

03062
2ej. y

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES
Y DE POSTGRADO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PENETRACION DE ANTICUERPOS
A CELULAS DEL SISTEMA INMUNE**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA**

PRESENTA

JOSE ARTURO FARFAN ALE

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D.F.

1987



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.

PENETRACION DE ANTICUERPOS A CELULAS DEL SISTEMA INMUNE.

I N D I C E

RESUMEN

INTRODUCCION

Tipos de Endocitosis

La Ruta Plasmalema-lisosoma

La Ruta Transcelular

Penetración de Inmunoglobulinas a células vivas

Penetración de macromoléculas hasta el núcleo

Penetración de anti-RNP a células del Sistema Inmune

OBJETIVO

MATERIAL Y METODOS

Cultivo de células Daudi

Purificación de células mononucleares por gradiente de Ficoll-Hypaque

Eliminación de macrófagos por adherencia al vidrio

Purificación de células T por columnas nylon-lana

Enriquecimiento de la población de células T_H

Cuantificación de células T_H por formación de rosetas EA

Marcado de proteínas por el método de la Cloramina T

Marcado de proteínas por el método de Bolton y Hunter

Marcado de proteínas con Isotiocianato de Fluoresceína

Marcado de proteínas con Isotiocianato de Fluoresceína por el método rápido

Marcado de proteínas con Isotiocianato de Fluoresceína y celita por el método rápido

Unión de proteínas marcadas con ¹²⁵I a Sepharosa-proteína A

Purificación de IgG por Cromatografía de Intercambio iónico

Purificación de IgG mediante Filtración en Gel

Electroforesis en gel de poli-acrilamida-SDS

Incubación de células con inmunoglobulinas marcadas con ¹²⁵I

Incubación de células con IgG anti-RNP marcada con ¹²⁵I

Incubación de células con Inmunoglobulinas marcadas con Isotiocianato de fluoresceína

Estimulación de células con Concanavalina A

Búsqueda de anticuerpos en el núcleo de las células de pacientes con Enfermedad mixta del tejido conectivo

Búsqueda de anticuerpos en el núcleo de las células incubadas con suero con actividad anti-RNP
Cuantificación de anticuerpos anti-RNP

RESULTADOS

Asociación de IgG- ¹²⁵I a células
Marcado de proteínas con ¹²⁵I, por diferentes métodos
Uso de anticuerpos anti-RNP
Búsqueda de anticuerpos en el interior de las células mediante autorradiografía
Asociación de proteínas marcadas con isotiocianato de fluoresceína a células
Uso de células estimuladas con Concanavalina A y búsqueda de pinocitosis de adsorción facilitada
Efecto de las variaciones en la relación F/P de las proteínas sobre su asociación a las células

DISCUSION

REFERENCIAS

RESUMEN

La endocitosis es el mecanismo por el cual la célula puede captar e internalizar material extracelular. Existen dos tipos de endocitosis, llamadas pinocitosis y fagocitosis. La pinocitosis a su vez, tiene tres variedades, las cuales son: 1.-Pinocitosis fluida, en la cual no existe selectividad alguna para el material endocitado 2.-Pinocitosis de adsorción, en la cual si existe selectividad y 3.-Pinocitosis por acarreamiento, en la cual una molécula para la cual no existen receptores en la superficie celular, es acarreada al interior de la célula mediante la unión a otra molécula, para la cual si existen receptores en la membrana celular.

Se han descrito diversas rutas que pueden seguir las moléculas una vez que penetren a la célula, las principales son: la ruta plasmalema lisosoma y la ruta transcelular. Algunas moléculas, al ser internalizadas pueden llegar hasta el núcleo de la célula.

Se ha reportado que los anticuerpos contra la Ribonucleoproteína (anti-RNP), los cuales aparecen en los pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo, pueden penetrar a los linfocitos, llegar hasta el núcleo y alterar el adecuado funcionamiento de dichas células.

El objetivo de el presente trabajo, es el de diseñar un sistema que permita conocer el mecanismo por el cual los anticuerpos anti-RNP se internalizan a la célula y la ruta que los mismos siguen hasta su llegada al núcleo.

Se llevaron a cabo experimentos en los cuales se buscó en forma directa e indirecta la penetración de las inmunoglobulinas a los linfocitos. No se pudo demostrar que los anticuerpos penetren en forma selectiva a dichas células.

Se comentan diferentes posibilidades que podrían explicar los resultados obtenidos.

INTRODUCCION

Tipos de Endocitosis.

La endocitosis es el mecanismo por el cual la célula puede captar e internalizar material extracelular. La internalización de macromoléculas se realiza a través de vesículas endocíticas, las cuales se forman a partir de elementos de la membrana plasmática.(1).

Dependiendo del tamaño del material que va a ser internalizado, la endocitosis se divide en: fagocitosis y pinocitosis. El término fagocitosis se usa para describir la entrada a la célula, de grandes partículas generalmente visibles por microscopía de luz. Esta entrada ocurre por envolvimiento de la partícula por la membrana plasmática, con casi total exclusión del líquido del medio en el que se encuentra la partícula. La fagocitosis generalmente es llevada a cabo por células especializadas como son los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares.

El término pinocitosis se usa para describir la entrada a la célula, de pequeñas partículas o macromoléculas como lipo-proteínas, ferritina, complejos inmunes, enzimas, hormonas, anticuerpos, toxinas, etc. (1,2).

La pinocitosis dependiendo de su especificidad puede ser: fluida, de adsorción o mediada por receptores y por acarreamiento.

La pinocitosis fluida tiene las siguientes características generales:

1) La velocidad de entrada de las moléculas es directamente proporcional a la concentración de las mismas en el medio.

2) La cinética de entrada no es saturable.

3) No se detecta una fase de unión de las moléculas que se encuentran en el exterior de la célula, a la superficie celular.

4) No existe especificidad para las moléculas que son pinocitadas.

5) Es proporcional a la temperatura.

La pinocitosis de adsorción se caracteriza por:

1) La cinética de entrada es saturable.

2) Una velocidad de entrada que depende de la concentración de las moléculas que serán endocitadas (ligandos), las moléculas a las cuales éstas se unirán (receptores) y la afinidad existente entre ellos.

3) Requiere de una fase de unión de las moléculas que serán endocitadas, a la membrana celular.

4) Es altamente específica.

5) Puede situar cantidades de moléculas en el interior de las células cuya concentración es mayor que la existente en el exterior.

6) Es dependiente de energía.

La pinocitosis por acarreamiento tiene características similares a las de la pinocitosis de adsorción, pero en este caso, la molécula de interés y para la cual no hay receptores en la superficie de la célula, es acarreada al interior de la misma por un ligando que tiene capacidad de unirse a los receptores celulares y a la molécula (3,4).

Estos sistemas se encuentran esquematizados en la figura 1.

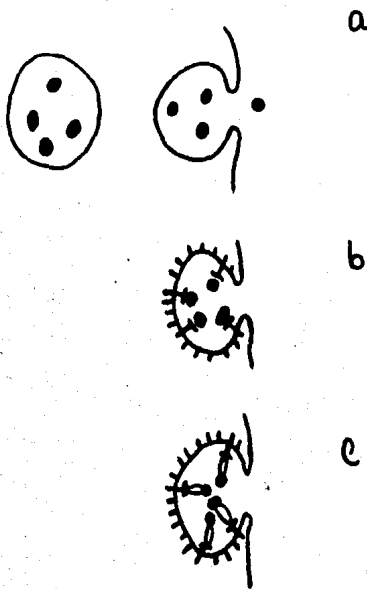


Fig. 1. Tipos de pinocitosis.

- a) Pinocitosis fluida. b) Pinocitosis de adsorción o mediada por receptores. c) Pinocitosis de adsorción facilitada.
● Ligando. ▽ Receptor. ◊ Acarreador. ≡ Clatrina.

Rutas de entrada de las macromoléculas a las células.

En años recientes se han estudiado con interés, los sistemas de transporte de macromoléculas al interior de las células.

Las células nucleadas incorporan a su interior moléculas seleccionadas del medio en el cual se encuentran, mediante endocitosis mediada por receptores.

A través de la endocitosis mediada por receptores, la célula incorpora nutrientes (unidos a proteínas transportadoras) como colesterol, hierro, vitamina B12. También por este mecanismo incorpora ciertas proteínas plasmáticas como la α -2-macroglobulina, hormonas como la insulina, gonadotropina coriónica y factor de crecimiento epidérmico. Por este mecanismo se incorporan substancias o partículas dañinas para la célula, tal es el caso de la toxina diftérica y partículas virales (5,6).

Hasta hace algunos años, el término endocitosis era usado como sinónimo de incorporación de material externo o extracelular a lisosomas, en virtud de que ésta era la única ruta intracelular bien caracterizada. También se consideraba que la vesícula pinocítica y su contenido, una vez fusionados con los lisosomas, eran degradados (1).

En la actualidad, se conocen varias vías de transporte intracelular, siendo las principales: la vía plasmalema-lisosoma y la vía trans-celular (7).

La vía plasmalema-lisosoma. (Fig. 2)

En la superficie externa de la membrana celular, existen receptores específicos para determinados ligandos. Los receptores pueden tener movimiento lateral espontáneo sobre la membrana, que los dirige a regiones especializadas llamadas fosas cubiertas. Estos receptores presentan el movimiento antes descrito independientemente de que lleven unido el ligando específico, éste es el caso de los receptores de la lipoproteína de baja densidad (LBD) (8,9) y los de la asialo-glicoproteína (ASGP) (10). Otros receptores se pueden encontrar diseminados en la superficie de la membrana e inician un desplazamiento lateral dirigido a las fosas cubiertas al momento que se les une el ligando. Este tipo de desplazamiento se presenta en el caso de los receptores del factor de crecimiento epidérmico, de la insulina y de ciertos virus (11).

Las fosas cubiertas están formadas por depresiones de la membrana celular recubiertas en su superficie citoplásmica por una proteína denominada clatrina (12,13), dichas fosas fueron observadas por primera vez en 1964 por Roth y Porter en la membrana plasmática del ovocito del mosquito (14), posteriormente se describieron en muchos otros tipos celulares.

Una vez que los complejos ligando-receptor se han situado en las fosas cubiertas, éstas sufren invaginación, extrangulándose en su porción más externa dando lugar a las vesículas cubiertas, las cuales pierden rápidamente sus cubiertas proteicas y se fusionan con el receptosoma. Este es un organelo pre-lisosomal inicialmente descrito por Pastan y Willingham (15,16), el cual varía de forma y tamaño pudiendo ser esférico o cilíndrico y medir entre 2,500 y 4,000 Å, tiene menor contenido proteico que los lisosomas de bajo pH en su interior (alrededor de 5). Esta última característica favorece la disociación de los complejos ligando-receptor una vez que éstos han alcanzado el interior del receptosoma. De este organelo, los receptores pueden seguir o no el mismo camino que los ligandos. Pueden regresar a la membrana celular para iniciar nuevamente el camino de entrada, esto es, pueden reciclar o continuar su camino hacia los lisosomas.

Algunos ejemplos de sistemas endocíticos en los cuales ocurre reciclaje de receptores son: LBD en fibroblastos humanos (17,18), β -glucoronidasa, α -iduronidasa y transcobalamina II en las mismas células (19,20,21), ASGP en hepatocitos de rata o humano (22,10), complejos de α -macroglobulina-proteasa en macrófagos alveolares de conejo (23), transferrina en células de teratocarcinoma de ratón (24), en estos casos se ha demostrado que la célula puede internalizar el total de sus receptores varias veces en tiempos cortos, aún en presencia de bloqueadores de la síntesis de proteínas. Algunos sistemas en los cuales los receptores no son reciclados son: inmunoglobulinas en macrófagos de ratón (25), aunque en este caso, los receptores no ocupados, escapan a la degradación en lisosomas y reciclan (26), insulina en linfocitos humanos (27,28). La ausencia de reciclaje de receptores ha sido considerada como una estrategia celular para evitar la acumulación interna excesiva, de los ligandos, ésto es, un sistema de retroalimentación negativa.

