser aplicado a pacientes con deficiencias en receptores para Fc, o en aquellos en donde un aumento de estos receptores sea de utilidad. Este aumento provocaría una mayor defensa en contra de enfermedades infecciosas o cuerpos extraños. Además la aplicación de microbioensayos es provechosa, puesto que esta técnica utiliza pocas células mieloides de un solo animal para realizar un bioensayo completo. Por tanto abriría el camino para estudios en seres humanos en donde se evitaría la problemática de obtener grandes cantidades de estas células, o de depender de cepas singénicas para su estudio, que en humanos es imposible.

MATERIAL Y METODO

MATERIAL BIOLOGICO

El trabajo experimental se realizó con células de médula ósea (MO) y macrófagos de la cavidad peritoneal provenientes de ratones hembras de la cepa CD-1 de 6 a 8 semanas de edad, mantenidas en el bioterio de la ENEP-Zaragoza. Además, se utilizaron eritrocitos de carnero para sensibilizarlos con anticuerpo (IgG de conejo).

CULTIVO CELULAR

Como fuente de nutrición de los cultivos celulares se utilizó el medio mínimo de Eagle (ME) con un incremento de vitaminas y aminoácidos (Gibco Labs, USA) (apéndice 1) al que se le adicionó 100 UI/ml de penicilina G y 100 UI/ml de estreptomycinina como medida preventiva de contaminación bacteriana, mas 3.7 g/l de bicarbonato de sodio para mantener el pH fisiológico de 7.2 en los cultivos en presencia de CO₂. Posteriormente se esterilizó por filtración en membrana millipore (Millipore USA) con un diámetro de 0.22 micras. Para verificar dicha esterilidad se tomaron 4 gotas del medio y se colocaron por duplicado en tubos de ensaye que contenían 2 ml de caldo de soya al 3% (Bioxon, Mex), previamente esterilizado en autoclave, incubandolos durante 48 horas a 37°C. El medio de cultivo consistió de ME suplementado con suero de caballo (Microlab, Mex) al 10%, el cual fue previamente inactivado a 56°C durante 30 minutos.

Las células fueron sembradas en la cantidad y condiciones requeridas para cada ensayo en cajas de Petri, ya sea de vidrio o de plástico de 60 x 15mm y mediante el uso de placas de

microcultivo con pozos de 6.4 mm de diámetro (Costar, USA), las cuales contenían un volumen de cultivo celular de 5 ml y de 200ul respectivamente. Las células se mantuvieron *in vitro* en una incubadora a 37°C con una atmosfera relativa del 10% de CO₂ y humedad saturante. Todo trabajo de cultivo celular se realizó en una campana limpia y esterilizada con luz ultravioleta durante 15 min. Para verificar las condiciones de las células se utilizó un microscopio de tipo invertido.

TECNICA PARA OBTENER CELULAS DE MO

Con el objeto de obtener células viables de MO para cuantificar la actividad del factor FcRI, se sacrificaron ratones mediante la dislocación céfalo-medular para proceder a retirar los fémures, colocandolos inmediatamente en cajas de Petri que contenían una solución amortiguadora de fosfatos (SAF) (apéndice 2). Después de eliminar la mayor cantidad posible de tejido muscular circundante, se cortaron las epífisis con tijeras pequeñas y con una jeringa de 1 ml que contenía SAF se hizo fluir el líquido de un extremo a otro del hueso para coleccionar las células en un tubo de centrifuga de plástico. Las células obtenidas se lavaron en SAF (2 ocasiones con centrifugación a 500g durante 3 min.). Para los ensayos se adicionaron 5 ml de medio de cultivo, y se determinó el número celular con un hemocitometro (American Optical, USA). Se sembraron para cada experimento 8×10^6 células por caja de Petri y se mantuvieron en cultivo durante 4 días.

PRETRATAMIENTO DE CELULAS DE MO CON TRIPSINA

Con la finalidad de eliminar receptores para Fc se procedió a utilizar un procedimiento de tripsinización. Para ello una vez que las células de los fémures fueron obtenidas y contadas se

repartieron en 4 tubos a los cuales se les agregaron 15 ml de SAF conteniendo 0.000, 0.008, 0.016 y 0.032% de tripsina respectivamente. Se resuspendieron las células rápidamente en los 4 tubos y se colocaron en baño María a 37°C durante 5 o 10 min. Posteriormente se agrego a cada tubo 0.3 ml de suero de caballo para inhibir la acción de la tripsina. Se procedió a lavar las células con SAF y se determinó el número de éstas en cada tubo para posteriormente ser sembradas en medio de cultivo a una concentración de aproximadamente 6×10^6 células por caja de Petri. En la técnica de microcultivo se tripsinizaron las células mediante el mismo procedimiento, solo que en esta ocasión se utilizó el fémur de solo un ratón y se sembraron 40×10^6 células en cada pozo de la placa de cultivo.

PREPARACION DE MEDIOS CONDICIONADOS POR MACROFAGOS RESIDENTES DE LA CAVIDAD PERITONEAL

Como una fuente conocida del factor FcRI se prepararon medios condicionados (MC) por macrófagos residentes (MacR) activados con lipopolisacaridos (LPS) provenientes de la pared celular de Salmonella typhimurium (Sigma Chem, USA) (MCMacRLPS).

Se sacrificaron ratones para proceder a lavar la cavidad peritoneal inyectando 10 ml de SAF ,dándole en seguida una ligera sacudida al animal con el objeto de suspender la mayor cantidad de células residentes, y poder de esta forma recuperarlas al extraer el SAF inyectado. El exudado se colocó en un tubo de plástico frío para evitar la adherencia de los fagocitos a las paredes del tubo. Se repitió este procedimiento de extracción de células pero utilizando en esta ocasión solo 5ml de SAF. Las células obtenidas se lavarón con SAF, se contarón y se sembraron 4×10^6 en caja de Petri de vidrio. Se incubaron durante 1 hora en ME para permitir la adhesión de los fagocitos al fondo del recipiente de cultivo. Transcurrido este tiempo se procedió a retirar el ME en el que iban todas aquellas células no adheridas.

En seguida se adicionaron 5ml de medio de cultivo nuevo y 10 μ l de una solución stock con 1 μ g/ml de LPS en cada caja. Se incubaron por 4 días, después de lo cual se recogieron los MC y se centrifugaron a 500g por 5 min. para eliminar a las células. Se almacenó el sobrenadante a -20°C hasta su uso.

PREPARACION DE INMUNOGLOBULINA G (IgG)

Se diluyó inmunoglobulina G (7S IgG, Labs. USA) en SAF a 1:1600. Se guardaron 4 ml en tubos de ensaye y se conservaron congelados a -20°C hasta su uso. Siempre se uso el total de IgG diluída una vez descongelada para evitar la pérdida de su actividad.

PREPARACION DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS CON ANTICUERPO

Con el objeto de obtener eritrocitos sensibilizados con anticuerpo (EA) se obtuvo sangre de carnero mediante punción yugular en forma aséptica, e inmediatamente después se colocó en una cantidad equivalente de solución de Alsever (1:1) (apéndice 3) para almacenarse a 4°C . La sangre se dejó en reposo durante una semana y se utilizó sin exceder de un mes a partir de la fecha de extracción.

Para sensibilizar a los eritrocitos se lavarón con SAF, para posteriormente agregar IgG en una proporción de 1:1. Esta mezcla se resuspendió e incubó en baño maría a 37°C durante 30 min para obtener eritrocitos cubiertos con anticuerpo. Los eritrocitos así obtenidos se lavarón con SAF para quitar el exceso de IgG no absorbido por estos. Finalmente se resuspendieron los eritrocitos sensibilizados con anticuerpo (EA) en el doble del volumen de SAF utilizado para su preparación y se almacenaron a 4°C hasta su uso, sin exceder de 3 días.

DETERMINACION DE LOS RECEPTORES DE MEMBRANA Fc POR FORMACION DE ROSETAS EA.

