

11261
ley
9



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA
División de Estudios Superiores
Centro Médico Nacional
Instituto Mexicano del Seguro Social

**DESARROLLO DE UNA TECNICA SEROLOGICA PARA EL
DIAGNOSTICO TEMPRANO DE LESION HEPATICA**

TESIS DE POSGRADO

Que para obtener el diploma de
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
Especialidad Inmunología

presenta

ROSA ARACKLY PALAFOX ZALDIVAR



Dir. de Tesis: Dr. JESUS KUMATE



México, D. F.

FALLA DE ORIGEN

1986



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.

INDICE

	Página
Introducción	1
a) Antecedentes históricos de la obtención de antígenos hepáticos	3
b) Daño hepático experimental	7
Material y Métodos	8
a) Obtención y cultivo de hepatocitos	8
b) Obtención y titulación de anticuerpos anti-hepatocitos	11
c) Producción de lesión hepática en ratas y cinética de liberación de antígenos hepáticos a la circulación	21
Resultados	24
Discusión	38
Conclusiones	42
Bibliografía	43

INTRODUCCION

Las enfermedades son el resultado de ataques o mal funcionamiento de órganos y/o células y como resultado de lo anterior, alteraciones de una serie de eventos moleculares. Las consecuencias patológicas de este ataque se pueden traducir de diferentes formas, (Fig.1) (1). Como se puede apreciar en esta figura donde se pone como ejemplo al hígado, las alteraciones pueden ir desde cambios enzimáticos a diversos niveles, hasta la aparición anormal en la circulación de material propio del órgano atacado. La agresión puede venir del medio externo a través de infecciones bacterianas, virales o sustancias tóxicas u originarse dentro del mismo organismo como en los casos de defectos genéticos, enfermedades autoinmunes, etc. (2,3).

La agresión hepática comenzó a ser estudiada en forma sistemática a partir de 1938, gracias al hallazgo de antígenos hepato-específicos (4). Posteriormente, se encontró que la salida de compuestos intracelulares a la circulación (principalmente enzimas) estaba relacionada con los casos de necrosis hepática (5,6,7).

La cuantificación de los niveles séricos de enzimas en los casos de lesión orgánica, ha demostrado que en un número importante de ellas no son específicas para el diagnóstico de lesión orgánica única; sin embargo, constituye una buena herramienta en el diagnóstico clínico (8,9).

En la literatura existen antecedentes en los cuales se describe la obtención de antígenos específicos de hígado.

INTERACCION INICIAL

HIGADO

Activación suprarrenal	Cambios de RE Inhibición del RNA y síntesis de pro- teínas.	Niveles de ATP
Pérdida de glucógeno	Alteración de patro- nes enzimáticos.	Acumulación de grasas
Recuperación	Alteración de mem- branas celulares.	
Cambios irreversi- bles	Daño mitocondrial Entrada de Ca^{++} Falta de aporte energético	

NECROSIS

Cuadro 1. Cambios producidos en el hígado por acción de fármacos.

de diferentes especies incluyendo al hombre (10,11,12).

Estos antígenos han sido estudiados con el objeto de entender los mecanismos involucrados en la fisiopatología de padecimientos hepáticos, así como de la distribución de esos antígenos en la célula hepática debido a que reacciones inmunes contra ellos pueden estar relacionadas con en-

fermedades autoinmunes de naturaleza generalizada (13-20)

El trabajo presente ha sido orientado hacia la aplicación de técnicas inmunológicas en la detección de material antigénico específico circulante, como un índice de lesión hepática.

Proponemos hacer de esta prueba, un método de diagnóstico temprano de lesión hepática que si bien, no es específica para una enfermedad hepática determinada, sí podrá demostrar cualquier grado de lesión (en extensión y/o tiempo) a ese nivel y que sea además, de bajo costo y de fácil realización.

A) ANTECEDENTES HISTORICOS DE LA OBTENCION DE ANTIGENOS HEPATICOS.

Se han identificado muchos componentes antigénicos en el hígado y algunos de ellos en asociación con organelas intracelulares, incluyendo microsomas y mitocondrias (10-12). Sin embargo, a los antígenos que se les ha dado mayor interés son indiscutiblemente aquellos asociados con la membrana plasmática del hepatocito, ya que éstos se encuentran directamente relacionados con la fisiopatología de algunas enfermedades autoinmunes hepáticas tales como la hepatitis crónica activa y algunos tipos de cirrosis (13-20). Claude en 1938, por centrifugación diferencial (fraccionamiento citoquímico de homogenados tisulares) aisló fracciones subcelulares de hepatocitos. Esto hizo posi-

ble que en 1940 Henle y Chalmers demostraran la organo-especificidad de fracciones citoplasmáticas de hepatocitos de ratón (4).

En 1941, Furth y Kabat, mediante fijación de complemento encontraron antígenos organo-específicos en fracciones citoplasmáticas del hepatocito. Hacia 1943, no se podía aún definir si las partículas correspondían a fracciones mitocondriales o microsomas. Claude en 1946, demuestra que las fracciones hepáticas usadas por Henle y Chalmers y por Furth y Kabat eran de naturaleza microsomal (21,22).

Dumonde y col. encontraron por doble inmunodifusión radial diferencias antigénicas entre productos provenientes de mitocondrias, lisosomas y microsomas (13).

La caracterización en 1956 por Palade y Siekevitz, de la fracción hepática microsomal en términos morfológicos y bioquímicos, dió las bases fisiológicas para estudios posteriores de los antígenos microsomas hepato-específicos (21,22).

En 1958, Vogt demuestra que un antisuero anti-microsomas hepáticos puede convertirse en específico de hígado por absorciones con microsomas de riñón (21,22,24).

Witbeck y Rosenberg encontraron un antígeno ribosomal no-específico de órgano o tejido, pero sí de la fracción subcelular (25,26).

D'Amelio y cols. demostraron en mitocondrias 7 antígenos específicos, además de dos antígenos propios de membranas internas y no de membranas externas. (10,11,27). De los trabajos mencionados anteriormente se puede deducir que hay muchos antígenos específicos de cada fracción subcelular: ocho de la fracción citoplasmática soluble, siete de mitocondrias, 11 de microsomas y uno de membranas externas de mitocondrias y dos de membranas internas (10,11).

Algunos de estos antígenos no son específicos de órgano, mientras que otros (los de mayor importancia) son organo-específicos.