También Pastan y Willingham han propuesto que con algunas moléculas, el material endocitado, pasa del receptosoma al complejo de Golgi-retículo endoplásmico-lisosoma (GREL), y de allí a los lisosomas u otra región celular (16).

Goldstein, Anderson y Brown, han descrito un modelo de internalización de macromoléculas en el que los ligandos no transitan por el complejo GREL (29).

La vía transcelular.

Esta ruta ha sido explorada por Abrahamson y Rodewald, en células del duodeno de ratas recién nacidas (30,31), quienes, en este modelo particular, han encontrado que la IgG presente en la leche materna de estos animales, se une específicamente a la superficie luminal de las células epiteliales del intestino. La unión es altamente selectiva, requiere de la presencia del fragmento Fc de la IgG y de un pH ácido (6 - 6.6). Durante el proceso, pueden entrar a las células, otras moléculas que no se unen a los receptores de la membrana citoplásmica, como es el caso de la peroxidasa (32).

Las fosas endocíticas con todo su contenido, se estrangulan en la región más externa, dando lugar a la vesículas endocíticas (33). (fig. 3)

En la región apical de las células, las vesículas endocíticas, contienen en su interior tanto el material que adsorbieron específicamente, como el que quedó atrapado en forma inespecífica en la misma región apical, las vesículas se fusionan con vacuolas y en su interior descargan el material que no se encontraba adsorbido, éste es llevado posteriormente a los lisosomas, pero el que se encuentra adsorbido, permanece en la vesícula endocítica y continúa su viaje hacia las regiones más internas de la célula, hasta alcanzar la región lateral de la misma en la cual el pH es neutro o ligeramente alcalino, y aquí es donde descarga su contenido.

En el sistema de transporte transcelular, destacan 2 hechos: el primero es la existencia de un sitio intracelular de selección del material internalizado, que parece estar ubicado en las vacuolas de la región apical, ya que a partir de este sitio, los caminos del material adsorbido específicamente a los receptores y del atrapado inespecíficamente, divergen. El segundo, es la ausencia del paso del material adsorbido a los receptores, por los lisosomas, evitando de esta manera su degradación.

Otros casos de transporte transcelular de inmunoglobulinas tienen lugar en la glándula mamaria (34), saco vitelino (35), placenta (36) y membranas mucosas (37).

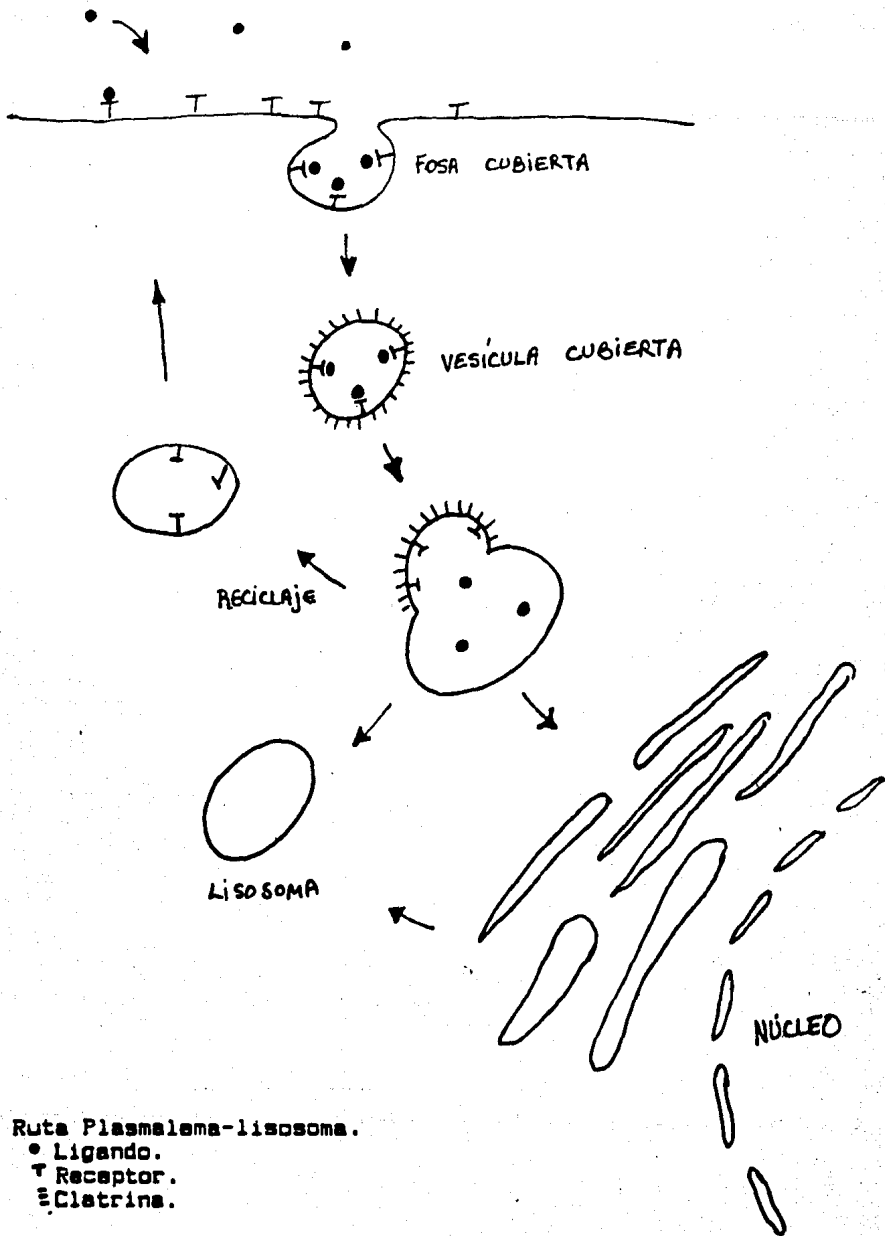


Fig. 2. Ruta Plasmalema-lisosoma.

- Ligando.
- T Receptor.
- ≡ Clatrina.

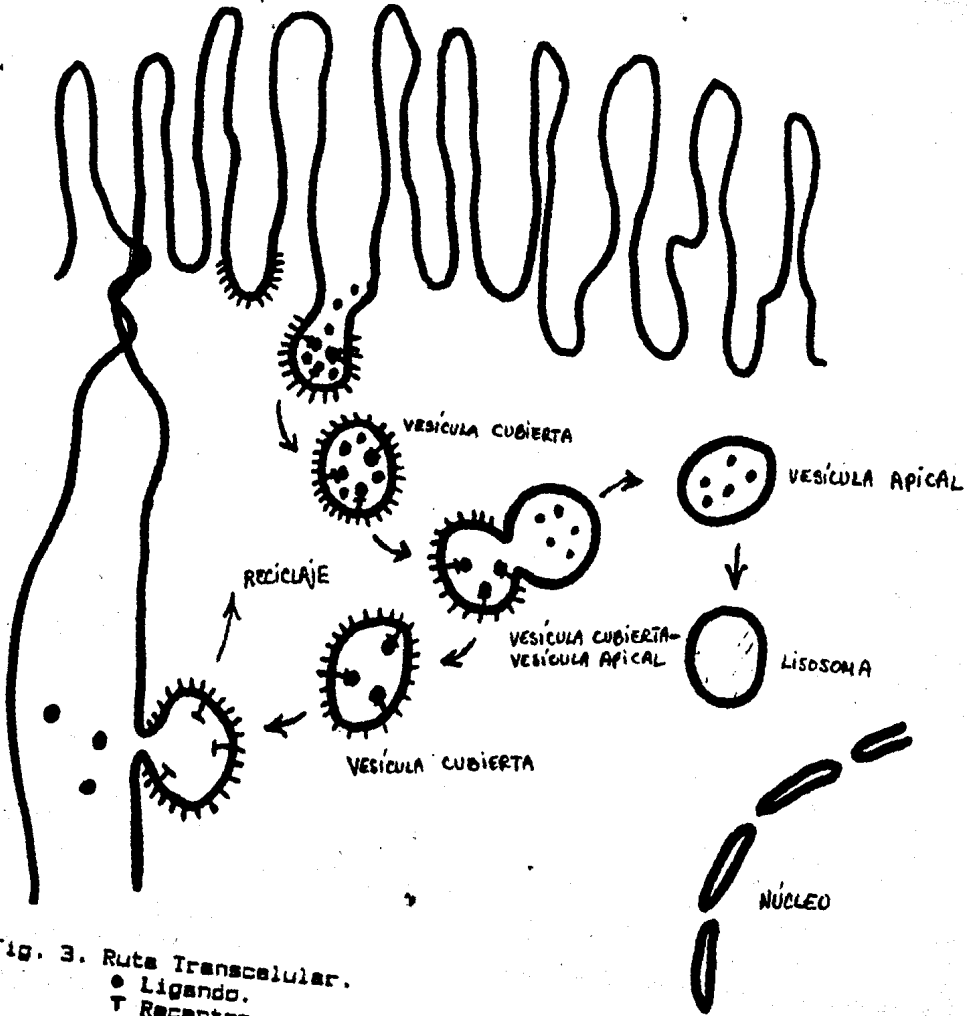


Fig. 3. Ruta Transcelular.
 ● Ligando.
 T Receptor.
 s Clatrina.
 * Moléculas no unidas a receptores.

Penetración de inmunoglobulinas a células vivas.

Existen varios reportes referentes a la penetración de anticuerpos dirigidos contra antígenos celulares a diferentes tipos de células. En 1964, Rosenkranz y cols., reportaron que anticuerpos de conejo fluoresceinados eran capaces de penetrar al huevo fertilizado del erizo de mar y detener su desarrollo (38).

En 1968, Ng y Gregory describieron la penetración de anticuerpos anti-lactato deshidrogenasa a células tumorales de ratón (carcinoma de Ehrlich y Bw5147) o de conejo (Ux2) con diferentes velocidades para cada tipo celular. La mayoría de las células no tumorales mantenidas en cultivo, no incorporaban el anticuerpo, pero los linfocitos de conejo sí lo hicieron, aunque en pequeñas cantidades (39). En 1973, De Petris y Raff describieron la penetración de anti-inmunoglobulinas de ratón (preparadas en conejo) a los linfocitos B de ratón, mediante un rearrreglo de las moléculas de membrana ligadas por el anticuerpo, fenómeno descrito como formación de "casquete" (capping). Cabe hacer notar que los fragmentos monovalentes del mismo anticuerpo, también penetraban a la célula, pero a menor velocidad (40). En 1975, Varesio y cols. reportaron que los anticuerpos anti-ácido ribonucleico, se introducen en fibroblastos de ratón, infectados o no con el virus 40 del simio. El destino de los anticuerpos en las células no infectadas, era la degradación en los lisosomas, mientras que en las infectadas, sólo hay degradación parcial o no la hay (41).

Schnaider y cols. en 1979, usando fibroblastos de embrión de rata, encontraron que las inmunoglobulinas sin actividad de anticuerpo y marcadas con fluorocromos o con tritio, penetran a la célula con velocidad dependiente del marcador, incorporándose más rápido las marcadas con fluorocromos. La susceptibilidad a la degradación en lisosomas de estas inmunoglobulinas también fué diferente, siendo más susceptibles las marcadas con tritio (42).

Considerando que la penetración de las inmunoglobulinas se efectúa únicamente en algunos tipos celulares podemos considerar que el fenómeno depende al menos en parte del tipo celular.

De lo antes expuesto, queda en evidencia que no todas las inmunoglobulinas pueden penetrar a las células, aunque esto puede inducirse o facilitarse con el uso de moléculas marcadoras que una vez pegadas a las mismas, les inducen modificaciones en su carga eléctrica, lo cual también influirá en el destino final de las mismas.