Con la finalidad de determinar la inducción de receptores para Fc en las células de MO, se incubaron éstas en presencia o ausencia del factor inductor FcRI. Al término de 4 días de incubación se revisaron los cultivos al microscopio invertido, después de corroborar visualmente el buen estado de éstas, se procedió a separar las células adheridas al sustrato de cultivo mediante el uso de un gendarme de hule y junto con las células en suspensión se colocaron en tubos de ensaye para lavarlas en SAF. En el último lavado se desecho el sobrenadante y se adicionó 1ml de SAF a cada tubo, después de lo cual se agregaron 100ul de EA. Se resuspendieron las células y se centrifugaron a 500g por 5 min. Se incubaron por 30 min a 37°C en baño María y se guardaron en refrigerador por 24 horas más. Al cabo de este tiempo se resuspendieron cuidadosamente mediante el uso de una pipeta de cultivo de 2 ml, para proceder a determinar el porcentaje de rosetas al microscopio. Se consideró como roseta débil a aquel leucocito que tenía adherido a su membrana más de 4 eritrocitos y menos de 11, y una roseta fuerte a aquel con más de 11. La evaluación del porcentaje de rosetas se hizo al contar un mínimo de 200 células.

EVALUACION DE DATOS

Todos los ensayos se realizaron al menos dos veces y por duplicado y se reportaron sus promedios. En los casos en donde se obtuvieron más de 3 valores por ensayo, se procedió a realizar una prueba de T de student para diferencia de medias con variancias desconocidas con una confiabilidad del 95%.

RESULTADOS

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR INDUCTOR DE RECEPTORES Fc (FcRI) CONTENIDO EN UN MEDIO CONDICIONADO DE MACROFAGOS RESIDENTES DE LA CAVIDAD PERITONEAL, EN PRESENCIA DE LIPOPOLISACARIDOS DE ORIGEN BACTERIANO (MCMacRLPS).

Para la determinación de la actividad del factor FcRI, se sembró médula ósea (MO) de ratón en presencia de 100 ul de MCMacRLPS y al cabo de 4 días se determinó la aparición de receptores Fc mediante la evaluación del porcentaje de células con rosetas para EA. En los 6 ensayos que se realizaron se encontró una gran variabilidad respecto a la capacidad inductora del FcRI, pues en solo 2 ensayos se detectó una clara inducción a la aparición de receptores Fc.

En los dos ensayos en donde si se registro la actividad inductora, se detectaron 13 y 14% de células con receptores para Fc, siendo este porcentaje de aproximadamente el doble del que se encontró en los cultivos controles sin FcRI (6 y 7% respectivamente)(Tabla 1). En los cuatro ensayos en donde no se apreció activación por este factor se encontró solo un 11, 8, 4 y 6% de receptores en presencia del FcRI y 9, 8, 5 y 3% en su ausencia.

La variabilidad de estos resultados dificulta detectar eficazmente la presencia del factor FcRI. Por esta razón, con la finalidad tanto de disminuir la cantidad de receptores para Fc presentes en las células al inicio de los cultivos, como para apreciar mejor la activación debida al inductor, se decidió preincubar las células de MO con tripsina. La elección de este proceso enzimático esta basado en la conocida sensibilidad de los receptores Fc a esta enzima. (81).

TABLA 1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL FcRI CONTENIDO EN EL MEDIO CONDICIONADO DE MACROFAGOS PERITONEALES RESIDENTES, ESTIMULADOS CON LIPOPOLISACARIDOS, MEDIANTE LA EVALUACION DEL PORCENTAJE DE CELULAS MIELOIDES CON ERITROCITOS ADHERIDOS (ROSETAS).

	NUMERO DE ENSAYO											
	1		2		3		4		5		6	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
F	3	8	3	7	6	3	4	8	3	3	1	3
D	3	5	6	4	2	5	3	6	2	1	2	3
T	6	13	9	11	8	8	7	14	5	4	3	6

Se cultivaron 8×10^6 células de médula ósea durante 4 días en presencia o ausencia de 100 ul del MCMacRLPS.

MCMacRLPS: medio condicionado de macrófagos residentes activados con lipopolisacáridos. F, roseta fuerte (más de 11 eritrocitos). D, roseta débil (de 4 a 11 eritrocitos). T, totales. (+) presencia de MCMacRLPS, (-) ausencia de MCMacRLPS.

DETERMINACION DEL EFECTO INHIBITORIO DE RECEPTORES PARA Fc
MEDIANTE LA PREINCUBACION DE LAS CELULAS DE MO CON
DISTINTAS CONCENTRACIONES DE TRIPSINA.

La técnica generalmente utilizada para separar células de tipo fibroblástico del sustrato de cultivo es mediante la incubación de éstas con una concentración de 0.05% de tripsina durante 10 min (101). Sin embargo se sabe que existe siempre cierto porcentaje de muerte celular por este tratamiento. En consecuencia y con la finalidad de reducir este efecto letal en células de MO se decidió usar concentraciones de 0.008, 0.016 y 0.032% durante 10 min. Sin embargo para determinar el daño que aún pudiera causar la tripsina a estas concentraciones, se procedió a evaluar el número celular después de la preincubación, para cada tratamiento. Encontramos que aún a estas concentraciones tan bajas de tripsina la toxicidad celular era importante, pues de 6.62×10^6 en los controles sin tripsina se obtuvieron únicamente 4.75, 3.50 y 2.12×10^6 células en los experimentos con las diferentes concentraciones de tripsina (Tabla 2), sin embargo el efecto tóxico de la tripsina no resulto ser siempre el mismo pues cuando el experimento se repitió, obtuvimos un resultado más satisfactorio pues de 7.75×10^6 células en el experimento sin tripsina disminuyó a 6.00, 5.50 y 5.00×10^6 células respectivamente.

Para evaluar en estas condiciones el efecto inductor del FcRI, se procedió a cultivar estas células en presencia de 100 ul de MCMacRLPS. Se encontro que únicamente cuando se empleo la concentración mínima de tripsina (0.008 %) la formación de rosetas fue similar a la de los cultivos en ausencia de tripsina. En efecto en un experimento se obtuvo que solo a esta baja concentración existió inducción de rosetas pasando de 1 a 5%, similar al control sin tripsina en donde paso de 1 a 8%. En este mismo experimento las rosetas desaparecieron casi completamente cuando se utilizó las concentraciones mayores de tripsina (Tabla 2). En un segundo experimento también se presentó el mismo

TABLA 2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL FcRI EN CELULAS MIELOIDES PREINCUBADAS 10 MIN. CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TRIPSINA, MEDIANTE LA DETECCION DEL PORCENTAJE DE ROSETAS Y LA EVALUACION DEL EFECTO TOXICO DE ESTA ENZIMA.

CONCENTRACION DE TRIPSINA (%)	NUMERO DE ENSAYO					
	1			2		
	(%) DE ROSETAS		NO. DE CELULAS (10 ⁶)	(%) DE ROSETAS		NO. DE CELULAS (10 ⁶)
	-	+		-	+	
0.000	1	8	6.62	3	9	7.75
0.008	1	5	4.75	5	8	6.00
0.016	0	0	3.50	5	5	5.50
0.032	0	1	2.12	1	2	5.00

Se cultivaron los diferentes números de células de médula ósea durante 4 días en presencia o ausencia de 100 ul del MCMacRLPS. MCMacRLPS: medio condicionado de macrófagos residentes activados con LPS.

(+) presencia de MCMacRLPS, (-) ausencia de MCMacRLPS.

comportamiento, pero la inducción del FcRI fue menor ya que aumento en ausencia de tripsina de 3 a 9% y en presencia de 0.008% de esta enzima de 5 a 8%. Sin embargo a las concentraciones mayores tampoco se presentó activación alguna (Tabla 2).

Estos resultados indican que aparte de la alta toxicidad que en ocasiones se presenta en estas concentraciones de tripsina en células de MO, no se logra observar con claridad la actividad inductora del FcRI. En consecuencia se decidió reducir el tiempo de exposición de estas células a la tripsina, para determinar si se podía obtener condiciones en donde la toxicidad sea baja y una mejor activación. Se decidió disminuir el tiempo, en lugar de la dosis, pues suponemos que si se disminuye aún más la concentración de tripsina se pudiera llegar a la situación en la cual no se llegue a desactivar a los receptores para Fc.

Se procedió en consecuencia a repetir los experimentos pero empleando en esta ocasión un período de solo 5 min de incubación con tripsina. Una vez más se determinó el posible daño celular causado por estas concentraciones de tripsina. En esta ocasión se encontró, al igual que en el ensayo con 10 min, que existía una pequeña toxicidad cuando se utilizó la concentración de 0.008% respecto al control sin tripsina. Sin embargo en general no existieron diferencias en muerte celular al incubar durante 5 min si se compara esta con la causada por las concentraciones mayores de tripsina. Aunque los cuatro ensayos se comportaron en forma semejante, el porcentaje de toxicidad fue diferente. En el caso de mayor toxicidad la tripsina aún en sus concentraciones más bajas produjo una muerte celular de 36% (5.30 a 3.37×10^6), mientras que en otro este fue de solo del 10% (6.37 a 5.75×10^6) (Tabla 3).