Otros investigadores le han dado mayor importancia a la fracción citoplásmica soluble y así Dorner y cols. en 1962 describen una proteína soluble hepato-específica, la cual se destruye tanto con tripsina como con calor a los 90°C durante 5 minutos (28-30).

Fravi y Lindenmann en 1968 obtienen una proteína soluble hepato-específica extraída con cloroformo del sobrenadante de un homogenizado de hepatocitos de rata. La doble inmunodifusión de esta proteína presenta sólo reacción cruzada con extractos de riñón y suero normal de rata. A esta proteína se le denominó "antígeno F" (31).

La importancia del "antígeno F" se demostró hacia 1973 ya que por doble inmunodifusión se encontró asociado a daño hepatocelular, hepatitis viral, esteatonecrosis y carcinoma hepatocelular (32,33).

Mihas y col. y Sugamura y col. purifican y caracterizan al "antígeno F" de extractos salinos de hígado de ratón y demuestran su hepato-especificidad. Este antígeno tuvo un peso molecular entre 40-80,000 d y un punto isoeléctrico de 6.5-6.7. Estudios de inmunofluorescencia demostraron al "antígeno F" distribuido homogéneamente en el citoplasma de las células hepáticas (34-38).

Meyer zum Buschenfelde y cols. y Licht y cols. caracterizaron una proteína soluble hepato-específica probablemente similar a la descrita por Dorner y cols.

Esta proteína tuvo la característica de ser detectada como tal en pacientes con hepatitis crónica activa, así como anticuerpos contra ella misma en los mismos pacientes.

Estudios inmunológicos y fisicoquímicos demostraron que este antígeno era una lipoproteína hepato-específica de alto peso molecular y de baja densidad, la cual se encontraba localizada en la membrana de los hepatocitos y se denominó LSP (liver Specific Protein) (39-45).

Hasta ahora la organo-especificidad del LSP no ha sido demostrada en forma convincente ya que preparaciones similares de otros órganos de rata, tales como el riñón, páncreas y bazo, reaccionan con la LSP y con el suero normal de rata, por lo que se sugiere que ésta expresa determinantes antígenicos no específicos de órgano ni de especie (46-53).

El aislamiento de hepatocitos para estudios fisiológicos y metabólicos así como para la obtención de antígenos hepato-específicos, llevó al aislamiento y cultivo de éstas células. Sin embargo, las células así obtenidas resultaron con disminución de sus funciones (54).

Las mejores preparaciones de hepatocitos se obtuvieron tratando al hígado durante cortos períodos a bajas concentraciones de colagenasa.

Howard y col. en 1967, describen un método para aislar hepatocitos mediante el uso de enzimas (hialuronidasa y colagenasa) y tratamiento mecánico. Las células así obtenidas mantenían su integridad morfológica, así como sus características fisiológicas durante lapsos prolongados (54).

Berry y Friend en 1969 usaron el método de Howard en la obtención de hepatocitos e introdujeron algunas modificaciones tales como la perfusión hepática mediante el uso in situ de perfusión por recirculación, exponiendo durante mayor tiempo el hígado al medio enzimático y el uso de soluciones para aislamiento libres de calcio y magnesio. Con este nuevo procedimiento se reportaron hasta 80-90% de viabilidad de las células hepáticas (55-58).

B) DAÑO HEPATICO EXPERIMENTAL.

El daño provocado experimentalmente por drogas al hígado ha permitido clasificarlas desde un punto de vista morfológico en:

- 1) Las que provocan colestasis
- 2) Las que provocan colestasis y necrosis
- 3) Las que provocan principalmente necrosis

En este trabajo nos referiremos a aquellas drogas que producen necrosis debido a que hay salida de antígenos hepáticos a la circulación.

Los signos histológicos de este tipo de lesiones son variables ya que incluyen desde hinchazón local o necrosis por coagulación de las células con ligera infiltración local de macrófagos hasta zonas confluentes de necrosis que llevan incluso a la destrucción masiva del hígado.

En la mayoría de los casos de hepatitis tóxica por drogas tales como el tetracloruro de carbono, cloroformo, etc. las lesiones son centrolobulares. Por otro lado, drogas tales como el fósforo, compuestos arsenicales, tetraciclinas, etc., provocan lesiones periportales (59-62).

MATERIAL Y METODOS

a) OBTENCION Y CULTIVO DE HEPATOCITOS

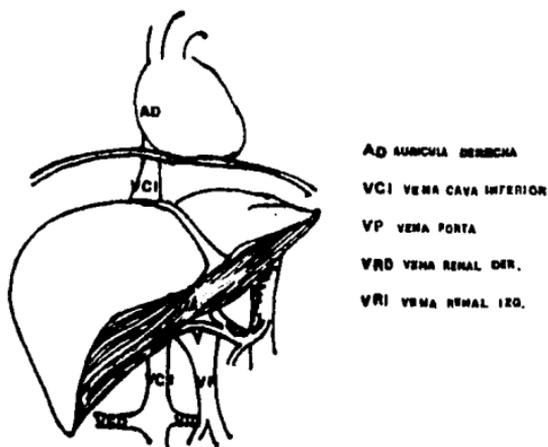
La obtención de hepatocitos se realizó mediante la técnica de Berry y Friend (59), para lo cual se usaron ratas macho de la cepa Long/Evans de 200-300 g de peso, anestesiadas con Ketalar (5mgs/100 g de peso) y Droperidol (2 mgs/100 g de peso). Una vez anestesiadas se les aplicó 0.6 ml

de heparina a través de la vena dorsal de la cola. Posteriormente se incidió la pared abdominal hasta llegar a la cavidad, se localizó la vena porta y la vena cava inferior, la cual se ligó al nivel de la entrada de la vena renal, inmediatamente se cateterizó la vena porta con Punzocat Num.18.

Una vez realizada la cateterización, se inició la perfusión hepática por recirculación para lo cual se cateterizó de la misma manera la vena cava inferior en su porción torácica a través de la aurícula derecha completando así el ciclo. Para la perfusión se empleó solución de Hank con - colagenasa tipo IV (Sigma Chemical Co.) 0.05%, la cual fue colocada en una bomba de perfusión de tres vías. Al mismo tiempo se colocó otra bomba de perfusión, la cual contenía solución de Hank libre de enzimas (100 ml), solución Hepes (4%), medio de Leibowitz (30%), suero fetal de ternera (10%). Ambas bombas fueron colocadas en baño maría a 44-46°C y conectadas por una llave de tres vías a la porta de la rata. La presión de perfusión se obtuvo con carbógeno (O₂ al 95% y CO₂ al 5%). (foto 1).