En 1982, Okudaira y cols. (43), publicaron un trabajo sobre internalización de inmunoglobulinas a células vivas. En este trabajo, se examinó la interacción de los anticuerpos anti-linfocito obtenidos de suero de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES), con los linfocitos T de individuos sanos. Se encontró que al incubar las células con el suero de los pacientes con LES, ocurría una penetración de las inmunoglobulinas al interior de dichas células, ésto se determinó cuantificando las inmunoglobulinas presentes en las células, después de eliminar las que se encontraban adsorbidas a su superficie externa. Se encontró un incremento paralelo de la actividad linfocitotóxica de los sueros y la cantidad de inmunoglobulina internalizada a la célula. También se encontró mediante inmunofluorescencia indirecta, que en las células permeabilizadas, después de la incubación con los sueros con actividad linfocitotóxica, que las inmunoglobulinas se encontraban en la región interna de la membrana celular o en el citoplasma.

Por otro lado, las inmunoglobulinas tratadas con pepsina (para que se rompieran en fragmentos F(ab)2 y Fc), perdieron su capacidad de penetrar a los linfocitos; el bloqueo de los receptores Fc de las mismas células con inmunoglobulina agregada o por anticuerpos anti α 2-microglobulina, no interfirió con la entrada de los anticuerpos.

En estos experimentos se usaron como controles, sueros de pacientes con Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo (EMTC), en los que se detectaron títulos altos de anticuerpo anti-ribonucleoproteína (anti-RNP) y sueros de individuos sanos. No se encontró internalización de las inmunoglobulinas al usar estos sueros.

Considerando que los sueros de los pacientes con LES, tenían anticuerpos con actividad anti-linfocito, se podría suponer que dichos anticuerpos penetraron mediante la inducción de rearrreglos espaciales de las proteínas de membrana a las cuales se unieron, ésto es, por formación de "casquete", en forma similar a la descrita por De Petris y Raff (40). Sin embargo, llamó la atención que en este caso, la presencia del fragmento Fc en la molécula del anticuerpo sí fué indispensable para que la internalización se llevara a cabo.

Por otra parte, se encontró que la unión del fragmento Fc con su receptor, no se requiere para que la penetración se lleve a cabo, ya que el bloqueo previo de los receptores, no disminuyó la internalización del anticuerpo. Sin embargo, la presencia del fragmento Fc en la molécula de inmunoglobulina sí resulta indispensable, ya que los fragmentos F(ab)2, no son capaces de penetrar a la célula.

El papel que el fragmento Fc juega en este caso de penetración de las inmunoglobulinas, queda aún por definirse.

En las células incubadas con los sueros de individuos sanos, no ocurrió internalización de las inmunoglobulinas como tampoco con los sueros de pacientes con EMIC, en los cuales había altos títulos de anticuerpos anti-RNP. Aunque con una metodología diferente, estos datos no confirmaron los datos encontrados por Alarcón y cols. (53), los cuales serán descritos posteriormente.

Penetración de macromoléculas hasta el núcleo.

En la actualidad se conoce de la existencia de receptores nucleares para diversas moléculas, como la tri-iodo-tironina, insulina y factor de crecimiento del nervio (44,45,46). En el caso de la insulina en los linfocitos humanos y del factor de crecimiento de nervios en neuronas de la médula espinal de embriones de ratón, los receptores de la membrana celular y los de la membrana nuclear, parecen ser diferentes, ya que se unen a sus respectivos ligandos con diferentes constantes de afinidad (47,48,49).

Penetración de anti-RNP a las células del sistema inmune.

Existen varios reportes referentes a la presencia de anticuerpos en el núcleo de las células vivas, en 1974 De la Faille informó de la presencia de inmunoglobulinas en el núcleo de las células de la dermis y epidermis de la piel aparentemente sana y proveniente de 9 de 10 pacientes con lupus eritematoso inducido por drogas, así como en 9 de 153 con lupus eritematoso sistémico (50).

Posteriormente otros investigadores reportaron hallazgos similares, pero además observaron, que con frecuencia la imagen fluorescente encontrada en el núcleo era de tipo moteado, el cual es característico de la presencia de anti-RNP y que esto se presentaba en los pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo (51).

También se reportó que la aparición de las imágenes anteriormente descritas podían ser inducidas in vitro, mediante la incubación de fragmentos de piel sana, en suero en el cual existieran anticuerpos anti-RNP (52).

En el año de 1976, Alarcón-Segovia y cols., reportaron que los anticuerpos anti-RNP parcialmente purificados y marcados con fluoresceína eran capaces de penetrar al interior de varios tipos celulares del sistema inmune de individuos sanos (53). Dichos anticuerpos se obtuvieron a partir del suero de una paciente con EMTIC en el cual, por pruebas de hemaglutinación, se detectó un título de anti-RNP de $1:1.6 \times 10^{-7}$. La población de inmunoglobulinas G fué enriquecida mediante cromatografía de filtración en gel.

Incubando células mononucleares con concentraciones altas de anticuerpo fluoresceinado (4.2 mg/100 μ l), durante 60 minutos, se encontró la marca fluorescente en el núcleo de un 19% de las mismas, y preferentemente en aquellas que tenían receptores para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G (IgG). También se demostró que la penetración podía bloquearse pre-incubando las células con inmunoglobulina agregada o con fragmentos Fc.

Posteriormente los mismos autores reportaron que incubando las células mononucleares de pacientes con EMTIC con anti-inmunoglobulina humana fluorescente en cabra, era posible demostrar fluorescencia en el núcleo de 5.4% de las células, indicando que los anticuerpos contra antígenos nucleares, habían penetrado a las células in vivo, y también que la internalización de las inmunoglobulinas no era especie-específica, esto es, que podía tener lugar en sistemas heterólogos (54).

También demostraron que las células mononucleares pre-incubadas con anti-RNP, presentaban una disminución de la población de células que forman rosetas con eritrocitos recubiertos de anticuerpo (rosetas EA). Por otro lado, se encontró que el anticuerpo penetraba preferentemente en las células T con receptores para IgG (Tr), las cuales fueron inducidas por incubación con fitohemaglutinina (PHA).

Incluso han sido estudiadas las alteraciones de la fisiología celular que tienen lugar como resultado de la interacción del anticuerpo anti-RNP con las células. Se encontró que dicho anticuerpo es tóxico para las células T, la cual se hace evidente en incubaciones prolongadas (4-20 horas) (55).

En virtud de que la población de células Tr es la que tiene actividad supresora sobre las células B y considerando la capacidad citotóxica del anticuerpo, se propuso que la penetración de anticuerpos a células vivas como un mecanismo de daño inmunológico (55).

Posteriormente, el mismo grupo de investigadores, demostró que al incubar células poseedoras de receptores para el fragmento Fc de la IgG con anti-RNP, se obtenía como resultado la interferencia en la progresión del ciclo celular de las mismas células, y que esto mismo ocurría

tanto en las células activadas espontáneamente, como en las estimuladas con mitógenos. También demostraron que lo antes expuesto no ocurría cuando las células T con afinidad alta para los eritrocitos de carnero (carentes de T_r), se incubaron con anti-RNP, ni cuando se usaron células T_r y fragmentos F(AB) de anti-RNP. Esto último se interpretó como una evidencia indirecta de que la interferencia en el ciclo celular, resultó de la penetración de los anticuerpos con actividad anti-RNP mediante el receptor del fragmento Fc de las IgG (56).

En este trabajo, llamó la atención que los anticuerpos anti-RNP no causaron un efecto similar en las células T_r y en las células B, puesto que en un trabajo previo (53) se demostró que las células B también son susceptibles de la penetración de dichos anticuerpos.

Posteriormente, los mismos autores demostraron que en condiciones similares a las anteriores, pero usando anticuerpos anti-ácido desoxiribonucleico (anti-ADN) y células T_r, ocurría un bloqueo de la síntesis de ADN pero no de ARN (57). También reportaron que los anticuerpos anti-RNP bloquean el fenómeno de citotoxicidad dependiente de anticuerpos, lo cual permitió proponer que ambos fenómenos requieren el mismo receptor (58).

Un punto de gran interés, es la aparente capacidad discriminatoria que posee el sistema de penetración de inmunoglobulinas a células vivas, la cual le permite distinguir entre las inmunoglobulinas que tienen especificidad para antígenos intracelulares, ya sean éstos propios de la célula (como es el caso de los antígenos nucleares) o adquiridos (como es el caso de las inmunoglobulinas de origen animal, previamente incorporadas al núcleo) (54), de las de especificidad diferente, de tal forma que permite la entrada de las primeras únicamente, no influyendo para esto si su origen es humano o no.

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo, es el de diseñar un sistema que permita conocer con precisión el mecanismo por el cual los anticuerpos anti-RNP se internalizan a la célula, y la ruta que los mismos siguen hasta su llegada al núcleo.

MATERIAL Y METODOS

Cultivo de células Daudi.

La línea celular llamada Daudi está constituida por células humanas de estirpe linfoide tipo B, obtenida a partir de un linfoma de Burkitt (S9). Estas células se mantuvieron en medio RPMI con 10% de suero fetal de ternera (SFT), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomocina, en ambiente con 5 % de CO₂.

Purificación de células mononucleares por gradiente de Ficoll-Hypaque.

Se usó el método descrito por Boyum (60). Se obtuvo sangre por punción venosa con jeringas previamente heparinizada (10 UI/ml), ésta se mezcló con amortiguador de fosfatos salino (PBS, 0.15 M, pH 7.2), vol:vol. En tubos de fondo curvo se puso una mezcla de Ficoll (Farmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)-Hypaque (Wintrobe de México) con densidad de 1.075, sobre ésta se dejó caer suavemente la sangre diluida (un vol. de F-H por 3 vol. de sangre). Se centrifugó a 2,200 rpm por 20 min. y las células que se situaron en la interfase, fueron recuperadas por aspiración, lavadas por 3 ocasiones con PBS y resuspendidas en RPMI en el volumen necesario para lograr la concentración deseada.

Eliminación de macrófagos por adherencia al vidrio.

Las células mononucleares purificadas, fueron resuspendidas en un volumen de Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) suplementado con 10-20% de suero fetal de ternera a una concentración de $5 \cdot 10^4$ a 10^6 células por ml. Se colocaron en una caja de petri de vidrio y se pusieron en una incubadora a 37°C por 45 min., posteriormente se recogió el sobrenadante y se lavó suavemente la caja con medio de cultivo. Se reunieron los sobrenadantes conteniendo las células no adherentes, éstas se lavaron y se resuspendieron en un volumen de medio de cultivo necesario para lograr la concentración deseada. Después de este procedimiento, del 96 al 98% de las células estuvo constituido por linfocitos.

Purificación de células T por columnas de nylon-lana

Se puso en una jeringa 500 mg de nylon-lana (Fenwal Laboratories, Illinois, U.S.A.), a través de ella se pasó 10 ml de medio de cultivo con 5% de SFT y se dejó incubando a 37°C por 30 min., posteriormente se pasaron 10 ml del mismo medio, el cual previamente había sido calentado a 37°C. Las células mononucleares se resuspendieron en una concentración de $5-10 \times 10^{-7}$ / ml. Se añadió a la columna 1 o 2 ml de dicha suspensión y se incubó a 37°C por 45 min., después se pasó por la columna 20 ml de medio de cultivo el cual estaba a la misma temperatura. Las células no adherentes se recuperaron del líquido que salió de la columna.

Enriquecimiento de la población de células T_r

Se ajustaron las células T a una concentración de 4×10^{-6} células/ml de medio de cultivo conteniendo 20% de SFT, éstas se mezclaron vol. a vol. con eritrocitos de buey al 2%, los cuales previamente fueron tratados con dosis sub-aglutinantes de IgM anti-eritrocitos de buey (Cappel Laboratories, Cochranville, PA). Se centrifugó a 1,000 rpm por 5 min. a 4°C y se dejó incubando en hielo por 1 hora, posteriormente las células se resuspendieron suavemente y se colocaron sobre una mezcla de F-H similar a la usada para purificar células mononucleares, pero a 4°C. Se centrifugó a 2,200 rpm por 15 min. a 4°C. Las células que quedaron en la interfase se recuperaron por aspiración, un 25% de éstas tuvieron receptores para el fragmento Fc de la IgG.

Cuantificación de células T_r, por formación de rosetas EA (61).