Posteriormente se procedió a determinar en estas condiciones la actividad del factor FcRI en células de MO en presencia de 100

TABLA 3. DETERMINACION DEL NUMERO DE CELULAS DE MEDULA OSEA despues del tratamiento CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TRIPSINA DURANTE 5 MINUTOS.

CONCENTRACION DE TRIPSINA (%)	NUMERO DE ENSAYO			
	1	2	3	4
0.000	5.30	6.37	8.00	7.75
0.008	3.37	5.75	5.75	5.87
0.016	3.60	5.25	4.50	5.87
0.032	2.80	5.00	5.20	5.20

El número de células para cada tratamiento se indica en millones.

ul de MCMacRLPS. Al igual que cuando se incubó durante 10 min, al incubar por solo 5, se obtuvo que solo a la concentración más baja de tripsina (0.008%) se detectó una clara inducción. Sin embargo los valores en presencia del factor fueron mucho más elevados, pues en los cuatro ensayos efectuados se obtuvo desde 15 hasta 26% (Tabla 4). Además en todos estos ensayos la activación del FcRI resultó ser siempre de casi el doble de la encontrada en el control sin el factor. A concentraciones de tripsina mayores (0.016 y 0.032%) la inducción fue muy pequeña, llegando en casos a ser aún menor que en el control. Vale la pena mencionar que en ausencia del tratamiento con tripsina la inducción por el FcRI fue muy variable. En efecto en un caso no existió activación alguna (10 a 10%), en otros dos esta fue pequeña (13 a 19 y 19 a 27%) y solo en un caso fue del doble (8 a 17%) (Tabla 4). Como este incremento al doble solo se presentó en un caso en ausencia de tripsina y en todos los casos cuando se utilizó la concentración de 0.008% consideramos que el tratamiento con tripsina a esta concentración estabiliza el ensayo.

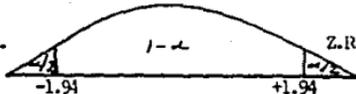
Aún tomando en consideración que solo a la concentración de 0.008% de tripsina la activación del FcRI es evidente y con la finalidad de satisfacer en forma numérica la significancia de nuestros resultados, se decidió realizar una prueba de hipótesis acerca de la diferencia de dos medias $U_1(\text{control}) - U_2(\text{resultado activado con FcRI})$ con varianzas desconocidas y diferentes. Se observó que el estadígrafo de contraste de hipótesis para los distintos tratamientos (t de student), de menor a mayor concentración fue de 1.356, 4.245, 0.433 y 0.846, con respecto al estadígrafo de contraste teórico que va de -1.94 a 1.94 (Tabla 5). Esto indica que 3 de los estadígrafos calculados caen dentro de este intervalo y solo el estadígrafo 4.2449 que pertenece al tratamiento 0.008% de tripsina esta fuera de él, y por lo tanto es el único que rechaza la hipótesis nula, aceptando la hipótesis alterna ($U_1 - U_2 \neq d_0$), señalando que existe en este

TABLA 4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR FcRI EN CELULAS MIELOIDES PREIN CUBADAS 5 MIN. CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TRIPSINA, MEDIANTE LA DE TECCION DEL PORCENTAJE DE ROSETAS.

CONCENTRACION DE TRIPSINA (%)	NUMERO DE ENSAYO							
	1		2		3		4	
	-	+	-	+	-	+	-	+
	PORCENTAJE				DE	ROSETAS		
0.000	10	10	19	27	13	19	8	17
0.008	8	15	13	26	10	20	7	19
0.016	8	8	14	20	10	9	6	7
0.032	10	6	13	16	6	10	7	13

Se cultivaron células de médula ósea durante 4 días en presencia o ausencia de 100ul de MCMacRLPS. MCMacRLPS: medio condicionado de macrófagos residentes activados con - LPS. (+) presencia de MCMacRLPS, (-) ausencia de MCMacRLPS.

TABLA 5. ANALISIS ESTADISTICO DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR FCRI EN CELULAS MIELOIDES PREIN CUBADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TRIPSINA DURANTE 5 MIN.

CONCENTRACION DE TRIPSINA (%)	MEDIAS		VARIANZAS		T STUDENT	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
	\bar{X}_1	\bar{X}_2	S^2	S^2	$t = \frac{(\bar{X}_2 - \bar{X}_1) - d_0}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$	$\alpha = 0.05$ Z. A.
0.000	12.50	18.25	23.00	48.91	1.356	Z.R.  Z.R.
0.008	9.50	20.00	7.00	20.66	4.245	H ₀ $\mu_1 - \mu_2 = d_0$ H _a $\mu_1 - \mu_2 = d_0$
0.016	9.50	11.00	11.66	36.66	0.433	
0.032	9.00	11.25	10.00	18.24	0.846	$gl = \left[\frac{\left[\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2} \right]^2}{\left[\frac{2}{n_1} \right]^2 + \left[\frac{2}{n_2} \right]^2} \right] - 2 = 6$

Prueba estadística: Distribución T de Student con varianzas desconocidas y diferentes.

H₀ : hipótesis nula, indica que no existe diferencia en las medias.

H_a : hipótesis alterna, indica que existe diferencia en las medias.

μ = media poblacional, gl: grados de libertad, n: número de ensayos.

tratamiento una diferencia significativa con una confianza del 95% (tabla 5).

DETERMINACION DEL EFECTO INHIBITORIO DE RECEPTORES PARA Fc POR LA TRIPSINA EN CELULAS DE MO.

Una vez determinado que la preincubación durante 5 min con 0.008% de tripsina representa una mejoría importante al ensayo del FcRI, se procedió a determinar el efecto que en estas condiciones sufrían los receptores para Fc en células de MO. Para ello se utilizaron tanto células recién obtenidas de la médula ósea, como aquellas que fueron cultivadas durante 4 días en presencia, como en ausencia del FcRI. Nuestros resultados indicaron que la preincubación con tripsina en células recién obtenidas de MO, produjo una reducción de más del 50% de los receptores para Fc. En los dos ensayos realizados esta reducción fue de 10 y 9 % a solo el 4% (Tabla 6). Estos resultados concuerdan con la observación conocida de que la mayoría de los receptores para Fc son sensibles a esta proteasa. Se encontró que aún en los cultivos en ausencia del FcRI se obtuvo una inducción a la aparición de receptores para Fc, ya que en los cultivos sin preincubación aumentó de 10 a 14% y de 9 hasta 23%, mientras que en presencia de la preincubación pasó de 4 a 7% y de 4 a 11%. Este aumento en ausencia de factor inductor puede deberse a la secreción de factores inductores por otras células presentes en la MO.

Aunque en todos estos casos existió una activación en ausencia del MCMacLPS, aquella realizada en presencia de este inductor y con preincubación con tripsina fue más significativa. Esta significancia se reflejó en el hecho de que cuando se efectuó la preincubación el inductor produjo un aumento de 7 a 19% y de 11 a 29%, mientras que en ausencia de la preincubación paso de solo 14 a 17% y de 23 a 29% (Tabla 6).

TABLA 6. DETERMINACION DEL EFECTO INHIBITORIO DE RECEPTORES PARA Fc POR LA TRIPSINA EN CELULAS DE MEDULA OSEA, MEDIANTE LA DETECCION DEL PORCENTAJE DE ROSETAS.

DIAS DE INCUBACION	NUMERO DE ENSAYO					
	1			2		
	0	4		0	4	
		-	+		-	+
	(%) DE ROSETAS			(%) DE ROSETAS		
PREINCUBACION CON TRIPSINA	4	7	19	4	11	29
SIN TRATAMIENTO	10	14	17	9	23	29

Se sembraron aproximadamente 8×10^6 células de médula ósea en presencia o ausencia de 100 ul de MMacRLPS. MMacRLPS: medio condicionado de macrófagos residentes activados con LPS. (+) presencia de MMacRLPS, (-) ausencia de MMacRLPS. Las células fueron preincubadas con 0.008% de tripsina durante 5min.

De estos resultados puede entenderse que en principio la tripsina sirve para disminuir la cantidad de receptores de membrana en células mieloides, pero que probablemente también sirva para hacer sensibles a estas células a la acción del factor FcRI.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR FcRI CONTENIDO EN DIFERENTES MCMacRLPS, EN CELULAS DE MO.