Foto 1. Perfusión hepática por recirculación através de la vena porta. La presión de perfusión se mantiene manualmente.



Esquema 1. Relaciones anatómicas del hígado y de la vena porta.

Una vez realizada la perfusión del hígado, éste se retiró cuidadosamente, se homogeneizó y posteriormente se filtró a través de malla de nylon.

Una vez obtenida la suspensión se centrifugó a 800, 600 y 400 rpm durante 5 minutos, eliminando cada vez el sobrenadante y resuspendiendo nuevamente en el medio base, el cual es posteriormente suplementado con penicilina (50 u/ml) y estreptomycin (50 ug/ml). (65).

Al finalizar las centrifugaciones se probó la viabilidad de los hepatocitos con la técnica de colorante supravital con azul de Tripán. Se determinaron el grado de contaminación, el rendimiento y la morfología (65).

Antes de su uso tomaron alicuotas de 1 ml de la suspensión de hepatocitos cultivados, los cuales fueron sometidos a sonicación utilizando un desintegrador ultrasónico (MSE) durante períodos de 2 minutos a 12 micrones de amplitud y a una intensidad media. El número de períodos de sonicación dependió de estudios, entre ellos de viabilidad de los hepatocitos mediante la técnica de azul de Tripán.

Los hepatocitos sonicados son sometidos a centrifugaciones de 25,000 rpm 5x. Al sobrenadante obtenido se le denominó "Fracción Soluble".

A la suspensión obtenida después de la sonicación se le determinó concentración de proteínas mediante la técnica de Lowry (66).

b) OBTENCION Y TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-HEPATOCITOS.

Se emplearon conejos machos de la raza Nueva Zelanda blancos (NEB) de 3 Kgs de peso; antes de la inmunización se les sangró para usar el suero como testigo.

Las inmunizaciones se realizaron con 2 mg de proteína en 1 ml de adyuvante completo de Freund, por vía subcutánea y semanalmente, 4x. Una semana después de la última inmunización, se sangró para determinar el título de anticuerpos.

Las inmunizaciones subsecuentes se realizaron con 2 mg

de protefina en 1 ml de adyuvante completo de Freund, por vía subcutánea y semanalmente 4x. Una semana después de la última inmunización, se sangró para determinar el título de anticuerpos.

Las inmunizaciones subsecuentes se realizaron cada 15 días durante cuatro ocasiones y posteriormente cada mes.

a) Descomplementación: Una vez obtenida la sangre, se dejó coagular a temperatura ambiente para la obtención de suero; fué descomplementado a 56°C durante 30 minutos.

b) Absorción del suero. Una vez descomplementado, fue absorbido con eritrocitos de carnero y de rata a 4°C durante toda la noche. Una vez finalizado este período, se centrifugó y se eliminó el sedimento. Posteriormente, se absorbió con suero normal de rata en proporción 1:1 inicialmente a 37°C durante 30 minutos y posteriormente a 4°C durante 72 horas.

Una parte del suero fué absorbida con homogenados de riñón, bazo y corazón en proporción de un volumen de homogenado por 5 volúmenes de suero. Inicialmente se incubaron a 37°C durante 30 minutos y posteriormente a 4°C durante 72 horas. Finalizadas estas absorciones se centrifugó el antisuero y se eliminó el sedimento.

La detección de anticuerpos se llevó a cabo mediante la técnica de fijación de complemento.

c) Fijación de complemento, se llevó a cabo en tres pasos:

1) Detección del complemento. El complemento es un sistema complejo de protefmas séricas, las cuales están presentes en el suero normal en forma inactiva. Cuando el primer componente es activado en combinación con un complejo inmune, esto es capaz de activar una gran cantidad de moléculas del siguiente componente.

La activación de los complejos va de C_1 - C_9 , como una cascada amplificada, hasta que la membrana sobre la que se encuentra el complejo es lisada.

Esta prueba puede ser usada como una prueba cruda escrutadora de la actividad del complemento en el suero o bien, como una prueba de la formación de complejos inmunes.

De manera clásica la prueba de complemento emplea eritrocitos de carnero, anticuerpos de conejo para los eritrocitos de carnero y el suero fresco de cobayo como fuente de complemento.

La hemólisis se mide espectrofotométricamente como la absorbancia de la hemoglobina liberada y puede relacionarse de manera directa con el número de eritrocitos lisados. La lisis en un sistema estandarizado describe una curva sigmoidea, pero en la región intermedia, cerca del 50% de hemólisis existe una relación casi lineal entre el grado de hemólisis y la cantidad de complemento presente. La medición

de la actividad hemolítica total del suero es tomada en el nivel de 50% de hemólisis (CH_{50}).

La cantidad de CH_{50} es una unidad arbitraria que se define como la cantidad de complemento necesaria para la lisis de 50% de los eritrocitos en las condiciones estándar de sensibilización de los eritrocitos con el anticuerpo.

2) Estandarización de los eritrocitos. Se lavaron eritrocitos de carnero en solución amortiguadora de veronal (SAV) durante tres ocasiones a 1,500 rpm durante 5 minutos. Al finalizar el último lavado se tomó del paquete de eritrocitos 1 ml y se llevó a 30 ml con SAV. La suspensión se ajustó con el espectrofotómetro a una densidad óptica de 0,6 a 560 nm usando como testigo blanco, agua destilada. Lecturas de 0.6 ± 0.01 en la escala de densidad óptica (DO) fueron aceptables. Para corregir las lecturas de DO hay que añadir o remover SAV. El volumen final requerido de la suspensión puede ser determinado por la siguiente relación:

$$V \text{ final} = \frac{(V \text{ inicial}) (DO)}{0.6}$$

3) Determinación de complemento. Al mismo tiempo de estandarización de los eritrocitos, se preparó una dilución de hemolisina (Difco) 1:2,000 en SAV. Se toman cantidades iguales de hemolisina/SAV y de la suspensión estandarizada de eritrocitos de carnero. Se dejaron incubar a 37°C durante 10 minutos.

Como fuente de complemento se usó suero de cobayo el cual se almacenó hasta su uso a -70°C .