Se ajustaron las células a una concentración de 4×10^{-6} células/ml con medio de cultivo conteniendo 20% de SFT. 0.1 ml de estas células se mezclaron con 0.1 ml de eritrocitos de buey al 2%, que previamente fueron tratadas con dosis sub-aglutinantes de IgG anti-eritrocitos de buey (Cappel Laboratories, Cochranville, PA). Se centrifugó a 1,000 rpm por 5 min. a 4°C y se dejó incubando en hielo por 1 hora, posteriormente se resuspendieron las células suavemente y se cuantificó el porcentaje de las que formaron rosetas (rosetas EA). Se consideró que una célula formaba una roseta si tenía unidos 3 o más eritrocitos.

Marcado de proteínas por el método de la Cloramina T (62)

Las inmunoglobulinas se dializaron contra amortiguador de fosfatos 0.05 M, pH 7.5. En este mismo amortiguador se disolvieron todos los reactivos, excepto el Na ¹²⁵I (New England Nuclear, Boston, MA). A 0.1 ml de amortiguador de fosfatos conteniendo un máximo de 2 mg de proteína, se añadió 1 mCi de Na ¹²⁵I en PBS. Posteriormente se añadieron en forma secuenciada 0.1 ml de las siguientes soluciones: Cloramina T 3.5 mM, metabisulfito de sodio 12.6 mM, NaI 13.3 mM, agitando después de la adición de cada una de ellas. Para separar la proteína marcada del ¹²⁵I libre, la mezcla se pasó por una columna de Sephadex G-25 (1.5 x 20 cm, equilibrada con PBS por la que previamente se había pasado 5 mg de albúmina sérica bovina (ASB). Se colectaron fracciones de 0.5 ml con una velocidad de flujo de 30 gotas por min. Se contaron con un contador gamma alícuotas de estas fracciones y se midió la D.O. 280 nm de las mismas. Se tomó la parte de la elución en la cual coincidieron el mayor número de cuentas radiactivas y de D.O.

Para conocer el porcentaje de incorporación de la marca radiactiva a las proteínas, se tomó 0.05 ml de material seleccionado y se añadió a 0.5 ml de ácido acético al 5% frío, a ésto se añadió 0.025 ml de albúmina sérica bovina (ASB) a una concentración de 20 mg/ml y se dejó reposar por 3 min. en frío. Posteriormente se centrifugó a 3,000 rpm por 5 min. y se cuantificó por separado la radiactividad del sobrenadante y del sedimento. Se calculó el porcentaje de iodinación por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de iodinación} = \frac{\text{cpm en el sedimento}}{\text{cpm en el sobrenadante}} \times 100$$

Marcado de proteínas por el método de Bolton y Hunter (63)

Se depositó 0.025 ml de amortiguador de boratos 0.1 M, pH 8.5 con un máximo de 1 mg de proteína, en un recipiente de cristal que contenía 1 mCi de ¹²⁵I en el reactivo de Bolton y Hunter (Amersham Arlington, Ill.) y del cual previamente se eliminó el solvente por evaporación con nitrógeno. La mezcla se incubó a 4°C por 15 min. agitando periódicamente, se añadió 0.5 ml de amortiguador de

boratos, 0.1 M, con glicina 0.2 M, pH 8.5, se incubó a 4°C por 5 min. Se separó la proteína marcada del ¹²⁵I libre en igual forma a lo descrito en el método anterior.

Marcado de proteínas con Isotiocianato de Fluoresceína (ITFC) (64).

A 10 ml de amortiguador de carbonatos salino (carbonatos 0.5 M; NaCl 0.5 M), pH 9, conteniendo 10 mg de inmunoglobulina, se le añadió 1 mg de ITFC (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) y se dejó en agitación por 18 horas a 4°C. Posteriormente se separó la proteína marcada del fluorocromo libre, pasando la mezcla por una columna de Sephadex G-25 (2.5 x 40 cm) equilibrada con PBS. Se colectaron fracciones de 0.5 ml a razón de 30 gotas/min., se leyó la D.O. de cada fracción a 280 y 495 nm. Se recuperó la parte de la elución donde coincidió el aumento de la D.O. en las dos longitudes de onda antes mencionadas. Se calculó la relación Fluoresceína/proteína (Rel. F/P) y la concentración de proteína con base a las siguientes fórmulas:

$$F/P = \frac{2.87 \text{ (D.O. 280 nm)}}{\text{D.O. 280 nm} - 0.35 \text{ (D.O. 495 nm)}}$$
$$P = \frac{\text{D.O. 280 nm} - 0.35 \text{ (D.O. 495 nm)}}{1.4}$$

Marcado de proteínas con Isotiocianato de Fluoresceína y celita por el método rápido (65).

A 2 ml de amortiguador de carbonatos 0.05 M, pH 8.5, conteniendo 10 mg de proteína, se añadió 5 mg de celita conteniendo un 10% de ITFC (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), se agitó por 3 min. a 4°C. La mezcla se centrifugó a 3,000 rpm por 3 min. y se separó la proteína marcada del fluorocromo libre por filtración en gel de una columna de Sephadex G-25 (1.2 x 20 cm), equilibrada con PBS. Se colectaron fracciones de 0.5 ml a razón de 20 gotas por minuto. El resto del procedimiento se llevó a cabo en forma similar a lo descrito en el método anterior.

Unión de proteínas marcadas con ¹²⁵I a Sepharosa proteína A.

Se usaron columnas de Sepharosa-proteína A (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo.), de 0.5 ml de volumen equilibradas con PBS. Se les añadieron los microgramos de proteínas necesarios para tener 300,000 cpm. Se incubaron por 30 min., posteriormente se pasaron por la columna en forma secuenciada, 10 ml de PBS y 10 ml de amortiguador de glicina-HCl 0.1 M, pH 3. Se colectaron fracciones de 1 ml a razón de 0.5 ml por minuto. En algunos casos se pasó también por la columna amortiguador de glicina-HCl 0.2 M, pH 3 y NaCl 1.5 M.

Purificación de IgG por Cromatografía de intercambio iónico (66)

Suero humano dializado contra amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 8, se pasó por una columna de DE 52 (Whatman, Maidstone Kent, U.K.) de 2.5 x 70 cm, equilibrada con el mismo amortiguador usado para la diálisis. Se usó 1 ml de resina por cada 15 mg de proteína. Se colectaron fracciones de 3 ml a razón de 1 ml por min., y se leyó la D.O. a 280 nm de cada una de las fracciones. Aquellas en las que se encontró alta D.O. se reunieron (ésta fué la IgG), posteriormente la columna se lavó con NaCl 1.5 M.

Purificación de IgG mediante filtración en gel (66)

En una columna de Sephadex G-200 (2.5 x 70 cm), equilibrada con amortiguador de Tris NaCl (Tris 0.1 M; NaCl 1 M), pH 7.2, se pasaron 5-10 ml de suero y se colectaron fracciones de 5 ml a razón de 0.3 ml por minuto. Se leyó la D.O. a 280 nm de cada una de las fracciones, se observaron tres ascensos de la misma. En los tubos correspondientes al segundo ascenso de la D.O. se encontró la fracción enriquecida de IgG.

Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

La pureza de las proteínas obtenidas por los métodos anteriores, fue analizada en geles de poliacrilamida al 12% (relaciones acrilamida:bis-acrilamida de 30:0.8 y 30:0.3), utilizando el sistema de amortiguadores discontinuos de Laemmli (67). Las muestras fueron resuspendidas en el amortiguador para muestras de Laemmli, en presencia de SDS y mercaptoetanol y hervidos inmediatamente antes de la electroforesis, durante la misma se mantuvo una corriente de 20 mA hasta que el colorante llegó al gel separador, y se continuó con 40 mA hasta que alcanzó el borde del gel. Posteriormente, los geles fueron teñidos con azul de coomassine (metanol al 30%, ácido acético al 10% y azul de coomassine al 0.06%) y fueron desteñidos con ácido acético al 10%.

Incubación de células con Inmunoglobulinas marcadas con ¹²⁵I

Se incubaron 1×10^{-6} células Daudi con cantidades variables de IgG humana normal, marcada con ¹²⁵I (50-500 μ g) en 0.5 ml de RPMI con 1% de ASB, en presencia o ausencia de 10 mg de IgG humana no marcada, a 4 y 37°C, por 1 hora. Posteriormente las células se lavaron en dos ocasiones con el mismo medio, fueron transferidas a otro tubo para otro lavado, y se cuantificó la radioactividad presente en las mismas con un contador para radiaciones.

Incubación de células con IgG anti RNP marcada con ¹²⁵I

Se incubaron 1×10^{-6} células, las cuales contenían un 25% de células T_r, con 5 μ g de anti-RNP ¹²⁵I, en 0.5 ml de MEM con 1% de ASB, en presencia o ausencia de 500 μ g de IgG, a 4 y 37°C por 1 hora, el resto del procedimiento se llevó a cabo en forma igual a lo descrito en el método anterior.

Incubación de células con inmunoglobulinas marcadas con ITFC

Se incubaron 1×10^{-6} células en 0.2 ml de MEM, en presencia de 2.1 o 4.2 mg de anti-RNP o IgG control marcadas con ITFC por una hora a 37°C. Posteriormente, las células se lavaron por 3 ocasiones con PBS con 1% de ASB (PBS-ASB), se resuspendieron en 0.2 ml del mismo amortiguador y se les añadió una gota de azul tripán al

0.04%. Una alícuota de esta mezcla, se colocó entre un portaobjetos y un cubreobjetos, y se revisó con un microscopio, con objetivo de 40 aumentos y ocular de 10, alternando la iluminación visible y ultravioleta. Se contaron las células con marca fluorescente en el núcleo y/a en el citoplasma. Se cuantificó el porcentaje de células viables antes y después de la incubación de éstas con las proteínas. Se revisó un mínimo de 400 células por experimento.

Estimulación de células con Concanavalina A (4).

Las células mononucleares a una concentración de 1×10^{-6} /ml en MEM suplementado con 2 mM de L-glutamina y 10% de SFT, se incubaron en presencia de Concanavalina A (Con-A), la cual se encontraba a una concentración de 12.5 μ g/ml, por 72 horas a 37°C en ambiente de CO₂ al 5%. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS y se resuspendieron en MEM a la concentración deseada.

Búsqueda de anticuerpos en el núcleo de las células de pacientes con Enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC)

Las células mononucleares depletadas de macrófagos de pacientes con EMTC, se lavaron por 3 ocasiones con PBS, se resuspendieron en el mismo amortiguador a una concentración de 1×10^{-6} células/ml, se hicieron frotis de las mismas y se dejaron secar al aire. Los portaobjetos se sumergieron en etanol al 56% por 5 minutos, posteriormente se lavaron con PBS-ASB por 3 ocasiones, se sumergieron en agua oxigenada al 0.5% para eliminar la actividad de peroxidasa endógena, se lavaron nuevamente y se les añadió una solución de fragmentos F(ab) anti-IgG humana marcados con peroxidasa (Bio Sis, Campiege, Francia) a una concentración de 100 μ g/ml. Posteriormente fueron lavados con PBS-ASB e incubados con el sustrato de la peroxidasa (3-3 Diamino-bencidina, 5 mg en 10 ml de Iris 0.05 M pH 7.6 y agua oxigenada 0.01%), por 5 minutos. Después fueron lavados y revisados con el microscopio, usando objetivo de inmersión, se revisaron un mínimo de 400 células por experimento. Como controles positivo y negativo, se usaron células mononucleares permeabilizadas con etanol e incubadas con suero de los mismos pacientes o de individuos sanos, las cuales fueron tratadas posteriormente como las preparaciones anteriores.

Búsqueda de anticuerpos en los núcleos de las células incubadas con suero con actividad anti-RNP

Se incubaron 1×10^{-6} células de pacientes con ENIC o de individuos sanos, con 200 μ l con suero de una paciente en el cual se había detectado un título de anti-RNP de $1:1.6 \times 10^{-7}$, por una hora a 37°C. Posteriormente las células se lavaron con PBS-ASE. El resto del procedimiento se llevó a cabo en la misma forma que en el método descrito anteriormente.