Para determinar la actividad inductora del MCMacRLPS se evaluarón 3 medios condicionados MC. Para ello se utilizó como fuente de activación 100 ul de cada MC y la técnica desarrollada que nos garantizaba una baja toxicidad en células de MO, o sea mediante una preincubación de 5 min con 0.008% de tripsina.

Nuestros resultados muestran que una vez más en los cuatro ensayos realizados el porcentaje de rosetas obtenido en los cultivos control sin tripsina fue mayor que cuando la tripsina estaba presente. Estas diferencias no siempre fueron semejantes pues en un extremo se tuvo una reducción de 6 a 2% mientras que en otro de unicamente 14 a 13% (Tabla 7). Asimismo encontramos que en ambos controles ya sea con o sin tripsina los resultados fueron muy heterogeneos, ya que se tuvieron valores tan bajos como del 2% y tan altos como del 19%. Con respecto a la actividad inductora de los tres diferentes MC encontramos que en ausencia de tripsina la induccion fue de menor cuantía que la presentada por los cultivos preincubados con tripsina. Por ejemplo en los cultivós sin preincubación con tripsina la activación inducida por los MC nunca llegaron a ser de más del doble de aquella presentada por los controles sin MC. Es más en un par de ensayos esta fue tan baja que se observó variaciones máximas de un 14 a 17% y de un 19 a 26% (Tabla 7). Aunque hay que mencionar que existieron casos en los cuales la inducción fue casi nula. Sin embargo cuando se utilizó la preincubación con tripsina la inducción mediada por los diferentes MC empleados dieron siempre

TABLA 7. DETERMINACION EN CELULAS DE MEDULA OSEA DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR FcRI CONTENIDO EN DIFERENTES MEDIOS CONDICIONADOS DE MACROFAGOS RESIDENTES ESTIMULADOS CON LIPOPOLISACARIDOS (MCMacRPLS).

	NUMERO DE ENSAYO							
	1		2		3		4	
	S	T	S	T	S	T	S	T
	P O R C E N T A J E D E R O S E T A S							
CONTROL	6	2	8	6	14	13	19	8
MCMacRLPS 1	10	8	13	12	17	21	25	22
MCMacRLPS 2	9	10	15	16	17	28	20	25
MCMacRLPS 3	-	-	-	-	14	35	26	29

Se sembraron aproximadamente 8×10^6 células de médula ósea en presencia o ausencia de 100 ul de MCMacRLPS. T : células preincubadas con 0.008% de tripsina durante 5 min. S: células sin preincubación.

cuando menos el doble. En particular se obtuvo un incremento de 5 veces al pasar de 2 a 10% en un ensayo y de más de 3 veces en otro al pasar de 8 a 29% (Tabla 7).

Una vez más encontramos una heterogeneidad en nuestros resultados. Como la inducción fue tan baja en los cultivos sin preincubación con tripsina fue muy difícil determinar cual de los tres MC presentaba la mayor actividad, sin embargo este problema no se presentó en los cultivos con preincubación ya que al existir diferencias importantes se observó cual tenía la mayor actividad, y cual la menor. Estos resultados indican la ventaja de utilizar en forma rutinaria la preincubación con tripsina en los ensayos de evaluación de la actividad inductora del FcRI.

DISEÑO DE UNA TÉCNICA DE MICROCULTIVOS PARA LA EVALUACION DEL EFECTO INDUCTOR DE RECEPTORES Fc POR EL FcRI EN CELULAS DE MO

Una vez establecida una técnica confiable para la evaluación del efecto inductor del FcRI en células de MO, se procedió a diseñar una técnica de microcultivo. Esta técnica se hace imperiosa con la finalidad de emplear para un mismo fin un número reducido de células, así como de disminuir el costo de dicho ensayo. La ventaja de llegar a utilizar pocas células se refleja en el hecho de que al emplear el fémur de un solo animal se evitaría la posible existencia de fenómenos de incompatibilidad inmunológica entre las diferentes poblaciones celulares y nos permitiría el extrapolar estos experimentos al ser humano en donde la posibilidad de disponer de cepas singénicas es inexistente.

Para ello se realizaron cuatro ensayos donde se utilizaron tanto las células de MO de cada ratón por separado, como la mezcla de todos ellos. Los porcentajes de rosetas determinados para la células de MO del ratón 1,2,3,4 y la mezcla de células fue de 16, 20, 17, 29 y 28% sin preincubación con tripsina, respecto a 9, 11, 10, 15 y 14% de su control sin McMacR; y para

las células con preincubación fue de 35, 29, 34, 26 y 44%, con respecto a 15, 15, 18, 15 y 12% de su control sin McMacR (tabla 8).

Al igual que lo obtenido mediante las técnicas de macrocultivo anteriormente descritas se percibe con mayor claridad la actividad del factor FcRI en las células tratadas con tripsina en comparación con las células sin este tratamiento.

Para determinar una vez más la efectividad del manejo de los microcultivos, tanto en el ahorro de material como en la veracidad de sus resultados, se hizo un experimento similar al anterior, solo que en esta ocasión se determinó el porcentaje de rosetas a tiempo cero y después de 4 días de cultivo. Se realizaron 3 ensayos con células de MO de ratón tratadas separadamente y la mezcla de éstos. Los resultados mostraron que el porcentaje de rosetas a tiempo cero para el ratón 1, 2, 3 y la mezcla fue de 0, 5, 15 y 2% en células sin tratamiento con tripsina; y en células con tratamiento se encontró un 1, 5, 3 y 3 % respectivamente. Después de 4 días el porcentaje de receptores fue para células sin este tratamiento de 40, 24, 20 y 20% con respecto a 36, 10, 12 y 10% de su control sin McMacR. Para las células con tripsina fue de 53, 23, 35 y 27% con respecto a 34, 10, 11 y 10% de su control sin McMacR, respectivamente (tabla 9).

Nuestros experimentos muestran que aunque se presentó también una gran heterogeneidad entre los diferentes ensayos, se obtuvieron semejantes resultados que con los macrocultivos. Sobre todo en lo que respecta a la ventaja de utilizar la preincubación de la células con tripsina y el hecho de que aunque existe inducción a la aparición de receptores para Fc en ausencia de FcRI exógeno, la inducción es netamente superior al agregarse este factor.

TABLA 8. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR FcRI EN CELULAS MIELOIDES, MEDIANTE LA TECNICA DE MICROCULTIVO.

	<u>1º RATON</u>		<u>2º RATON</u>		<u>3º RATON</u>		<u>4º RATON</u>		<u>5º MEZCLA CELULAR</u>	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	PORCENTAJE DE ROSETAS									
PRETRATAMIENTO CON TRIPSINA	15	35	15	29	18	34	15	26	12	44
SIN TRATAMIENTO	9	16	11	20	10	17	15	29	14	28

Se sembraron aproximadamente 4.5×10^5 de células mieloides en presencia o ausencia de MCMacRLPS. MCMacRLPS: medio condicionado de macrófagos residentes activados con LPS. - (+) presencia de 4ul de MCMacRLPS, (-) ausencia de MCMacRLPS.

TABLA 9. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR FcRI EN CELULAS MIELOIDES, POR RATON Y SU MEZCLA CELULAR, MEDIANTE LA TECNICA DE MICROCULTIVO.

DIAS DE INCUBACION	1º RATON		2º RATON			3º RATON			5ºMEZCLA CELULAR			
	0	4	0	4		0	4		0	4		
		- +		- +			- +			- +		
PORCENTAJE DE ROSETAS												
PREINCUBACION CON TRIPSINA	1	34	53	5	10	23	3	11	35	3	10	27
SIN TRATAMIENTO	0	36	40	5	10	24	15	12	20	2	10	20

Se cultivarán aproximadamente 4.5×10^5 células de médula ósea durante 4 días en presencia o ausencia de MMacRLPS. MMacRLPS: medio condicionado de macrófagos residentes activados con LPS. (+) presencia de MMacRLPS, (-) ausencia de MMacRLPS.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En los últimos años las ciencias Biológicas han avanzado a pasos agigantados. Entre los logros más importantes se encuentran los estudios de moléculas de origen biológico cuyas propiedades son la de regular el comportamiento de los sistemas de los seres vivos. A estas moléculas se les ha dado el nombre de modificadores biológicos. Entre los más conocidos hoy en día se encuentra el interferón, las interleucinas y las hemopoyetinas. Es indudable que en un futuro no muy lejano se utilicen estos reguladores para controlar y curar muchas de las enfermedades que nos aquejan hoy en día, ya que al ser secretadas por el propio individuo no tienen en la mayoría de los casos los problemas de alta toxicidad asociados con los medicamentos existentes actualmente.