Se prepararon tubos de 13x75mm con diluciones de complemento iniciando con una dilución de 1:30, se usó como diluyente SAV frfo. Todas estas reacciones se llevaron a cabo a 4°C .

Una vez finalizado el período de incubación de los eritrocitos con la hemolisina (sistema hemolítico SH), se añadieron 1.2 ml de este SH a las diferentes diluciones del complemento dejándose en incubación a 37°C en baño maría durante 30 minutos.

Al finalizar este período de incubación se le agregó a cada tubo 1 ml de SAV frfo. Se centrifugaron los tubos durante 5 minutos y se leyó el sobrenadante en el espectrofotómetro a 560 nm. Los resultados son determinados porcentualmente teniendo como 100% de hemólisis total a los eritrocitos de carnero incubados de la misma manera, pero finalizando la incubación añadiendo 1 ml de agua destilada.

Los resultados fueron expresados en gráficas porcentuales.

4) Fijación de complemento. Un anticuerpo, antígeno o un complejo antígeno-anticuerpo puede ser detectado por la estimación del consumo de complemento o fijación. La prueba depende de un sistema de reacción en dos etapas: En la eta-

pa inicial inicial, un antígeno soluble y un anticuerpo reaccionan en presencia de una cantidad conocida de complemento y una parte es consumida. En la segunda etapa, la magnitud de la actividad remanente del complemento después de la reacción inicial con el complejo antígeno-anticuerpo, es titulada en el análisis hemolítico. Los resultados se expresan como la dilución mas alta del suero que muestra fijación para la estimación del anticuerpo o por la concentración del antígeno.

Para definir esta técnica se toma la CH_{50} como la cantidad mínima de complemento requerida para lisar todo el volumen estándar de células rojas sensibilizadas y se tiene un indicio del consumo de complemento.

Para determinar la fijación de complemento en hepatocitos homogenizados, el antisuero producido contra ellos; se usaron cuatro diluciones 50% hemolíticas de complemento y el sistema hemolítico determinado anteriormente.

Se prepararon tubos con diluciones constantes del antígeno y variables del antisuero y viceversa de acuerdo al cuadro 1.

Diluciones del Ag	1/5 1 /160	Controles
Diluciones del Ab ↓ 1/5		Ag 1/5 SAV C' C-1
1/10		Ab 1/5 SAV C' C-2
1/20		S(-) Ag 1/5 C' C-3
1/40		SAV C' C-4
1/80		SAV C-5

Cuadro 1. Determinación de las concentraciones adecuadas de antígeno (hepatocitos) y anticuerpo (anti-hepatocitos de rata hecho en conejo) para la fijación de complemento.

Estas preparaciones se incuban a 37°C durante 30 minutos en baño maría en presencia de complemento. Al finalizar la incubación, se pusieron en contacto con el SH y se dejaron incubando nuevamente a 37°C durante 30 minutos en baño maría. Se determinó el porcentaje de hemólisis y se dispusieron gráficamente contra la dilución.

Se usó agar a 2% en amortiguador de barbital. Se colocó el agar en el amortiguador y se puso a calentar en baño maría hasta su disolución. Posteriormente, se colocaron -

3 ml de esta solución en un portaobjetos y se dejó solidificar. Para usarse, se realizaron orificios de acuerdo al patrón requerido, colocándose en el orificio central el antisuero anti-hepatocitos de rata absorbido y sin absorber con suero normal de rata y en los orificios periféricos como antígenos la fracción soluble de hepatocitos de rata, - glóbulos rojos de rata y de carnero, suero normal de rata y las fracciones solubles de riñón, bazo y corazón de rata. Se colocó el portaobjetos en cámara húmeda y se dejó incubando toda la noche a temperatura ambiente. El patrón de bandas obtenido se revisó al día siguiente secando la placa y tiñéndola con colorante para proteínas: azul de Coomasie. (70-72).

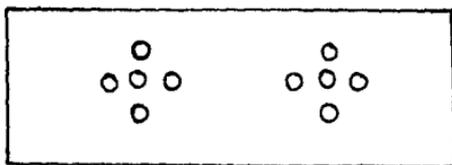


Figura 1. Patrón requerido para inmunodifusión (Ouchterlony)
e) Inmunolectroforesis.

Se requiere de agar al 2% en amortiguador de barbital y colocarlo sobre un portaobjetos. Se practicaron orificios de acuerdo a la figura 2, aplicando en cada orificio la fracción soluble de hepatocitos de rata, glóbulos rojos de rata y de carnero y suero normal de rata, aplicando al mismo tiempo azul de bromofenol.

Se llenó el tanque del aparato de electroforesis con amortiguador de barbital. Posteriormente, se colocó en este aparato el portaobjetos preparado poniendo en contacto el portaobjetos con el amortiguador del tanque mediante papel filtro. Se aplicó corriente al aparato a una intensidad de 8 mAmp por placa.

Cuando el colorante que se aplicó en los orificios llegó al final de la placa, se detuvo el aparato, se sacó la placa y posteriormente, se quitó el gel del canal central y se colocó el antisuero anti-hepatocitos de rata absorbido con suero normal de rata. Se colocó la placa en cámara húmeda durante toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se secó y se tiñó de la misma manera que la técnica anterior.

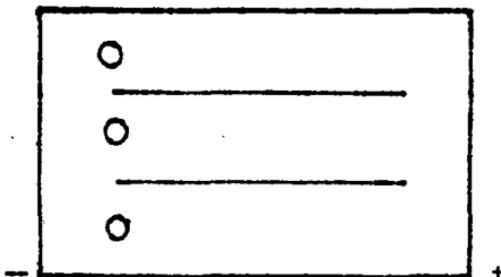


Figura 2. Patrón empleado para inmunoelectroforesis y colocación de electrodos.

f) Contrainmunelectroforesis.

Se prepararon portaobjetos con agar al 2%. Al solidificarse el gel, se realizaron los orificios de acuerdo

a la figura tres, colocando posteriormente en la región anódica el antisuero anti-hepatocitos de rata absorbido con suero normal de rata y en la región catódica los mismos antígenos que se usaron para la doble inmunodifusión tipo Ouchterlony.

Se colocó la placa en el tanque de electroforesis de la misma manera que la técnica descrita anteriormente (70-72).