Cuantificación de anticuerpos anti-RNP

Se usó un método de hemaglutinación indirecta, con eritrocitos de carnero recubiertos de antígeno extraíble de núcleos (obtenido del Instituto Nacional de la Nutrición, México, D.F.), tratado o no con ribonucleasa A (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.). Se colocaron en cajas de hemaglutinación, 25 μ l del suero problema en diluciones seriadas, empezando por una dilución 1:200 y 25 μ l de las suspensiones de los eritrocitos al 3%. Se dejaron reposar en frío, toda la noche. El título de anti-RNP, se consideró como el valor de la mayor dilución del suero en la cual hubo aglutinación de los eritrocitos no tratados con ribonucleasa, pero no así con los eritrocitos tratados.

RESULTADOS

Asociación de IgG-¹²⁵I a células Daudi.

Se ha descrito que los anticuerpos penetran a los linfocitos T y B que poseen receptores para el fragmento Fc de la IgG (53), por ésto, al iniciar los trabajos, se seleccionó la línea celular Daudi, la cual está constituida por células de estirpe linfocide tipo B. Se cuantificó el porcentaje de éstas que expresaban en su membrana receptores para el fragmento Fc de la IgG. Se encontró que dichos receptores se encontraban presentes en el 40% de las mismas.

Por otra parte, también se ha reportado que anticuerpos de origen animal son capaces de penetrar a las células al igual que las de origen humano. Para probar si la internalización de las inmunoglobulinas es un fenómeno general, no reservado a las específicas contra RNP, se incubaron a 4 y 37°C, células Daudi con cantidades crecientes de inmunoglobulinas (purificadas a partir de sueros de individuos sanos), que previamente fueron marcadas con ¹²⁵I, mediante el Método de la Cloramina T (1 x 10⁻⁶ células y 50-500 µg de IgG- I en 500 µl de medio de cultivo).

A pesar de que se usaron grandes cantidades de inmunoglobulina marcada, no se alcanzó la saturación del sistema, ni a 4 ni a 37°C (Tabla 1 y Fig. 4). No hubo efecto de competencia ni a 4 ni a 37°C cuando en los ensayos se añadió inmunoglobulina sin marca (Fig. 2 y Tabla 2).

Marcaje de proteínas con ¹²⁵I por el Método de la Cloramina T en comparación con el de Bolton y Hunter

Para evaluar la posibilidad de alteración de las moléculas de inmunoglobulina por el procedimiento de marcado con isótopos, se analizó la propiedad de las inmunoglobulinas marcadas con ¹²⁵I por diferentes métodos, de unirse por su fragmento Fc a los receptores correspondientes en la proteína A del estafilococo y su desplazamiento mediante soluciones de pH bajo o hiperosmolares, ésto como un indicador de alteraciones a nivel molecular.

Se observó que a pH 7.2, las inmunoglobulinas marcadas por el Método de la Cloramina T o por el de Bolton y Hunter, se unieron a las columnas de Sepharosa-proteína A. Las marcadas por el método de Bolton y Hunter fueron eluidas fácilmente con un amortiguador de pH ácido, mientras que las marcadas mediante el método de la Cloramina T no se eluyeron con ese mismo tratamiento, ni con el uso de soluciones hiper-osmolares (figuras 5 y 6).

Tabla 1. Efecto de la temperatura en la asociación de IgG-¹²⁵I a células Daudi.

µg de IgG- ¹²⁵ I añadida al medio	µg de Proteína asociada a 4°C (A)	µg de Proteína asociada a 37°C (B)	Incremento (B-A)	p
50	0.655 ± 0.005	0.047 ± 0.010	0.014	>0.05
100	0.082 ± 0.006	0.073 ± 0.007	0.011	>0.05
250	0.290 ± 0.014	0.188 ± 0.018	-	
500	0.806 ± 0.050	0.593 ± 0.064	-	

Las condiciones son las mismas que en la figura 4. Los ensayos se hicieron por duplicado. Para el análisis se usó la prueba T de Student.

Nota. En este experimento y en los reportados en las tablas 2 y 4, el número de datos fue insuficiente para hacer un adecuado análisis estadístico, sin embargo éste, se llevó a cabo para apoyar los resultados.

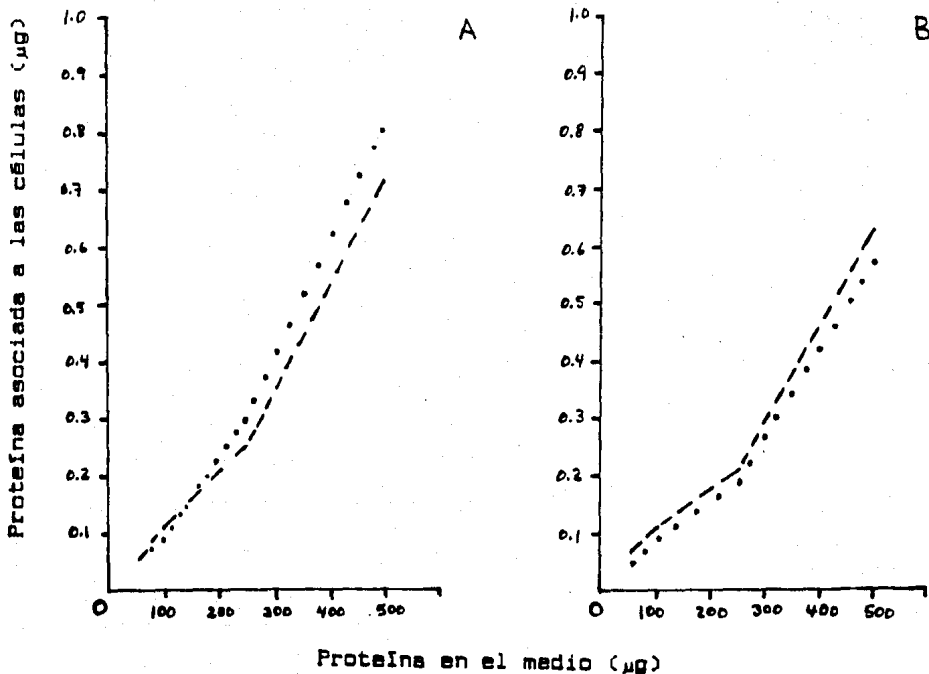


Fig. 4. Efecto de la temperatura en la asociación de IgG humana I a células Daudi, en presencia y en ausencia de IgG.

Las condiciones que se utilizaron fueron las siguientes: 1×10^6 células, 50-500 µg de IgG I y 10 mg de IgG en 500 µl de medio de cultivo.

A. Incubación a 4°C

B. Incubación a 37°C

--- En ausencia de IgG. ... En presencia de IgG.

Tabla 2. Efecto resultante del uso de IgG (como competidor) en la asociación de la IgG-¹²⁵I a las células Daudi a diferentes temperaturas.

1.-

µg de IgG- ¹²⁵ I añadida al medio	<u>µg de proteína asociada en</u>		Proteína desplazada (A-B)	p
	ausencia de IgG (A)	presencia de IgG (B)		
50	0.633 ± 0.005	0.038 ± 0.005	-	
100	0.082 ± 0.006	0.079 ± 0.007	-	
250	0.290 ± 0.014	0.266 ± 0.019	0.024	>0.05
500	0.806 ± 0.050	0.723 ± 0.068	0.083	>0.05

2.-

µg de IgG- ¹²⁵ I añadida al medio	<u>µg de proteína asociada en</u>		Proteína desplazada (A-B)	p
	ausencia de IgG (A)	presencia de IgG (B)		
50	0.047 ± 0.010	0.051 ± 0.010	-	
100	0.073 ± 0.007	0.101 ± 0.008	-	
250	0.186 ± 0.018	0.200 ± 0.017	-	
500	0.573 ± 0.064	0.625 ± 0.066	-	

1.- Ensayo realizado a 4°C.

2.- Ensayo realizado a 37°C.

Para el análisis se usó la prueba T de Student.

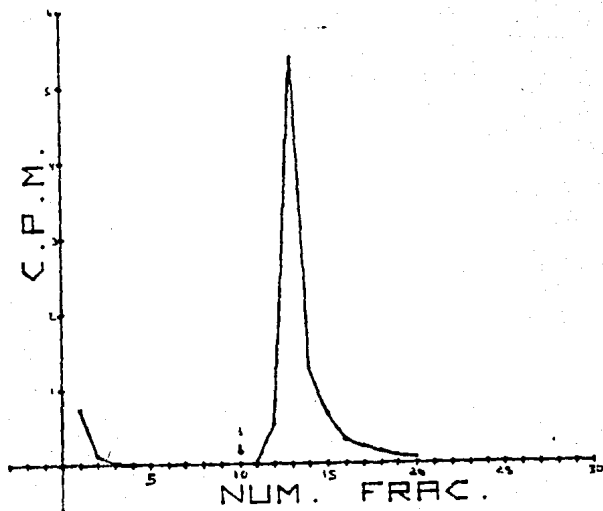


Figura 5. Desplazamiento de las inmunoglobulinas marcadas por el método de Bolton y Hunter, de la columna de Sepharosa-proteína A.

↓ Inicio de elución con amortiguador de glicina HCl 0.1 M pH 3.

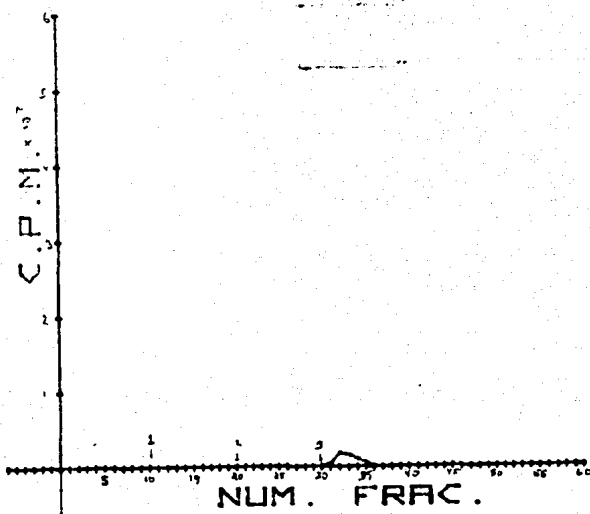


Figura 6. Desplazamiento de las inmunoglobulinas marcadas por el método de la Cloramina T, de la columna de Sepharosa-proteína A.

↓ Inicio de la elución con amortiguador de glicina HCl 0.1 M, pH 3. ↓ Elución con glicina HCl 0.2 M, pH 3. ↓ Elución con NaCl 1.5 M.

Asociación de anti-RNP a las células
 Considerando que de acuerdo a lo reportado, la penetración de los anticuerpos ocurre principalmente en las células T con receptores para el fragmento Fc de la IgG, se obtuvo una población de células T en la cual, el 25% de estas células tenían receptores Fc para IgG (T_r). Estas células en número de 1×10^{-6} . Se incubaron con 5 µg de anti-RNP-¹²⁵I a 4 y 37°C en 500 µl de medio de cultivo. En otros tubos además de los antes mencionado, se añadió 500 µg de IgG para que esta proteína compitiera por los sitios de unión.

No hubo diferencia entre la cantidad de proteína radiactiva asociada a las células con las dos temperaturas usadas. Tampoco hubo desplazamiento del material radiactivo asociado a las células cuando se usó la proteína sin marca como competidor (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la temperatura y de la presencia de IgG sobre la asociación de anti RNP-¹²⁵I a las células.

	<u>Temperatura de la incubación</u>		Incremento (B-A)	p
	4°C (A)	37°C (B)		
Proteína asociada en ausencia de 500 µg de IgG.	0.024 ± 0.001	0.025 ± 0.001	0.001	>0.05
Proteína asociada en presencia de 500 µg de IgG.	0.025 ± 0.005	0.026 ± 0.001	0.001	>0.05

Asociación de proteínas marcadas con isotiocianato de fluoresceína a células.