Uno de los sistemas que garantizan la sobrevivencia del ser humano en nuestro planeta es el sistema de defensa inmune. Dentro de este sistema se encuentran las células que portan los receptores para anticuerpos y forman la primera línea de defensa contra microorganismos o cuerpos extraños. Recientemente se ha identificado la existencia de un modificador biológico que tiene la propiedad de inducir la formación de receptores para inmunoglobulinas en células inmunocompetentes. A este factor se le ha designado con el nombre de FcRI. Es evidente que el estudio y purificación de este factor deba tener en los próximos años una importancia significativa dentro del área de la salud.

Por otra parte los avances tecnológicos nos han llevado a la posibilidad de utilizar las técnicas de la ingeniería genética para la producción de moléculas útiles al hombre. De tal forma que se ha introducido a microorganismos una información genética semejante a la que codifica ciertas proteínas del genoma humano. Por lo tanto, las bacterias al proliferar secretan al medio de cultivo grandes cantidades de estas moléculas, las cuales se han denominado recombinantes. Muchos de los

modificadores biológicos estudiados hoy en día se encuentran justamente producidos de esta manera.

Es evidente que si se desea estudiar la utilidad del FcRI en los sistemas biológicos, el obtenerlo en forma recombinante facilitaría el logro de esta meta. Para poder llegar a esta etapa de sofisticación es necesario el poder purificar previamente a la molécula, y para ello deben ser desarrolladas técnicas de detección biológica sencillas y reproducibles.

En este trabajo se desarrolló una técnica capaz de permitir la medición de la actividad del factor FcRI en forma confiable, repetitiva y expedita. Para ello se consideró indispensable el desarrollo de una técnica de microcultivo, por la conveniencia tanto del ahorro en el uso de células y de reactivos, como por la de permitir el empleo de un solo animal evitando de esta manera las posibles reacciones de rechazo inmunológico. Además, el desarrollo de una técnica que utilice un solo animal tiene la gran ventaja de poder ser extrapolado al ser humano, en donde evidentemente se trabaja siempre con células del propio individuo.

Como células de prueba, se emplearon aquellas de la médula ósea de ratón puesto que fue con ellas donde se descubrió la existencia del FcRI y como fuente del factor se utilizó el medio condicionado por macrófagos residentes de la cavidad peritoneal, estimulados *in vitro* con lipopolisacáridos de origen bacteriano (MCMacRLPS), pues se encontró que los macrófagos representaban una fuente muy activa del FcRI. Aunque este medio resultó ser como se esperaba rico en FcRI, en algunos ensayos su actividad inductora no se puso de manifiesto. Esto nos hizo pensar en la posible existencia de un regulador negativo, producido por alguna de las múltiples células que existen en la médula ósea.

Puesto que se sabe que la mayoría de las células que intervienen en los procesos de regulación tanto positiva como negativa en la hematopoyesis son mediados por receptores de membrana, supusimos que si pudiesemos eliminar a estos

receptores, podríamos llegar a disminuir este efecto regulador negativo. Por esta razón se realizó un pretratamiento enzimático con tripsina para eliminar a todos aquellos receptores sensibles y de esta manera partir de unas condiciones celulares en donde los procesos de regulación negativa estén disminuidos. Por otro lado si tomamos en consideración que uno de los problemas encontrados durante nuestros ensayos fue la heterogeneidad del número de receptores para Fc en nuestras células de médula ósea, entonces el pretratamiento con tripsina tendría la segunda ventaja de disminuir importantemente a éstos, garantizando de esta manera una mayor homogeneidad en nuestras condiciones experimentales.

Nuestros resultados mostrarón tal y como era esperado que la administración de tripsina a las células de médula ósea disminuía en más del 50% el número de receptores para Fc y que el efecto de regulación negativa se eliminaba importantemente. En efecto obtuvimos que las células mieloides preincubadas con 0.008% de tripsina durante 5 min presentarón la mejor inducción de receptores por el FcRI en comparación a las otras concentraciones de tripsina y tiempos de incubación ensayados. En consecuencia estas condiciones permitían obtener una diferencia significativa en la inducción de receptores en ausencia y en presencia del FcRI, abriendo el camino para un ensayo confiable, estable y de fácil evaluación.

Con respecto al efecto tóxico de las concentraciones de tripsina en las células se encontró una pequeña disminución en el número celular, del 24% en promedio, con la concentración de tripsina seleccionada. Sin embargo de un ensayo a otro se encontró cierta heterogeneidad en la disminución celular mediada por la toxicidad de la enzima. Creemos que este hecho señala la posibilidad de que no todas las células mieloides presentan la misma sensibilidad por la tripsina, y tal vez el grado de sensibilidad de estas células puede depender de la cantidad de receptores que presenten en su membrana y de que tanto sean

sensibles éstos a la tripsina.

Como el factor FcRI es contenido en los MCMacRLPS, se pensó que todos ellos producirían regularmente la misma intensidad de la actividad de este factor. Sin embargo, se encontró que existen MCMacRLPS más activos que otros, lo cual indica la existencia de variaciones en la secreción del factor por estas células fagocíticas. Aunque no tenemos una explicación concreta de este comportamiento, creemos que posiblemente estas variaciones dependan de la fase del ciclo celular en que la mayoría de éstas se encontraban al momento de ser activadas con LPS. Por otra parte esta variación en la secreción del factor se puede aprovechar para encontrar el MCMacRLPS más activo y con él, facilitar los estudios para su purificación. Estos resultados abren el camino para que se estudien las condiciones ideales para que estas células sean capaces de secretar este factor, para la obtención de una buena fuente productora que nos lleve a intentar una purificación bioquímica.

Con respecto a la técnica de microcultivos, resulto ser útil en el ahorro de material tanto biológico como químico, de tal manera que si se empleaban antes 40 ml de medio de cultivo, ahora se emplean 1.6 ml de este. Con respecto al material biológico, si se utilizaban 64 millones de células, ahora solo 3.6 millones de ellas. Además los resultados obtenidos en estos microcultivos mostrarán una vez más que las células mieloides preincubadas con tripsina 0.008% presentan diferencias significativas (de 18.25% con preincubación y de 8.00% sin preincubación, en promedio) con los cultivos en ausencia de ésta.

También es importante señalar que en los cultivos tratados con tripsina se presentaron dos hechos interesantes. El primero consistió en que aunque en uno de los experimentos se encontró que las células mieloides provenientes de los ratones tratados por separado presentaron una respuesta similar entre sí a la

inducción de receptores por el FcRI, la mezcla celular presentó un importante incremento (de 12 a 44%, Tabla 8). El segundo hecho interesante fue que en otro de los experimentos las células mieloides de uno de los ratones manifestó una mayor cantidad de receptores Fc, en comparación tanto con las otras células tratadas individualmente como con la mezcla celular (de 34 a 53%, Tabla 9). Cabe mencionar que la regulación de la diferenciación hematopoyética puede ser modulada por diversos tipos celulares, como lo son las células T, las cuales secretan linfocinas inductoras de la hematopoesis, o las células NK las cuales secretan linfocinas inhibitoras de esta respuesta. Uno de los principales problemas que se presenta en el ser humano cuando se intenta efectuar trasplantes de órganos es el alto grado de rechazo inmunológico que se presenta, este rechazo esta mediado por el reconocimiento del linfocito T del aceptor de un complejo mayor de histocompatibilidad diferente en las células del donador. Este reconocimiento dispara una respuesta tal que el órgano es rechazado rápidamente. Es conocido que para que este rechazo se presente es necesario la presencia funcional de los receptores del linfocito. Siendo que nosotros trabajamos con ratones de una cepa abierta no singénica, sugiere la posibilidad de encontrar problemas de histocompatibilidad al mezclar las células mieloides de distintos individuos, ya que en la médula ósea existe una gran diversidad de células, entre las cuales se encuentran los linfocitos T que al mezclarse pudieran reconocer diferentes proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad. Este reconocimiento provocaría una activación inmunológica que tendría como consecuencia la secreción de factores del tipo de las interleucinas. Estas interleucinas tienen la propiedad de activar a las células fagocíticas en sus funciones, haciendo que aún en ausencia del factor regulador se induzcan receptores para Fc. Puesto que nuestro objetivo era determinar la actividad inductora del FcRI, era evidente que se debería de evitar reacciones inmunológicas del tipo descrito. Como la cepa de ratones que se utilizó era abierta entonces se podría esperar la

existencia de reacciones inmunológicas al mezclar diferentes tipos de células para un ensayo con FcRI. Consideramos que para evitar este tipo de problemática era conveniente eliminar el reconocimiento de un linfocito de un animal a las células de otro, para ello se penso en dos alternativas. En una se utilizó una preincubación con tripsina para eliminar a los receptores del linfocito T y la segunda en la cual se desarrollo una técnica de microcultivo, la cual por requerir pocas células permitió el efectuar multiples experimentos con las células de un solo ratón.