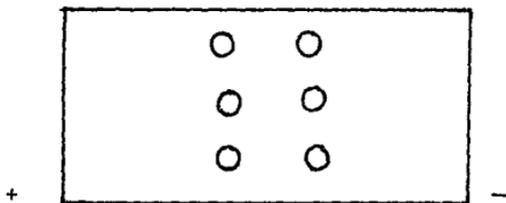


Figura 3. Patrón empleado para la contraimmunoelectroforesis y colocación de los electrodos.

g) Inmunoelectroforesis bidimensional.

Se preparó la agarosa a 2% en amortiguador de barbital colocando 3 ml en un portaobjetos. Se dejó solidificar y se perforó la placa de la misma manera que para la electroforesis, aplicando en el pocillo fracción soluble de hepatocitos de rata y colorante azul de bromofenol. Inmediatamente después se corrió la electroforesis a 150 volts durante 2 a 3 horas. Al finalizar el corrimiento se retiró la placa del aparato y se retiró el gel de la placa cuidadosamente colocándolo en otra placa de 8 x 10 cms en uno

de sus extremos (figura 4). Posteriormente, se colocaron en el resto de la placa 8-10 ml de agar a los que se les agregó 1 ml de antisuero anti-hepatocitos de rata y se calentó el agar hasta 56°C. Ya caliente el agar, se colocó sobre el resto de la placa y se dejó solidificar. Posteriormente, se colocó en el aparato de electroforesis y se corrió a 40-50 volts durante toda la noche. Al finalizar el corrimiento, se retiró la placa del aparato de electroforesis, se secó y tiñó de acuerdo a la técnica descrita anteriormente (70-72).

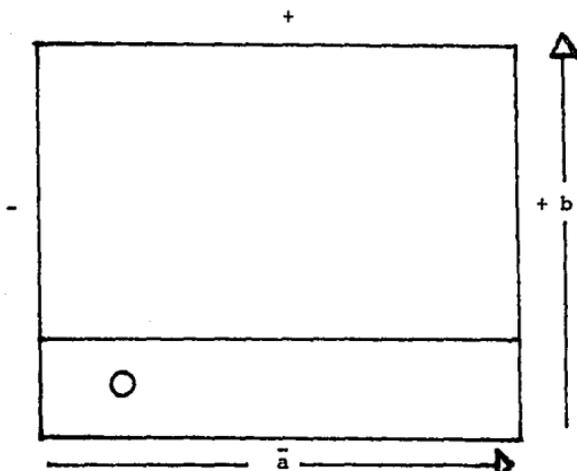


Figura 4. Patrón de corrimiento de la inmunoelectroforesis bidimensional. a) Primera fase del corrimiento y colocación de los electrodos. b) Segunda fase y colocación de los electrodos.

c) PRODUCCION DE LESION HEPATICA EN RATAS Y CINETICA DE LIBERACION DE ANTIGENOS HEPATICOS A LA CIRCULACION.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Long/Evans de -

200-300 grs de peso. Para la intoxicación de las ratas se utilizó como agente hepatotóxico tetracloruro de carbono (CCl_4), el cual se preparó en una suspensión con 0.6 ml de aceite de olivo y 0.3 ml de CCl_4 aplicándose una sola dosis por vía intraperitoneal dividiendo a las ratas en los siguientes grupos:

- a) 6 ratas con 1 hora postintoxicación
- b) 6 ratas con 2 hora postintoxicación
- c) 6 ratas con 3 horas postintoxicación
- d) 6 ratas con 4 horas postintoxicación
- e) 6 ratas con 5 horas postintoxicación
- f) 6 ratas con 6 horas postintoxicación
- g) 6 ratas con 12 horas postintoxicación
- h) 7 ratas con 24 horas postintoxicación

Al terminar el período correspondiente a cada grupo, las ratas fueron sangradas a blanco por la arteria aorta abdominal, retirando al mismo tiempo el hígado para estudios histológicos.

La lesión hepática fué estudiada por:

- a) Fijación de complemento.

Una vez determinada la dosis hemolítica mínima de complemento, estandarizados los glóbulos rojos de carnero sensibilizados y encontrada la concentración adecuada de anti-suero anti-hepatocitos de rata capaces de inducir la mayor fijación de complemento, se inició la determinación de an-

tígenos circulante en el suero de ratas intoxicadas con CCl_4 , empleando diluciones del suero de rata intoxicada iniciando con 1:5. Una vez hechas las diluciones del suero de rata intoxicada, y poniendo en contacto con el antisuero anti-hepatocitos de rata y complemento, se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Una vez finalizada la incubación se les agregó el SH. Se incubaron a 37°C durante 30 minutos, se revisó la placa de microhemaglutinación y se determinó el título obtenido por el botón de eritrocitos o bien por la hemólisis encontrada en el sobrenadante. Las diluciones y los controles de esta prueba, se muestran en la tabla 2.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	C
1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:5	1
										2
										3

REACTIVOS	POZOS 1-9	10	INCUBACION
SRIx	25 ul	25 ul	30 minutos en baño maría a 37°C .
SCI	25 ul	-----	
C'	25 ul	25 ul	
SAV	-----	25 ul	45 minutos en baño maría a 37°C .
SH	50 ul	50 ul	

CONTROLES						
	SCI	S -	HR	C'	SH	SAV
1	-----	-----	25 ul	25 ul	50 ul	25 ul
2	-----	-----	-----	25 ul	50 ul	50 ul
3	-----	-----	-----	-----	50 ul	75 ul
4	25 ul	-----	25 ul	25 ul	50 ul	-----
5	-----	25 ul	25 ul	25 ul	50 ul	-----
6	25 ul	-----	-----	25 ul	50 ul	25 ul
7	-----	25 ul	-----	25 ul	50 ul	25 ul

Tabla 2. SRIx. Suero de rata intoxicada. SCI. Anticuerpos - antihepatocitos de rata. C' Complemento. S-Suero negativo.

b) Doble inmunodifusión de tipo Ouchterlony.

Con la misma técnica descrita anteriormente utilizando como antígenos los sueros de rata intoxicada con CCl_4 .

c) Contrainmunolectroforesis.

De la misma manera que la descrita anteriormente, usando como antígenos los sueros de rata intoxicada con CCl_4 .

d) Electroforesis bidimensional.

De la misma manera que la descrita anteriormente usando en la primera dimensión el suero de rata intoxicada con CCl_4 y en la segunda dimensión el suero anti-hepatocitos de rata hecho en conejo incluido en el gel.

e) Histológicos.