En los trabajos iniciales referentes a la penetración de los anticuerpos a células, se usaron anticuerpos obtenidos a partir del suero de una paciente con EMTC, en el cual por pruebas de hemaglutinación, se detectó un título de anti-RNP de 1 : 1.6×10^{-6} .

Para encontrar a un paciente en cuyo suero hubiera anticuerpos a títulos similares, se probaron los sueros de aproximadamente 200 individuos en los cuales se había diagnosticado EMTC o se sospechaba ésta. Se encontró a una paciente, con un título muy alto de anticuerpos anti-RNP (1 : 1.6×10^{-6}). De este suero se purificó la IgG mediante Cromatografía de intercambio iónico con DEAE celulosa, por el mismo método, se purificó IgG, a partir del suero de un individuo sano. Ambos lotes de proteínas, fueron marcadas con IIFC. Las relaciones de fluoresceína/proteína obtenidas fueron: 1.08 y 1.12 respectivamente. Se obtuvieron células mononucleares de individuos sanos y se depletaron de macrófagos, éstas se incubaron con cada una de las preparaciones fluorescentes (1×10^6 células, 2.1 mg de proteína en 200 μ l de medio de cultivo) a 37°C. No se encontraron células fluorescentes.

Para lograr una aproximación a las condiciones en las que se llevaron a cabo los experimentos iniciales (53-55), se aumentó la cantidad de proteína en los ensayos, hasta 4.2 mg, pero los resultados también fueron negativos.

En el primer trabajo referente a la penetración de anticuerpos a células vivas (53), los anticuerpos se purificaron mediante filtración en gel con sephadex G200, mientras que en nuestro trabajo se usó Cromatografía de intercambio iónico. Se consideró la posibilidad de que la purificación por filtración en gel, hubiera permitido seleccionar alguna población muy particular de inmunoglobulinas, que fuera la responsable de la realización del fenómeno de internalización y que ésta se hubiera perdido con la purificación por Cromatografía de intercambio iónico. Para explorar esta posibilidad, se purificaron inmunoglobulinas a partir del suero de la misma paciente y de un individuo sano de acuerdo a lo realizado en los trabajos iniciales (54). El material obtenido por este método resultó tener una menor pureza que la lograda por Cromatografía de intercambio iónico, fig. 7. Se marcó con IIFC obteniéndose relaciones F/P de 1.08 y 1.1 para el anticuerpo y el control respectivamente. Con este material se llevaron a cabo experimentos con el protocolo descrito anteriormente. El mismo experimento se hizo en 6 ocasiones y únicamente en una, en el ensayo con el anticuerpo, se encontró una sola célula que fluorescía en la región

nuclear, pero esta célula presentaba características morfológicas diferentes a las de los linfocitos, se consideró que se podría tratar de un macrófago o de un linfoblasto, fig. 8.

Uso de las células estimuladas con Con-A y búsqueda de pinocitosis de adsorción facilitada.

Se ha reportado que la penetración de los anticuerpos ocurre principalmente en células estimuladas con mitógenos, entre ellos, la Con-A. Se llevaron a cabo experimentos en los cuales se usaron células estimuladas con dicho mitógeno y un nuevo lote de anticuerpos fluorescentes, el cual tenía una relación F/P de 6.6.

Con base al conocimiento de que la Con-A puede inducir pinocitosis de adsorción facilitada de lipoproteínas (3,4), se incluyeron en el experimento, ensayos en los cuales se añadió α metil-D-manósido que es el ligando específico de la Con-A, el cual de haber pinocitosis de adsorción facilitada la bloquearía. Hubo fluorescencia en la región nuclear de las células, en cada una de las 3 condiciones seleccionadas, tabla 4.

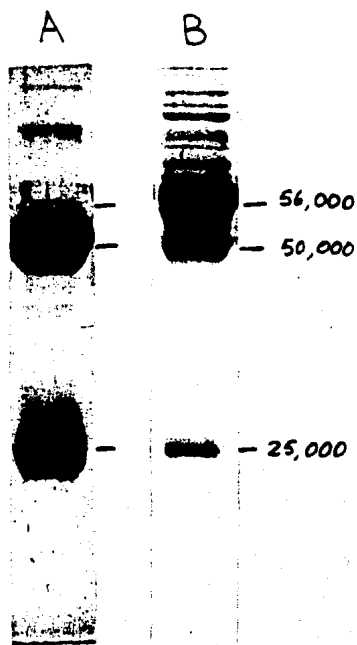


Figura 7. Electroforesis en gel de Poli-acrilamida-SDS de proteínas purificadas por diferentes métodos.

A. Proteínas purificadas por Cromatografía de intercambio iónico con DE 52.

B. Proteínas purificadas por Filtración en gel con Sephadex G-200.

A



B



Fig. 8 Célula con fluorescencia en la región nuclear.
A.-Iluminada con luz visible. B.- Excitada con luz
ultra-violeta.

Tabla 4. Asociación de proteínas fluorescentes a células estimuladas o no con Con-A. Para estos experimentos se usó 1×10^{-6} células, 4 mg de proteína fluorescente y α metil-D-manósido 0.025 M. Los experimentos se hicieron por duplicado.

	% células	% citoplasma	% núcleo
Células mononucleares estimuladas con Con-A	39	6	35
Células mononucleares estimuladas con Con-A y α metil-D-manósido	43	6	40
Células mononucleares no estimuladas	42	1	43

Efecto de las variaciones en la relación F/P de las proteínas, sobre la asociación de las mismas a las células.

Para investigar el efecto que el aumento de la relación F/P de las proteínas, tiene sobre la asociación de las mismas a las células, se marcaron anticuerpos e inmunoglobulinas control, tratando de obtener diferentes relaciones F/P. Con el material obtenido, se incubaron células mononucleares depletadas de macrófagos, obtenidas de individuos sanos, tabla 5 y figura 9.

Se observó una relación directa entre el incremento de la relación F/P de las proteínas y el porcentaje de células fluorescentes, tanto en el caso de las células incubadas con el anticuerpo como las incubadas con la inmunoglobulina control. La marca se localizó principalmente en el área celular correspondiente al núcleo.

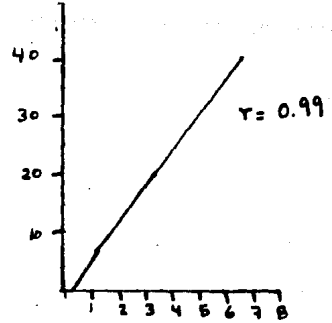
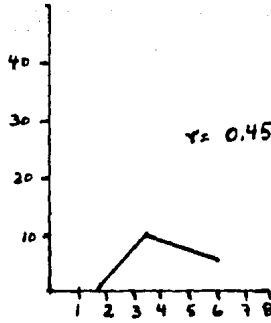
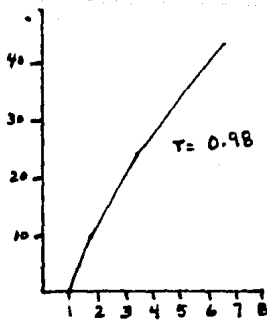
En la figura 10 pueden observarse células con fluorescencia en la región del citoplasma y del núcleo.

Tabla 5. Efecto del incremento de la relación F/P en la asociación de las proteínas a las células (1×10^{-6} células mononucleares, 4 mg de proteínas en 200 μ l de medio de cultivo).

Anti-RNP			
F/P	% células	% citoplasma	% núcleo
1.1	0	0	0
1.9	7	0	7
3.5	24	10	20
6.6	42	4	40

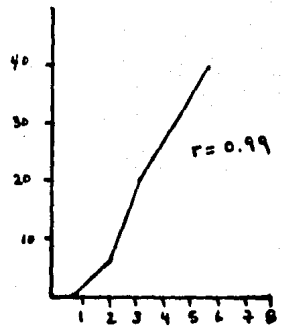
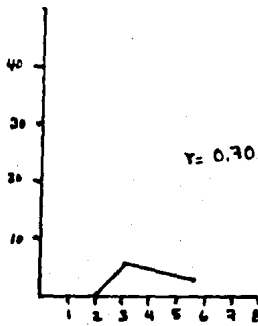
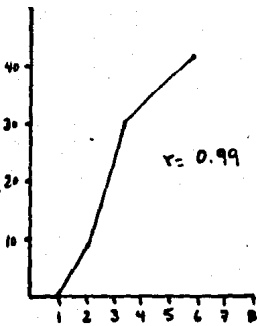
IgG control			
F/P	% células	% citoplasma	% núcleo
1.03	0	0	0
2.1	7	0	7
3.1	21	4	20
5.5	40	3	39

Anti-RNP



Relación F/P

IgG control



Relación F/P

Fig. 9. Asociación entre el incremento de la relación F/P de las proteínas y del número de células con marca fluorescente.

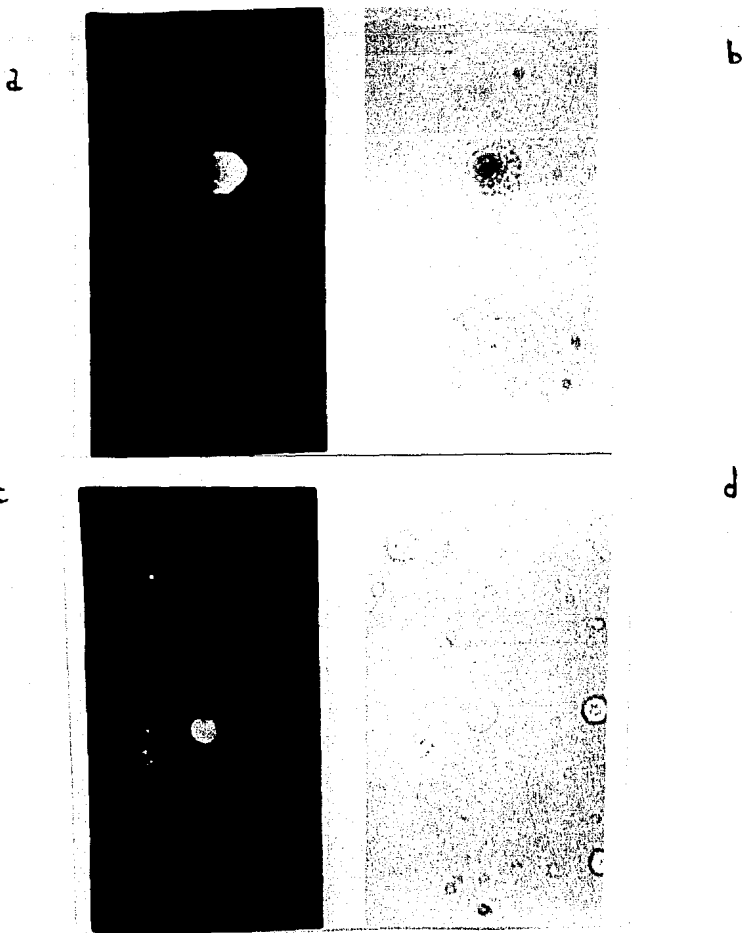


Fig. 10. Células mononucleares con fluorescencia en la región del citoplasma y del núcleo.

a) Célula con fluorescencia en la región del citoplasma; b) la misma célula, iluminada con fuente de luz visible; c) célula con fluorescencia en la región del núcleo; d) la misma célula, iluminada con fuente de luz visible.

Búsqueda de anticuerpos en el interior de las células linfoides de pacientes con EMTC.

Se ha reportado que en el interior de las células mononucleares de los pacientes con EMTC, se encuentran inmunoglobulinas fijadas al núcleo de las mismas (54). Para determinar si era necesario, para que la penetración de las inmunoglobulinas tuviera lugar, se requería de algún factor del suero diferente de éstas, o si alguna población de inmunoglobulinas que fuera capaz de penetrar se estuviera perdiendo durante los procesos de purificación, se decidió buscar dichas moléculas en el interior de las células de pacientes con EMTC. Para esto, se usaron fragmentos F(ab) marcados con peroxidasa (Fab-PDX), con actividad anti-IgG humana, preparados en cabra. Se determinó la dilución de los fragmentos que permitió una mejor eficiencia en el funcionamiento de los mismos, ésta fué 1:50. Se comparó la sensibilidad de los fragmentos Fab-PDX con la de los anticuerpos fluorescentes, en su uso para la búsqueda de anticuerpos antinucleares. Los fragmentos fueron los más sensibles, un suero positivo hasta una dilución 1:200 por inmunofluorescencia, lo fué hasta 1:400 con los fragmentos.