Finalmente mencionaremos que creemos haber obtenido una técnica sensible a la presencia del factor FcRI contenido en el MCMacRLPS al preincubar células mieloides en 0.008% de tripsina ya, que con este pretratamiento se presenta una diferencia significativa entre los cultivos con el factor y sus respectivos controles. Aunado a esto la aplicación de la técnica de microcultivo facilitará el aislamiento de este factor. Además, esta técnica no solo ayudaría a monitorear al factor FcRI, sino a todo aquel factor que presente propiedades similares a este. Asimismo es importante el estudio de este factor ya que no solo ayudaría a contribuir en los conocimientos de los mecanismos de la diferenciación hematológica e inmunofagocítica en la ciencia básica, sino que también podría tener aplicaciones diagnósticas mediante la producción de anticuerpos que permitiera indicar en forma inmediata la existencia de niveles anormales del factor en el organismo, y terapéutica donde un incremento de receptores en el organismo sea de utilidad. Asimismo en un futuro poder ser aplicado no solamente a personas con deficiencias de este factor sino que también pueda ser administrado como un medicamento preventivo a las diversas enfermedades infecciosas tan frecuentes hoy en día, como es el catarro entre otras.

APENDICE 1

MEDIO MINIMO ESENCIAL DE EAGLE

Este medio se utilizó para mantener a los cultivos celulares en condiciones normales *in vitro*. A continuación se mencionan los componentes químicos que constituyen este medio.

Aminoácidos	mg/l
L-Arginina	84.0
L-Cistina	62.57
L-Glutamina	584.0
Glicina	30.0
L-Histidina HCl.H ₂ O	42.0
L-Isoleucina	105.0
L-Leucina	105.0
L-Lisina HCl	146.0
L-Metionina	30.0
L-Fenilalanina	66.0
L-Serina	42.0
L-Treonina	95.0
L-Triptófano	16.0
L-Tirosina (sal disódica)	104.2
L-Valina	94.0
Vitaminas	mg/l
D-Ca pantotenato	4.0
Cloruro de colina	4.0
Ac. fólico	4.0
Inositol	7.2
Nicotinamida	4.0
Piridoxal HCl	4.0

Riboflavina	0.4
Tiamina	4.0

Sales inorgánicas	mg/l
-------------------	------

Cloruro de calcio anhidro	200.0
Nitrato de fierro III nonahidratado	0.1
Cloruro de sodio	6400.0
Cloruro de potasio	400.0
Sulfato de magnesio anhidro	97.0
Fosfato monosódico monohidratado	125.0

Otros compuestos	mg/l
------------------	------

L-Glucosa	4500.0
Rojo fenol	15.0

En 950 ml de agua destilada, se diluyó el medio en polvo agitando ligeramente, se adicionaron 3.7 g/l de bicarbonato de sodio y antibióticos como Penicilina G 100 U/ml y estreptomycin 100 ug/ml. Posteriormente se aforó a un volumen de 1000 ml y se agitó hasta disolverse, sin sobre agitar. El medio fue ajustado a un pH de 6.9 y después se filtró con filtros millipore (Millipore, USA) con un tamaño de poro de 22 micras. Finalmente el medio se almacenó a 4 °C hasta su uso.

APENDICE 2

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS

Esta solución se uso para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La

capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes fueron diluidos en un volumen final de 1000 ml de agua bidestilada.

Compuestos	gr
Cloruro de magnesio	0.1
Cloruro de calcio	0.1
Cloruro de sodio	8.0
Cloruro de potasio	0.2
Fosfato monoácido de sodio	2.16
Fosfato diácido de potasio	0.2

El cloruro de magnesio y el de calcio fueron diluidos en 100ml de agua bidestilada. Las restantes sales, por separado se diluyeron en 800 ml de agua bidestilada y posteriormente se adicionaron los 100 ml que se prepararon inicialmente. En seguida se aforó a un volumen final de 1000ml, y esta solución se ajustó a un pH de 7.2 a 7.4; después se esterilizó la solución utilizando filtros de membrana (Millipore, USA) con un diámetro de poro de 22 micras. Finalmente la solución se guardó a una temperatura de 4 °C hasta el momento de su uso.

APENDICE 3

SOLUCION DE ALSEVER

Esta solución permite mantener a los eritrocitos de carnero en condiciones estables por largo tiempo, aproximadamente 30 días, a una temperatura de 4 °C. La fórmula expuesta abajo es una modificación de la fórmula original de Alsever.

Componentes:

Dextrosa	20.5 g
Citrato de sodio dihidratado	8.0 g
Acido cítrico monohidratado	0.55 g
Cloruro de sodio	4.2 g
Agua destilada	1 litro

En 900 ml de agua destilada se disolvieron sucesivamente cada una de las sustancias, posteriormente se aforó a un volumen de 100ml. La solución se ajustó a un pH de 6.1 y se esterilizó en autoclave. Finalmente se guardó a una temperatura de 4°C hasta su uso. Esta solución se utilizó para colocar los eritrocitos de carnero en una proporción de 1:1.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Fawcett W.M.D. 1987. Tratado de histología. Interamericana. Mc Graw Hill. México. 111- 112.
- 2.- Haw A.W., D.H. Cormack. 1979. Histology. 8th. ed. Harper and Row. New York. 295.
- 3.- Weiss L. 1977. The blood. En: Histology. (Weiss, L.ed) cap. 10 Mac Graw Hill, New York. 433.
- 4.- Brow B.A. 1976. Hematology: principles and procedures. Lea and Febiger. Philadelphia. 1,2,29-70.
- 5.- Leonhardh H. 1975. Histología, citología y microanatomía humana. Salvat. Barcelona. 130,131, 145-182.
- 6.- Fundenberg H. 1979. Manual de inmunología clinica. El Manual Moderno. México. 30.
- 7.- Stites P.D., J.D. Stobo, H.H. Fundenberg and V.J. Ellis. 1985. Inmunología basica y clinica. El Manual Moderno. 842.
- 8.- Golde D.W. and W.G. Hocking. 1982. Monocytes and macrophages development. In: Phagocytic cell. Vol. 1. Advances in host defense machanisms. (Gallin J.I. and A.S. Fauci). Ravens Press. New York. 13-130.
- 9.- Ham A.W. and D.H. Cormack. 1983. Tratado de histología. 8a.ed. Interamericana. México. 275-282.
- 10.- Herberman R. B. 1982. NK cells and other natural effector cells. Academic Press. 209-239.
- 11.- Maximov A.A. 1924. Relation of blood cells to conective tissue and endothelium. Phisiol Rev. 4:533.
- 12.- Sabin F.R., F.R. Miller and K.C. Smithburn. 1976. Changes in the bone marrow and blood cells of developing rabbits. J: Exp Med. 64:97.
- 13.- Till J.E. and E.A. Mc Culloch. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat Res. 14:456.
- 14.- Becker A.J., E.A. Mc Ulloch and J.E. Till. 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from trasplanted mouse marrow cells. Nature. 197:234.
- 15.- Wintrobe M.M. 1980. Blood, pure and eloquent. Mc Graw Hill. New York. 110.