RESULTADOS

El homogenado del hígado obtenido de acuerdo a lo descrito en material y métodos, reveló al examen microscópico escasos detritus celulares y células aisladas de las cuales 95-98% no se tiñeron con el colorante azul de Tripán.

La contaminación fué de escasos eritrocitos y el rendimiento fué de 5'000,000 células/ml aproximadamente (foto 2).

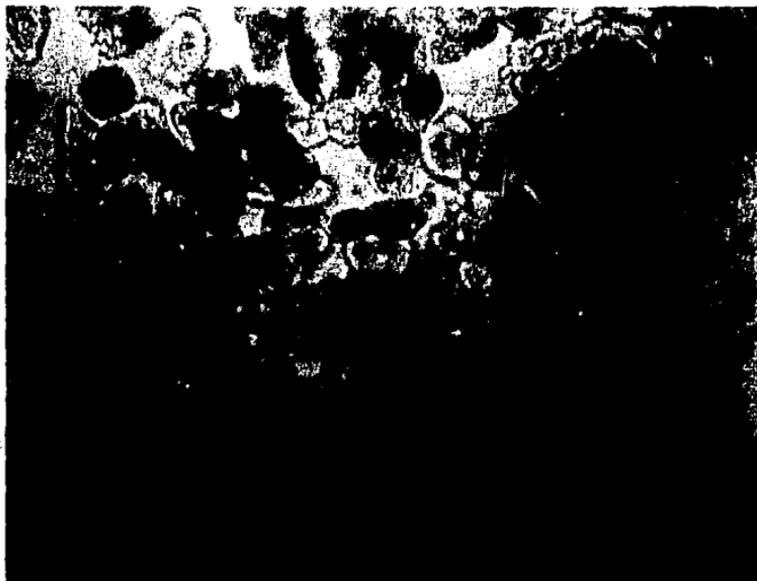


Foto 2. Suspensión de hepatocitos de rata cultivados y
teñidos con la técnica de azul de Tripán (x800)

La cantidad total de proteínas provenientes de los hepatocitos obtenidos por sonicación y determinadas por el método de Lowry, fue de 8 mg/ml de suspensión.

El suero de conejo anti-hepatocitos de rata tuvo un título por fijación de complemento de 1:400,000.

Para demostrar la antigenicidad de la fracción soluble de hepatocitos de rata con el suero de conejo anti-hepatocitos, con y sin absorción con suero normal de rata, se emplearon las siguientes técnicas:

a) Doble inmunodifusión radial.

Como se puede observar en la foto 3, el suero sin absorber reaccionó tanto, con los antígenos derivados de otros órganos del mismo animal, como con glóbulos rojos de carnero.

Cuando el antisuero fue absorbido con suero normal de rata desaparecen las bandas de precipitación heterólogas, quedando únicamente visibles aquellas que reaccionan con su antígeno homólogo.

b) Inmunolectroforesis.

En la foto 4 se observa que el antígeno absorbido reacciona sólo con su antígeno homólogo (a,e) en la región cercana al origen en la fracción anódica lenta.

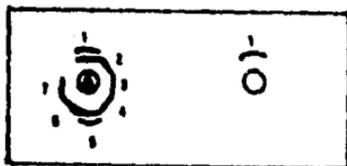
c) Contraelectroforesis.

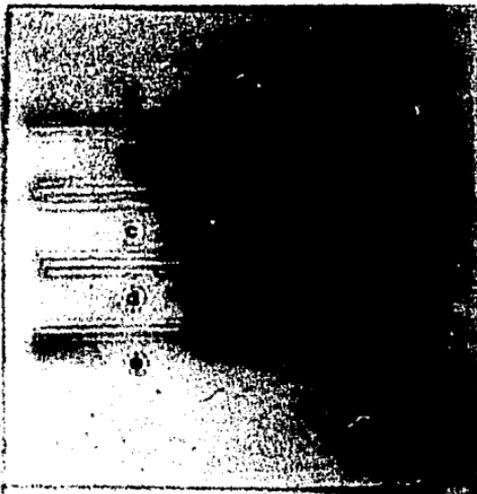
Por esta técnica en la foto 5 de nuevo se observa que el antisuero absorbido forma una banda de precipitación con



- 1) Fracción Soluble de hepatocitos de rata.
 - 2) Suero normal de rata
 - 3) Glóbulos rojos de rata
 - 4) Glóbulos rojos de conejo
 - 5) Fracción soluble de riñón de rata
 - 6) Fracción soluble de bazo de rata
 - 7) Fracción soluble de corazón de rata
- A. Suero de conejo anti-fracción soluble de hepatocitos de rata
- B. Suero de conejo anti-fracción soluble de hepatocitos de rata adsorbido con SMR

Foto 3. Doble inmunodifusión tipo Ouchterlony





a.- Fracción soluble de hepatocitos
de rata.

b.- Suero normal de rata

c.- Glóbulos rojos de rata

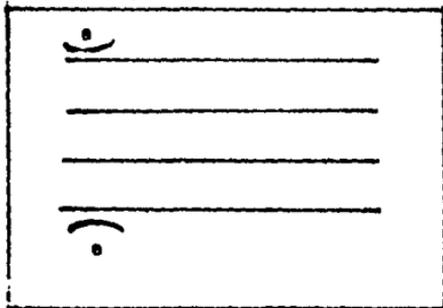
d.- Glóbulos rojos de rata

e.- Fracción soluble de rata

A.- Suero de rata

B.- Suero de rata

Foto 4. Inmunoelectroforesis.





1. Fracción Soluble de hepatocitos de rata.

2. Suero Normal de Rata

3. Glóbulos rojos de rata

4. Glóbulos rojos de carnero

5. Fracción soluble de riñón de rata

6. Fracción soluble de hígado de rata

7. Fracción soluble de esplenio de rata

8. Solución Salina

9. Suero de conejo

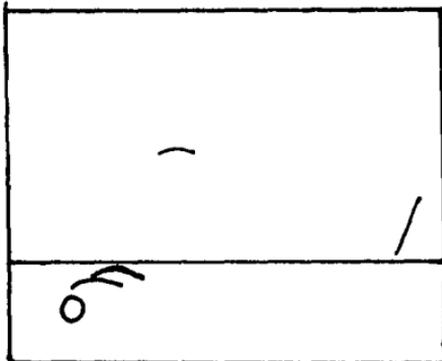
10. Suero de conejo

Doro 5. Contraimmunoelectroforesis.