Se usaron células de 5 pacientes con EMTC, en el suero de los mismos, se cuantificaron anticuerpos anti-RNP y se determinó la presencia de anticuerpos antinucleares. Tabla 7.

Tabla 6. Anticuerpos anti-RNP y anticuerpos antinucleares en el suero de pacientes con EMTC.

Paciente	Anti-RNP	anticuerpos antinucleares
1	1:200	+
2	1:200	+
3	1:1.6 x 10 ⁶	+
4	1:200	+
5	1:200	+

Las células mononucleares de los mismos pacientes fueron depletadas de macrófagos y se cuantificó el porcentaje de las mismas que tuvieron receptor para el fragmento Fc de la IgG. Se encontró que entre 10 y 14% de las células de los diferentes pacientes, tenían dicho receptor.

Las células obtenidas, fueron permeabilizadas y tratadas con los fragmentos Fab-POX anti IgG. No se encontraron inmunoglobulinas en el núcleo de las células de los pacientes, mientras que en el control positivo, consistente en células mononucleares permeabilizadas, incubadas con un suero con anticuerpos antinucleares y posteriormente con los fragmentos Fab-POX, se encontró positividad en el 97% de los núcleos, fig. 11.

Para tratar de inducir la penetración de anticuerpos in vitro, se incubaron células mononucleares obtenidas de individuos sanos con el suero en el cual se había detectado el título mayor de anticuerpos anti-RNP. Por otro lado considerando la posibilidad de que la penetración de anticuerpos dependiera de características celulares propias de la EMTC, se incubaron células mononucleares obtenidas de los pacientes con el mismo suero mencionado anteriormente. Posteriormente se buscaron inmunoglobulinas en el núcleo de las células mediante el uso de los fragmentos Fab-POX. El resultado en ambos casos fué negativo.

a

b

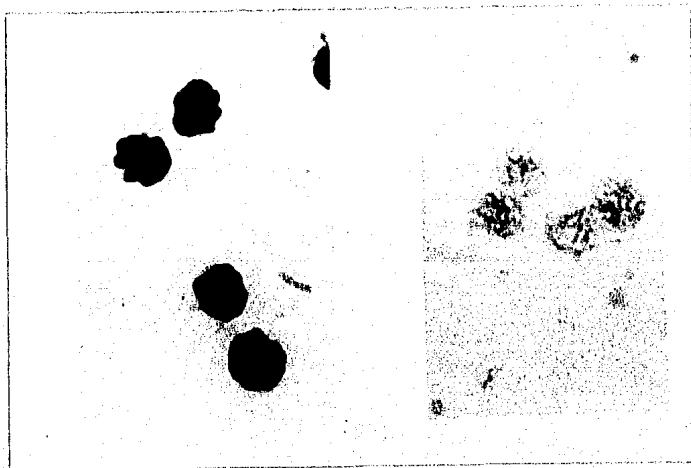


Figura 11. a) Células mononucleares con Inmunoglobulina G en el área nuclear, reveladas mediante el uso de fragmentos Fab marcados con peroxidasa. b) Células de pacientes con Enfermedad mixta del tejido conectivo, en los cuales no se encontró Inmunoglobulinas en el área nuclear.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en los experimentos en los cuales se usaron inmunoglobulinas sin actividad anti-RNP, marcadas con I y células Daudi, no nos revelaron que hubiera ocurrido una penetración de dichas moléculas a las células, pues no hubo un incremento en la cantidad de proteína asociada a las células a 37°C, con respecto a la que se asoció a 4°C. Tampoco pareció haber sitios de unión específica, pues no ocurrió un desplazamiento de las proteínas asociadas a las células cuando se usó el competidor específico. Por otra parte, no se alcanzó la saturación del sistema a 4 ni a 37°C.

Se consideró que la alteración causada a las inmunoglobulinas por el método de iodinación con Cloramina T y reveladas por su unión irreversible a la columna de proteína A-Sepharosa, podría ser la responsable de que la internalización no hubiera ocurrido, sin embargo, cuando se usaron anticuerpos marcados por el método de Bolton y Hunter, (mismo que no produjo alteración aparente a las inmunoglobulinas) y célula T enriquecidas en la población de Tr, tampoco hubo internalización ni unión específica aparente. La ausencia de unión de las inmunoglobulinas a los receptores Fc de las células, podría explicarse por la baja afinidad de los monómeros de IgG, a los receptores celulares correspondientes, como ha sido demostrado en otros sistemas celulares (66,67).

Dado que los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, no habían revelado que hubiera penetración de anticuerpos a células, se decidió tratar de reproducir el método, mediante el cual Alarcón y colaboradores (53) encontraron inicialmente el sistema de penetración de anticuerpos a células. Se obtuvo un suero con gran actividad de anti-RNP y a partir de él se purificaron las IgG por Cromatografía de intercambio iónico, en el material obtenido se determinó una actividad de anti-RNP de $1:8 \times 10^4$ a una concentración de 42 mg/ml. Este material se marcó con Isotiocianato de Fluoresceína y con él se hicieron diversos experimentos tratando de reproducir las condiciones usadas en los experimentos en los que se detectó la penetración de anticuerpos a células, pero no se encontró que ésta ocurriera.

Posteriormente se purificaron inmunoglobulinas con el método usado en los trabajos originales (Filtración en gel con Sephadex G-200), y con este material marcado con fluoresceína, tampoco se logró reproducir el fenómeno de penetración, Únicamente en un caso se encontró una sola

célula que tenía fluorescencia en el área nuclear, aunque ésta tenía características morfológicas similares a macrófagos o a linfoblastos. Se consideró que debido a que el método usado para depletar de macrófagos a las células mononucleares, había dejado un 3% de aquellos como contaminantes, existía una alta posibilidad de que dicha célula fuera un macrófago. La relación F/P de las inmunoglobulinas usadas en estos experimentos fué cercana a 1.

Ya que se ha reportado que la penetración de las inmunoglobulinas tiene lugar en un gran número de las células estimuladas con Con-A, se buscó dicho fenómeno en células previamente estimuladas. Debido a que la Con-A puede inducir pinocitosis de adsorción (3,4), en el mismo experimento, se buscó la existencia de la misma. Para este experimento se preparó un nuevo lote de inmunoglobulinas marcadas con Istitiocianato de fluoresceína, el cual tenía una relación F/P de 6.6 .

Se encontró que un gran número de células incorporaron marca fluorescente, principalmente en la región nuclear, pero esto ocurrió tanto en las preparaciones estimuladas con Con-A, como en aquellas en las que se usó α metil-D-manósido para bloquear la pinocitosis de adsorción facilitada, y también en las células no estimuladas. Se consideró que el uso de las inmunoglobulinas con alta relación F/P, podría ser la responsable del fenómeno encontrado, ya que se ha reportado que el uso de proteínas con alta carga eléctrica lleva a que estas se asocien a la célula en forma no específica (71,72), y el ITFC, introduce cargas negativas a la molécula a la cual se une (64). Por otra parte, también se ha reportado que otro factor que puede favorecer las uniones inespecíficas, de las proteínas marcadas a las células, es el uso de dichas proteínas en concentraciones altas (73), y tanto en nuestros experimentos como en los de Alarcón y colaboradores, las concentraciones de inmunoglobulinas usadas, fueron altas (53).

Mediante el uso de inmunoglobulinas con diferentes relaciones F/P, se encontró que existe una relación directa entre el incremento en la cantidad de fluorocromo unido a las proteínas, y el aumento del número de las células a las cuales dichas proteínas se asociaron, principalmente en la región nuclear. Esto se encontró cuando se usó anticuerpo y también cuando se usó inmunoglobulina control.

Se consideró la posibilidad de que la internalización de los anticuerpos fuera favorecida por las condiciones que tienen lugar internamente en el paciente con EMTC, esto es, que ocurriera preferentemente in vivo. Para corroborar esto, se buscaron las inmunoglobulinas en el núcleo de los linfocitos de los obtenidos de pacientes con EMTC, pero no

se encontraron. Tampoco se encontraron inmunoglobulinas en el núcleo de los linfocitos cuando se intentó inducir su internalización in vitro, incubando células de individuos sanos o de pacientes con EMTC con suero en el cual había un título alto de anti-RNP.

Desafortunadamente para el proyecto, los pacientes con EMTC son pocos, y aquellos en cuyo suero hay una gran cantidad de anti-RNP son aún menos. Durante este trabajo solamente se contó con un suero con dicha característica, de tal forma que los resultados obtenidos deben ser considerados en forma particular, puesto que no se puede descartar la posibilidad de que existan variaciones entre los anticuerpos de los diferentes pacientes, ésto es, que existieran diferentes poblaciones de anti-RNP, unas con capacidad de reconocer a su antígeno correspondiente y también con capacidad de penetrar a las células, y otras que únicamente pudieran reconocer a su antígeno. También debe considerarse la posibilidad de que los anticuerpos capaces de penetrar a las células, estuvieran presentes únicamente en determinados pacientes con EMTC o en determinados periodos del padecimiento.

Cabe hacer mención que las alteraciones de la fisiología de las células, reportadas en varios artículos (56-58), también podrían tener lugar sin que los anticuerpos penetren a las células, ya que los fragmentos Fc de las inmunoglobulinas son capaces de inducir la producción de prostaglandina E por las células a las cuales se unen, llevando de esta forma a un efecto supresor sobre las células blanco (74). La posibilidad de que los anticuerpos anti-RNP ejercieran su efecto dañino desde el exterior de las células, ya ha sido considerado como una alternativa por los mismos autores que describieron por primera vez el sistema de penetración de dichos anticuerpos a las células (75).

REFERENCIAS

1. Silverstein, S.C.; Steinman, R.M. and Cohn, Z.A. Endocytosis. *Ann. Rev. Biochem.* 46: 669-772, 1977.
2. Pearse, B.M.F. and Bretcher, M.S. Membrane recycling by coated vesicles. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 85-101, 1981.
3. Storrie, B. and Maurer, K.M. Role of Concanavalin A as an endocytic modulator in chinese hamster ovary cells. *J. Cell. Sci.* 50: 135-147, 1981.
4. González, N.A. and Sly, W.S. Concanavalin A mediate up-take of enzymes by fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 85: 174-182, 1978.
5. Pastan, I.H. and Willingham, M.C. Receptor mediated endocytosis of hormones in cultured cells. *Ann. Rev. Physiol.* 43: 239-250, 1981.
6. Helenius, A.; Kartenbeck, J.; Simons, K. and Fries, E. On the entry of Semliki Forest Virus into BHK-21 cells. *J. Cell. Biol.* 84: 404-420, 1980.
7. Farquar, M.G. Multiple pathways of exocytosis, endocytosis and membrane recycling: validation of a Golgi route. *Fed. Proc.* 42: 2407-2412, 1983.
8. Anderson, R.G.W.; Goldstein, J.L. and Brown, M.S. Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. *P.N.A.S.* 73: 2434-2438, 1976.
9. Anderson, R.G.W.; Brown, M.S. and Goldstein, J.L. Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptors bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* 10: 351-364, 1977.
10. Warren, R. and Duyle, D. Turnover of the surface proteins and the receptor for asialoglycoproteins in primary cultures of rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 256: 1346-1355, 1981.
11. Membrane recycling. *Ciba Foundation Symposiums* 92. Pitman Book Ltd., London, 1982.
12. Golstein, J.L.; Anderson, R.G.W. and Brown, M.S. Coated pits, coated vesicles and receptor mediated endocytosis. *Nature* 279: 679-683, 1979.
13. Steer, C. and Klausner, R.D. Clathrin-coated pits and coated vesicles: functional and structural studies. *Hepatology* 3: 437-454, 1983.
14. Roth, I.F. and Porter, K.R. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Cell Biol.* 20: 313-334, 1964.