- 16.- Curry J.L. and J.J. Trentin. 1967. Hemopoietic spleen colony studies. I. Growth and differentiation. *Dev Biol.* 15:678.
- 17.- Trentin J., N. Wolf and U. Cheng. 1967. Antibody production by mice repopulated with limited numbers of clones of lymphoid cell precursors. *J Immunol.* 98:674.
- 18.- Dexter T.M. 1978. Stem cells in vitro. En: Hematopoietic cell differentiation. vol. X (Golde D.W., M. Cline, D. Moore MAS eds.) Aca Press. New York. 328.
- 19.- Philips R.A., E.V. Jones and R.G. Miller. 1978. Differentiation potential of hematopoietic stem cells. En: Hematopoietic cell differentiation. vol X (Golde D.M., M. Cline, D. Metcalf, Moore MAS. eds). Aca Press. New York.456.
- 20.- Bradley T.R. and D. Metcalf. 1966. The growth of bone marrow cells in tissue culture. *J. Cell Comp Physiol.* 66:1321.
- 21.- Pluznik D.H. and L. Sachs. 1965. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J. Cell Comp Physiol.* 55:319.
- 22.- Eaves A. and W. Bruce. 1973. In vitro production of colony stimulating activity. I. Exposure of mouse peritoneal cell to endotoxin. *Cell Tissue Kinet.* 7:1984.
- 23.- Metcalf D., G.R. Johnson and A.W. Burger. 1980. Direct stimulation by purified GM-CSF of the proliferation of multipotential and erythroid precursor cell. *Blood.* 55:1456.
- 24.- Steward C. and H. Ling. 1978. Macrophage growth factor and it is relationship to colony stimulating factor. *J. Reticuloendothelial Soc.* 4:1123.
- 25.- Di Persio J.F., J.K. Brennan, M.A. Lichman and B.L. Spicer. 1978. Granulocyte growth modulators elaborated by human cell lines in hematopoietic cell differentiation. *Blood.* 51:1278.
- 26.- Metcalf D. and R. Foster. 1977. Behavoir of transfer of serum stimulated bone marrow colonies. *Proc Nac Acad Sci.* 68:1089.
- 27.- Landau T. and L. Sachs. 1971. Characterization of the inducer required for the development of macrophage granulocytes colonies. *Proc Nat Acad Sci.* 68:1234.
- 28.- Zambrano I.R., J.R. Caceres, J.F. Mendoza, E. Santiago, M.L. Mora, M.G. Morales, T.C. Corona and B. Weiss. 1988. Evidences that fibroblasts and epithelial cells produce a specific type of macrophage and granulocyte inducer (MGI), also known as colony stimulating factor (CSF), and that monocyte-macrophages can another factor and differentiative activity on macrophages. *Annals of the New York Academy of Sciences.* (In press).

- 29.- Nathan C.F. 1987. Secretory products of macrophages. *J Clin. Invest.* 79:319
- 30.- Nelson D. 1976. Immunobiology of the macrophage. *Aca. Press.* New York. 633.
- 31.- Cohn Z,A. 1978. Opinion. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future. *J Immunol.* 121:813.
- 32.- Shaw R,D. and M.F. Griffin. 1982. Thioglycollate- elicited mouse peritoneal macrophages are less efficient than resident macrophages in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 128:433.
- 33.- Edelson P.J., R. Zwiebel and Z.A. Cohn. 1975. The pinocytotic rate of activated macrophages. *J. Exp. Med.* 142:1118
- 34.- Ratzan K.R., D.M. Musher, G.T. Keusch and L. Weinstein. 1972. Correlation of increased metabolic activity resistance to infection, enhanced phagocytosis and inhibition of bacterial growth by macrophages from *Listeria* and BCG infected mice. *Infect. Immunol.* 5:449.
- 35.- Edelson P.J. and C. Erbs. 1978. Biochemical and functional characteristics of the plasma membrane of macrophages from BCG-infected mice. *J. Immunol.* 120:456.
- 36.- Bianco C., F.M. Griffin and S.C. Silves. 1975. Studies of the macrophage complement receptor. Alteration of receptor function upon macrophage activation. *J. Exp Med.* 141:1278.
- 37.- Carr K. and I. Carr. 1970. How cell settle and glass: a study by light and scanning electron microscopy of some properties of normal and stimulated macrophage. *Z. Zellforsch Mikrosk Anat.* 105:234.
- 38.- Melson H. and R. Seljelid. 1973. The cytotoxic effect of mouse macrophages on syngenic and allogenic erythrocyte. *J Exp. Med.* 131:807.
- 39.- Hibbs Jr J.B. 1976. The macrophage as a tumoricidal effector cell: A review of in vivo and in vitro studies on the mechanism of the activated macrophage non specific cytotoxic reaction. En: *The macrophage in neoplasia.* (M.A. Fink. ed.) *Aca. Press.* New York. 507.
- 40.- Hanna Jr M.G., C. Bocana, B. Hobbs and I.J. Fidler. 1976. Morphology aspect of tumor cell cytotoxicity by effector cell of the macrophage histiocyte compartment in vivo and in vitro studies in BCG mediated tumor regression. En: *The macrophage in neoplasia.* (M.A. Fink. ed) *Aca. Press.* New York. 341.
- 41.- Dannenber Jr A.M. 1968. Cellular hypersensitivity and cellular immunity in the pathogenesis of tuberculosis:

specificity, systemic and local nature and associated macrophage enzymes *bact. Rev.* 32:85.

- 42.- Vander Z., B.A.M. Stewart, C.C. and S. Schlesingers. 1978. Proliferative capacity of mouse peritoneal macrophages in vitro. *J. Exp. Med.* 147:897.
- 43.- Burgaleta C., M.C. Territe S.G. Quan and D.W. Golde. 1978. Glucan activated macrophages: functional characteristics and surface morphology. *J. Reticuloendothelial Soc.* 23:195.
- 44.- Mc Keever P.E., A.J. Garvin, D.H. Hardin and S. Spicer. 1976. Immune complex receptor on cell surfaces. II. cytochemical evaluation of their abundance on different immune cells: distribution, uptake, and regeneration. *Am J Pathol.* 84:437.
- 45.- Territo M.C., D.W. Golde and M.S. cline. 1976. Macrophage activation and function. En: *Manual of Clinical Immunology.* (N.R. Rose and H, Friedman, ed.) Am. Soc for Microbiol. Washington. 166.
- 46.- Stubbs M., A.C. Kuhner, E.A. Glass, J.R. Davies and M.L. Karnovsky. 1973. Metabolic and functional studies on activated mouse macrophages. *J. Exp Med.* 137:537.
- 47.- Edelson P.J. and Z.A. Cohn. 1976. 5 Nucleotidase activity of mouse peritoneal macrophages. I. synthesis and degradation in resident and inflammatory population. *J. Exp. Med.* 144:1581.
- 48.- Allison A. and P. Davies. 1975. Increased biochemical and biological activities of mononuclear phagocytes exposed to varies stimuli, with reference to secretion of lysosomal enzymes. En: *Mononuclear phagocytes in immune infection and pathology.* (R. van Furth ed) Blackwell, London. 487.
- 49.- Kay N. and D. Douglas. 1977. Mononuclear phagocytes: development, structure, function, and involvement in immune response. *N Y State J Med.* 77:327.
- 50.- Sluiter W., E. Hulsing-hesselink, I. Elzenga-Claasen, L.W.M. Hemsbergen-Oomens and R. Furth. 1987. Macrophage as origin of factor increasing monocytopenia. *J Exp. Med.* 166:909.
- 51.- Cells P. and G. Combs. 1977. *Clinical aspects of immunology.* Blackwell. Oxford. 644.
- 52.- Porter R.R. 1976. La estructura de los anticuerpos. *Scientific American.* Blume. España. 875.
- 53.- Kabat E.A. 1980. Opinion. Origins of antibody complementarity and specificity-hypervariable regions and the minigene hypothesis. *J. Immunol.* 125:961.