Foto 6. Inmunelectroforesis bidimensional.



su antígeno homólogo (a).

d) Inmunolectroforesis bidimensional.

En la foto 6, se observa algo muy parecido a lo encontrado en la inmunolectroforesis simple: bandas de precipitación en la fracción anódica lenta. Sin embargo, la fracción soluble de hepatocitos de rata está contaminada con otros elementos séricos de rata normal, pues la región en la que corre la albúmina, así como en la región de las gammas, se observan arcos de precipitación.

Una vez demostrada por precipitación en gel, de la presencia de dos antígenos hepato-específicos en la fracción soluble de hepatocitos, se estudió el comportamiento de estos antígenos en forma seriada en el suero de ratas a las que se les produjo lesión hepática por CCl_4 .

En la foto 6, se aprecia por doble inmunodifusión de tipo Ouchterlony que, en todos los tiempos estudiados posteriores a la intoxicación con el suero de conejo anti-hepatocitos de rata, hay bandas de precipitación. Una vez absorbido el suero, las bandas de precipitación sólo se aprecian a las 12 y 24 horas.

Por contraelectroforesis (foto 7) sólo es reconocido antígeno libre derivado de hepatocitos en el suero

de ratas intoxicadas a las 24 horas.

En la foto 8, se observa la inmunoelectroforesis bidimensional y los antígenos derivados de hígados de ratas intoxicadas por CCl_4 , de nuevo aparecen en la fracción anódica lenta sólo a las 24 horas; además, de nuevo se observan arcos de precipitación correspondientes al corrimiento de las gammas sin serlo, pues por su forma, parece ser que la albúmina no migra y se quedó en el origen.

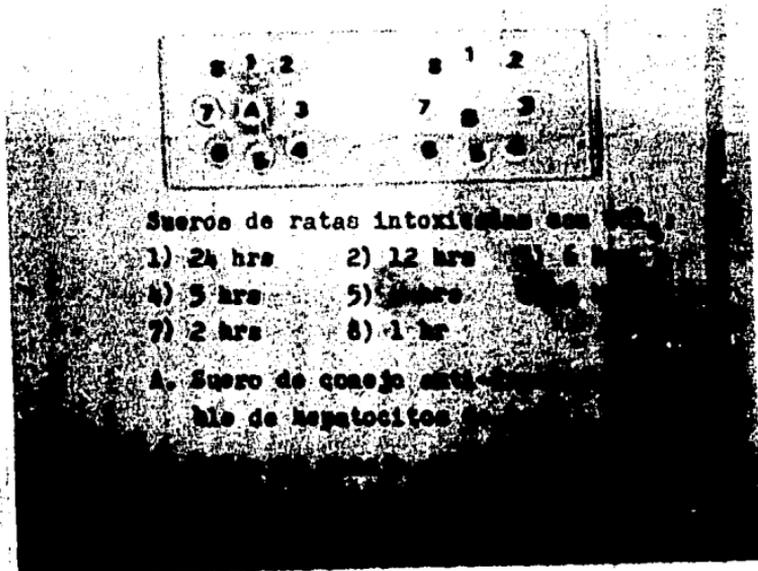
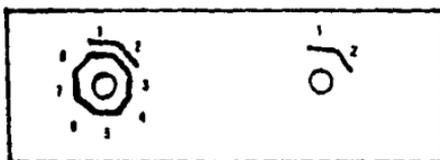


Foto 6. Doble inmunodifusión de tipo Ouchterlony.



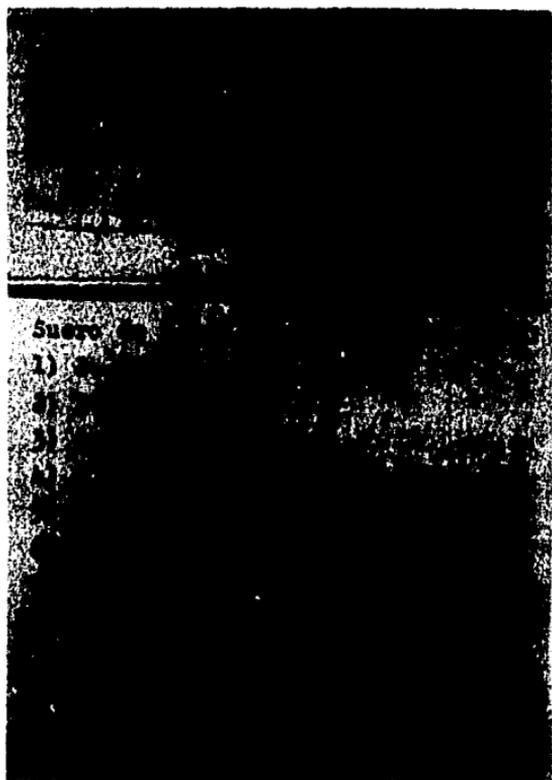


Foto 7. Contrainmunolectroforesis.

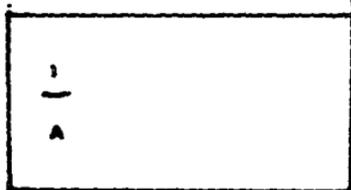
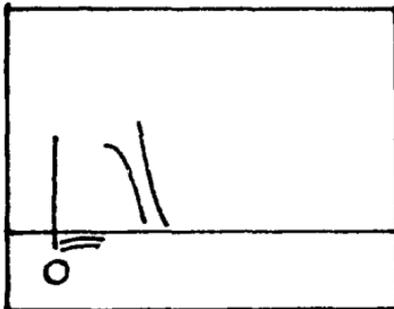
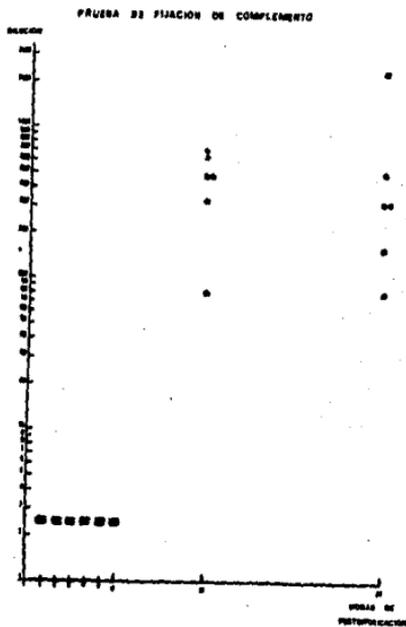




Foto 8.- Immunoelectroforesis bidimensional



En la foto 9 podemos apreciar la gráfica que nos demuestra que la fijación de complemento detecta antígenos hepáticos circulantes desde las 12 horas posteriores al inicio de la lesión hepática.