15. Willingham, M.C. and Pastan, I.H. The receptosome: and intermediate organelle of receptor-mediated endocytosis in culture fibroblasts. *Cell* 21: 67-77, 1980.
16. Pastan, I.H. and Willingham, M.C. Journey to the center of the cell: role of the receptosome. *Science* 214: 504-509, 1981.
17. Goldstein, J.L.; Basu, S.K.; Brunschede, G.Y. and Brown, M.S. Release of low density lipoprotein from its cell surface receptor by sulfated glycosaminoglycans. *Cell* 7: 85-95, 1976.
18. Brown, M.S. and Goldstein, J.L. Receptor-mediated endocytosis: insight from the lipoprotein receptor system. *P.N.A.S.* 76: 3330-3337, 1979.
19. González-Noriega, A.; Grubb, J.H.; Talkad, U. and Sly, W.S. Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhance lysosomal enzyme secretion by impaired receptor recycling. *J. Cell Biol.* 839-852, 1980.
20. Sands, G.N. and Neufeld, E.F. Recognition and receptor-mediated uptake of a lysosomal enzyme L-Iduronidase by cultured human fibroblasts. *Cell* 12: 619-627, 1977.
21. Youngdahl-Turner, P.; Mollman, I.S.; Allen, R.H. and Rosenberg, L.E. Protein mediated vitamin uptake. Adsorptive endocytosis of the transcobalamin II-cobalamin complex by cultured human fibroblasts. *Exp. Cell. Res.* 118: 127-134, 1979.
22. Schwartz, A.L.; Fredovich, S.E. and Lodish, H.F. Kinetic of internalization and recycling of the asialoglycoprotein receptor in a hepatoma cell line. *J. Biol. Chem.* 257: 4230-4237, 1982.
23. Kaplan, J. Evidence for re-utilization of surface receptors for macroglobulin-protease complexes in rabbit alveolar macrophages. *Cell* 19: 197-205, 1980.
24. Kavin, M. and Mintz, B. Receptor-mediated endocytosis of transferrin in developmentally totipotent mouse terato-carcinoma stem cells. *J. Biol. Chem.* 256: 3245-3252, 1981.
25. Steinman, R.M.; Mellman, I.S.; Muller, W.A. and Cohn, Z.A. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J. Cell Biol.* 96: 1-27, 1983.
26. Mellman, I.S.; Steinman, R.M.; Unkeless, J.C. and Cohn, Z.A. Selective iodination and polipeptide composition of pinocytic vesicles. *J. Cell Biol.* 87: 712-722, 1980.

27. Kasuga, M.; Kahn, C.R.; Itedo, J.A.; Obberghen, E.U. and Yamada, K.M. Insulin-induced receptor loss in cultured human lymphocytes is due to accelerated receptor degradation. *P.N.A.S.* 78: 6917-6921, 1981.
28. Carpentier, J.L.; Gorden, P.; Amherdt, M.; Van Obberghen, E.; Kahn, C.R. and Orci, L. ¹²⁵I-insulin binding to cultured human lymphocytes: initial localization and fate of hormone determined by quantitative electron microscopic autoradiography. *J. Clin. Invest.* 61: 1056-1070, 1978.
29. Brown, M.S.; Anderson, R.G.W. and Goldstein, J.L. Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membranes. *Cell* 32: 663-667, 1983.
30. Rodewald, R. Intestinal transport of antibodies in the newborn rat. *J. Cell Biol.* 58: 189-211, 1973.
31. Abrahamson, D.R. and Rodewald, R. Distribution of Immunoglobulin G receptors in the small intestine of the young rat. *J. Cell Biol.* 85: 18-32, 1980.
32. Rodewald, R. pH-dependent binding of immunoglobulins to cells of the neonatal rat. *J. Cell Biol.* 71: 660-670, 1976.
33. Abrahamson, D.R. and Rodewald, R. Evidence for the sorting of endocytic vesicle content during the receptor mediated transport of IgG across the newborn rat intestine. *J. Cell Biol.* 91: 270-280, 1981.
34. Sitlin, Y.C.; Gitlin, Y.I. and Glitin, D. Selective transfer of plasma proteins across mammary gland in lactating mouse. *Amer. J. Physiol.* 230: 1594-1602, 1976.
35. Sonoda, S. and Schlamowitz, M. Kinetic and specificity of transfer of immunoglobulin G and serum albumin across rabbit yolk sac in utero. *J. Immunol.* 108: 807-818, 1972.
36. Hay, F.C.; Hull, M.S. and Torrigians, G. The transfer of human IgG subclasses from mother to foetus. *Clin. Exp. Immunol.* 9: 335-338, 1971.
37. Bienenstock, J. and Befus, A.D. Mucosal immunology. *Immunology* 41: 249-270, 1980.
38. Rosenkranz, H.S.; Erlanger, B.F.; Tanenbaum, S.W. and Baiser, S.M. Purine and pyrimidine specific antibodies: effect on the fertilized sea urchin egg. *Science* 145: 282-283, 1964.
39. Ng, C.W. and Gregory, K.F. Antibody to lactate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Acta*, 170: 45-53, 1968.

40. De Petris, S. and Raff, M.C. Normal distribution, patching and capping of lymphocyte surface immunoglobulin studies by electron microscopy. *Nature, New Biol.* 241: 257-259, 1973.
41. Varesio, L.; Cappuccinelli, P. and Forni, G. Inhibition of replication of virus-transformed fibroblasts by antibodies to RNA. *Cancer Res.* 35: 3558-3565, 1975.
42. Schnaider, J.J.; Tulkens, P.; DeDuve, Ch. and Trouet, A. Fate of plasma membrane during endocytosis. I. Uptake and processing of anti-plasma membrane and control immunoglobulins by cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* 82: 449-465, 1979.
43. Okudaira, K.; Searles, R.P.; Tanimoto, K.; Horiuchi, Y. and Williams, R.C. T lymphocyte interaction with immunoglobulin G antibody in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 69: 1026-1038, 1982.
44. Oppenheimer, J.H. Thyroid hormone action at the cellular level. *Science*, 203: 971-979, 1979.
45. Yanker, B.A. and Shooter, E.M. Nerve growth factor in the nucleus: interaction with receptors on the nuclear membrane. *P.N.A.S.* 76: 1269-1273, 1979.
46. Marchisio, P.C.; Noldini, L. and Calissano, P. Intracellular distribution of nerve growth factor in rat pheochromocytoma PC12 cells: evidence for a perinuclear and intranuclear location. *P.N.A.S.* 77: 1656-1660, 1980.
47. Golfine, I.D.; Smith, G.J.; Wong, K.Y. and Jones, A.L. Cellular uptake and nuclear binding of insulin in human cultured lymphocytes: evidence for potential intracellular sites of insulin action. *P.N.A.S.* 1368-1372, 1977.
48. Vignori, R.; Goldfine, I.D.; Wong, K.Y.; Smith, J. and Pezzino, U. The nuclear envelope. *Biol. Chem.* 253:2098-2103, 1978.
49. Andres, R.Y.; Jeng, I. and Bradshaw, R.A. Nerve growth factor receptors: identification of distinct classes in plasma membranes and nuclei of embryonic dorsal root neurons. *P.N.A.S.* 74: 2785-2789, 1977.
50. De la Faille-K, E.H.B. In vitro nuclear localization of immunoglobulins in clinically normal skin in systemic and procainamide-induced lupus erythematosus. *Neth. J. Med.* 17, 58-65, 1974.
51. Prystowsky, S.D. and Tuffanelli, D.L. Speckled (particulated) epidermal nuclear IgG deposition in normal skin. *Arch. Dermatol.* 114, 705-710, 1978.

52. Wells, J.U.; Webb, J.; Van Deventer, M.U.; Fry, B.; Pollard, K.M.; Raftos, J.; Monk, W. and Nelson, D.S. In vivo anti-nuclear antibodies in epithelial biopsies in SLE and other connective tissue diseases. Clin. Exp. Immunol. 38, 424-435, 1979.
53. Alarcón, S.A.; Ruiz, A.A. and Fishbein, E. Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors. Nature 271: 67, 1978.
54. Alarcón, S.D.; Ruiz, A.A. and Fishbein, E. Antibody penetration into living cells. I Intranuclear immunoglobulin in peripheral blood mononuclear cells in mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 35: 364, 1979.
55. Alarcón, S.D.; Ruiz, A.A. and Llorente, L. Antibody penetration into living cells. II. Anti-ribonucleoprotein IgG penetrates into T_H lymphocytes causing their deletion and the abrogation of suppressor function. J. Immunol. 12: 1855, 1979.
56. Alarcón, S.D.; Llorente, L. and Ruiz, A.A. Antibody penetration into living cells. III. Effect of anti-ribonucleoprotein IgG on the cell cycle of human peripheral blood mononuclear cells. Clin. Immunol. Immunopathol, 23: 22, 1982.
57. Alarcón, S.D. and Llorente, L. Antibody penetration into living cells. IV. Different effects of anti-native DNA and anti-ribonucleoprotein IgG on the cell cycle of activated T cells. Clin. Exp. Immunol. 52: 365-371, 1983.
58. Llerena, J.M.; Ruiz, A.A.; Alarcón, S.D.; Llorente, L. and Diaz, J.E. Antibody penetration into living cells. V. Interference between two Fc receptor-mediated functions: antibody penetration and antibody dependent cellular cytotoxicity. Immunology 43: 249, 1981.
59. American Type Culture Collection. Catalog, 1982.
60. Boyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Suppl 97): 77, 1968.
61. Diaz-Jouanen, E.; Rivero, S.; Llorente, L. and Alarcón, S.D. Receptor and non-receptor bearing lymphocytes in untreated systemic lupus erythematosus. Variation with disease activity. Rev. Inv. Clin. 29: 265, 1977.

62. Greenwood, F.C.; Hunter, W.M. and Glover, J.S. The preparation of ^{125}I -labeled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochemical Journal* 103: 120-128, 1967.
63. Bolton, A.E. and Hunter, W.M. The labelling of proteins to high specific containing acylating agent. *Biochem. J.* 133: 529-538, 1973.
64. Nairing, R.C. Standardization in immunofluorescence. *Clin. Exp. Immunol.* 3: 465-476, 1968.
65. Rinderknecht, H. Ultra-rapid Fluorescent labelling of proteins. *Nature*, 193 (4811): 167-168, 1962.
66. Methods in immunology and immunochemistry. Vol. III. Curtis A. Williams and Merril W. Chase. Academic Press. 1971.
67. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
68. Sherman, L.A.; Harwing, S. and Haynes, D.A. Macromolecular complexes formed as the result of Chloramine-T radioiodination of proteins. *Int. J. Applied. Radiat Isotopes* 25: 81-85, 1974.
69. Lane, B.; Bricker, M. and Cooper, S. Fc receptor of mouse cell lines. II. Binding specificity and identification of the Fc receptor on a lymphoid leukemia. *J. Immunol.* 128: 1825-1831, 1982.
70. Day, J.; Thornburg, R.; Thorpe, S. and Baynes, J. Carbohydrate-mediated clearance of antibody-antigen complexes from the circulation. *J. Biol. Chem.* 255: 2360-2365, 1980.
71. Farquhar, M. Recovery of surface membrane in anterior pituitary cells. *J. Cell Biol.* 77: R35-R42, 1978.
72. Nilsson, J.; Ksiazek, T. and Thyberg. Endocytosis of cationic and anionic proteins cultivated arterial smooth muscle cells. *Exp. Cell Res.* 143: 359-365, 1983.
73. Huhn, A. and Nairn, R.C. A nuclear stainin artefact by immunofluorescence. *Clin. Exp. Immunol.* 2: 697-700, 1967.
74. Poswell, J.; Rosen, F.S. and Merler, E. The effect of Fc fragments of IgG on human mononuclear cell responses. *Cell Immunol.* 52: 395-403, 1980.
75. Alarcón, S.D.; Llorente, L.; Fishbein, E. and Diaz-Jouanen, E. Abnormalities in the content of nucleic acids of peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism.* 25: 304-317, 1982.