- 54.- Kabak E.A. 1975. Structural concepts in immunology and immunochemistry. 2o. ed. Hort, Renshaw and Winston. New York. 890.
- 55.- Porter R.R. 1973. Structural studies of immunoglobulins. Science. 180:713.
- 56.- Capra J.D. and A.B. Edmundson. 1977. The antibody combining site. Science Am. 236:146.
- 57.- Edelman G.M. 1970. The structure and function of antibodies. Science Am. 223:298.
- 58.- Silverton E.W., M.A. Navia and D.R. Davies. 1977. Threedimensional structure of an intact human immunoglobulin. Proc Natl Acad Sci. 75:768.
- 59.- Winkelhake J.L. 1978. Immunoglobulin structure and effector function. Immunochemistry. 15:695.
- 60.- Diamond B., B. Birshtein, B. Scharff. 1979. Site of binding of mouse IgG 2b to the Fc receptor in mouse macrophages. J. Exp. Med. 150:721.
- 61.- Dorrington K. 1976. Properties of the Fc receptor in macrophages and monocytes. Immunol Commun. 5:263.
- 62.- Natvig J.B. and H.G. Kunkel. 1973. Human immunoglobulins: classes, subclasses, genetic variants and idiotypes. Adv. Immunol. 16:1.
- 63.- Davies D.R. and H. Metzger. 1983. Structural basis of function. Ann. Rev. Immunol. 4:87.
- 64.- Roitt I.M., J. Brostoff and D.K. Male. 1986. Immunology. Gower Medical Publishing Ltd. New York. 5.3 y 5.4.
- 65.- Mc Keever P. and S. Spicer. 1980. Surface receptor of mononuclear phagocytes. En: Reticuloendothelial System. Vol 1 (carr I., W. Daems) Plenum Press, New York. 161-258.
- 66.- Veřvicka V., L. Fornusek, W.P. Kincade and J. Kopecek. 1986. Co-expression of different types of Fc receptors on murine peritoneal macrophages. Eur. J. Immunol. 16:901.
- 67.- Hibbs L.M., D.I. Walker, L. Kirszbaum, A.G. Pietersz, J.N. Deacon, W.G. Chambers, C. I.F. McKenzie and M.P. Hogarth. 1986. The murine Fc receptor for immunoglobulin: purification partial amino acid sequence and isolation of cDNA clones. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:6980.
- 68.- Knyszynski A., S. Lebovich and D. Danon. 1977. Phagocytosis of "old" red blood cell by macrophages from syngenic mice in vitro. Exp Hematol. 5:480.

- 69.- Kay M.M. 1975. Mechanism of removal of senescent cell by human macrophages in situ. Proc Natl Acad Sci. 72:345.
- 70.- Jancik J.M. and R. Schaver. 1978. Sequestration of neuraminidase treated erythrocyte. Studies on its topographic, morphologic and immunologic aspects. Cell Tissue Res. 186:209.
- 71.- Daeron M., C. Neauport-Santes, U. Blank and W.H. Fridman. 1986. 2.4.G2, a monoclonal antibody to macrophage Fc receptors, reacts with murine T cell Fc receptors and IgG-binding factors. Eur. J. Immunol. 16:1545.
- 72.- Vetvicka V., L. Fornusek and Zidkova. 1985. The expression of Fc and complement receptors in young, adult and aged mice. Immunology. 56:73.
- 73.- Lane C.B. and M.S. Cooper. 1982. Fc receptors of mouse cell lines. I. Distinct proteins mediate the IgG subclass-specific Fc binding activities of macrophages. J. Immunol. 128:1819.
- 74.- Yagawa K., K. Onove and Y. Aida. 1979. Structural studies of Fc receptors. I. Binding properties, solubilization and partial characterization of Fc receptors of macrophages. J. Immunol. 122:366.
- 75.- Heusser H.C., C.L. Anderson and H.M. Grey. 1977. Receptors for IgG: subclass specificity of receptors on different mouse cell types and the definition of two distinct receptors on a macrophage cell line. J. Exp. Med. 145:1316.
- 76.- Basten A.J., J.F.A. Miller, J. Sprent and J. Pye. 1972. A receptor for antibody on B lymphocytes. I. Method of detection and functional significance. J. Exp. Med. 135:610.
- 77.- Segal D.M. and E. Hurwitz. 1977. Binding of affinity cross-linked oligomers of IgG to cell bearing Fc receptors. J. Immunol. 118:1338.
- 78.- Mannhalter W. J., H.M. Wolf, R. Ahmad and M.M. Eibl. 1986. The effect of Fc receptors modulation on human monocyte function. Molecular Immunology. 23:1225.
- 79.- Mannhalter W.J., R. Ahmad, M.H. Wolf, M.M. Eibl. 1987. Effect of polymeric IgG on human monocyte functions. Int. Archs. Allerg. Appl. Immunol. 82:159.
- 80.- Unkeless C.J. and N.H. Eisen. 1975. Binding of monomeric immunoglobulins to Fc receptors of mouse macrophages. J. Exp Med. 142:1520.
- 81.- Unkeless J.C. 1977. The presence of two Fc receptors on mouse macrophage: evidence from a variant cell line and differential trypsin sensitivity. J. Exp Med. 145:931.

- 82.- Lane B.C., J. Kan-Mitclell, M.S. Mitchell and S.M. Cooper. 1980. Structural evidence for distinct IgG subclass-specific Fc receptors on mouse peritoneal macrophage. *J Exp Med.* 152:1147.
- 83.- Kulczycki A., Jr V. Krause. C.C. Killion and J.P. Atkinson. 1980. Purification of Fc receptors from rabbit alveolar macrophages that retain ligand-binding activity. *J Immunol.* 124:772.
- 84.- Diamond B. and D.M. Scharff. 1980. IgG1 and IgG2b share the Fc receptor on mouse macrophages. *J. Immunol.* 125:631.
- 85.- Schneider R.J., J.P. Atkinson, V. Krause and A. Kulczycki. 1981. Characterization of ligand binding activity of isolated murine Fc receptor. *J. Immunol.* 126:735.
- 86.- Mellman I. and J.C. Unkeless. 1980. Purification of a functional mouse Fc receptor through the use of a monoclonal antibody. *J. Exp Med.* 152:1048.
- 87.- Walker W.S. 1976. Separate Fc receptors for immunoglobulins IgG 2a and IgG 2b on an established cell line of mouse macrophage. *J. Immunol.* 116:911.
- 88.- Diamond B., L. Boccumini and K.B. Birshtein. 1985. Site of binding of IgG2b and IgG2a by mouse macrophage Fc receptors by using cyanogen bromide fragments. *J. Immunol.* 134:1080.
- 89.- Looney J.R., H.D. Ryan, K. Takahashi, B.F. Fleit, J.H. Cohen, N.G. Abraham and L.C. Anderson. 1986. Identification of second class of IgG Fc receptor on human neutrophils. *J. Exp. Med.* 163:826.
- 90.- Dougherty J.G., Y. Selvendran, S. Murdoch, G.D. Palmer and N. Hogg. 1987. The human mononuclear phagocyte high-affinity Fc receptor, FcRI, defined by a monoclonal antibody 10.1. *Eur. J. Immunol.* 17:1453.
- 91.- Thrasher S., P. Bigazzi, S. Cohen and T. Yhosida. 1975. Distribution of cytophilic and anti-macrophage antibody on the macrophage surface. *Immunol Commun.* 4:219.
- 92.- Kuhn R. and G. Cassida. 1978. An indirect quantifiable assay for cytophilic antibody. *J Immunol Methods.* 19:387.
- 93.- Mc Keever P., A. Garvin and S. Spicer. 1976. Immune complex receptors in cell surface. Ultrastructural demonstration of macrophage. *J. Histochem. Cytochem.* 24:948.
- 94.- Munthe-Kass A.S. 1976. Phagocytosis in rat kuffer cells in vitro. *Exp Cell Res.* 99:319.
- 95.- Quesenberry P. and L. Levitt. 1979. Hematopoietic stem cells. *New Eng. J. Med.* 301:755.

- 96.- Calcagno M., J.R. Pérez, M.G. Waldo, G. Cabrera and B. Weiss Steider. 1982. Evidence of the existence of a factor that induces Fc receptors on bone marrow cells. Blood. 59:757.
- 97.- Fragozoa A., M.A. Arciga, M. Calcagno and B. Weiss Steider. 1985. Determination of the inducer of Fc (FcRI) and C3 (C3RI) receptors myeloid cells in several media from human and mouse origin, and the identification of the macrophage as the cell that produces these factor. Exp Hematol. 13:1.
- 98.- Fragozo A. y M.A. Arciga. 1983 Identificación y caracterización de inductores a la formación de receptores para Fc y C 3 en órganos murinos y orina humana. Tesis de Licenciatura, U.N.A.M. E.N.E.P. Zaragoza. México, D.F.
- 99.- Valdés V.F. 1985. Variación de los factores inductores a la formación de receptores Fc (FcRI) y C3 (C3RI) existentes en suero de pacientes leucémicos y la caracterización del factor C 3 RI en medio condicionado de pulmón humano. Tesis de Licenciatura U.N.A.M. E.N.E.P. Zaragoza. México D.F.
- 100.-Tesis en revisión.
- 101.-Wang S., M.H. Castro and M.A. Moore. 1985. Long-term culture of human bone marrow macrophages: macrophage development is associated with the production of a granulomonopoietic enhancing activity (GM-EA). J.Immunol. 135:1186.