Los resultados histológicos nos demuestran que:

- 1) Los hígados de rata durante las primeras seis horas postintoxicación, no demuestran cambios apreciables a la microscopía de luz.
- 2) Los hígados de rata, 12 horas posteriores a la intoxicación demuestran lesiones pericapsulares con infiltración de polimorfonucleares (a) y colapso de algunas áreas del parénquima hepático. Hay cambios degenerativos periféricos consistentes en hinchazón celular, en algunas fotos se encuentran zonas de necrosis (b). (foto 10).



Foto 10. Demuestra la infiltración por polimorfonucleares (a) e hinchazón celular, (b) y necrosis (c) (10x).

3) Los hígados de rata, 24 horas posteriores a la intoxicación, demuestran que la estructura general del hígado, se encuentra conservada y en algunos sitios profusamente infiltrada por polimorfonucleares. En el parenquima hepático, el hepatocito se encuentra aumentado de tamaño y de cuando en cuando aparecen grupos de hepatocitos hinchados de citoplasma claro y núcleo prominente. (2). Llama la atención la existencia de áreas cartográficas de distribución irregular en las cuales hay pérdida total de la estructura y sustitución de los hepatocitos por un material amorfo y necrosis fibrinoide. (foto 11).

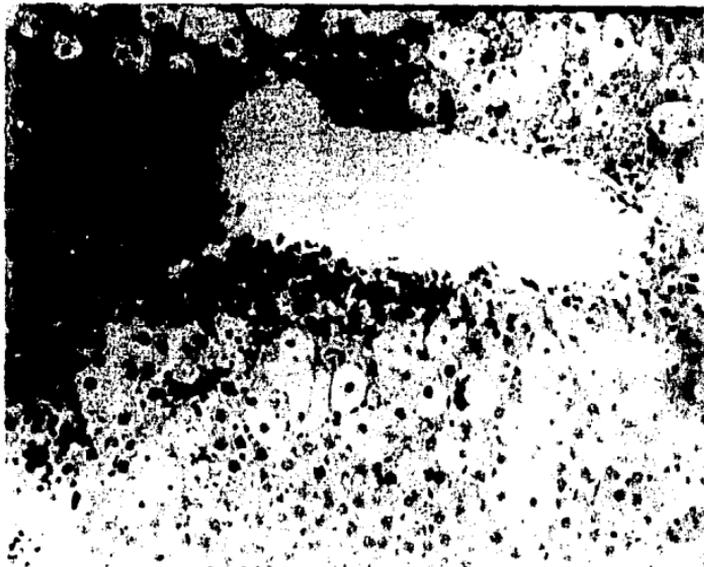


Foto 11. Hígado de rata, 24 horas posteriores a la intoxicación demuestra infiltración de polimorfonucleares (1) e hinchazón celular (2) (40x).

DISCUSION

Cuando existe daño hepático hay salida al torrente circulatorio de material hepato-específico. De este, sólo los antígenos de membrana externa han sido estudiados con el fin de entender la fisiopatología de algunas entidades nosológicas que pudieran implicar una respuesta del tipo autoinmune (13-20).

Los antígenos circulantes sólo se han empleado en una ocasión como una prueba inmunológica para el diagnóstico temprano de lesión hepática (6).

El diagnóstico de hepatopatías es relativamente sencillo cuando se establece el cuadro clínico; sin embargo, un porcentaje ocurre en forma asintomática. Las pruebas de laboratorio empleadas para el diagnóstico (8,9) son relativamente fáciles de realizar y se aplican de rutina, pero no son específicas. El hecho de que aumenten en circulación ciertas enzimas durante un cuadro de lesión hepática, no significa necesariamente especificidad, ya que las mismas enzimas son compartidas por otros órganos y tejidos. La determinación de enzimas específicas de hígado como la arginasa y algunas esterasas son difíciles de efectuar porque requieren de material y tecnología complicados, así como de personal calificado. Por otro lado, la prueba de retención de bromosulfaleína que es específica para el fun-

cionamiento hepático, cuando se realiza la enfermedad ya está diagnosticada clínicamente.

Por los antecedentes descritos previamente; se decidió explorar, en forma experimental, por medio de la intoxicación de ratas con tetracloruro de carbono, la cinética de salida a la circulación de antígenos hepato-específicos, por medio de pruebas inmunológicas que demuestren la presencia de los mismos en el suero. De acuerdo a nuestros resultados, las mejores pruebas fueron la inmunoelectroforesis bidimensional y la fijación de complemento.

Para mantener la integridad del hepatocito durante la perfusión del hígado fue necesario diseñar una bomba peristáltica sencilla y fácil de manejar. Este objetivo se logró gracias a la ayuda del Servicio de Cirugía Experimental de la Unidad de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional; sin embargo, no fue posible, a pesar del cuidado que se tuvo en la perfusión, obtener hepatocitos libres de contaminación de proteínas del suero. Esto se comprobó, ya que el suero de conejo anti-hepatocitos de rata antes de ser absorbido con el suero de rata - demostró antígenos no propios de hígado.

Por otro lado, la absorción reveló que en el antisuero quedaron solamente anticuerpos dirigidos contra determinantes antigénicos hepáticos.

La presencia de determinantes antigénicos que se comparan con otros órganos tales como el riñón, bazo y corazón, ya era conocido y para eliminar del suero anti-hepatocitos, los anticuerpos heterólogos fue necesario absorber éste con los órganos correspondientes. Una vez absorbido, no perdió su actividad antigénica homóloga.

En las ratas intoxicadas con tetracloruro de carbono se demostró la presencia de antígenos hepato-específicos hasta las doce horas posteriores a la intoxicación.

Creemos que sería posible detectar la salida de determinantes antigénicos en etapas más tempranas con técnicas más sencillas tales como la inhibición de la hemaglutinación; sin embargo, con esta técnica tenemos el inconveniente que al usar antígenos particulados de falsos positivos, por lo que se decidió en este trabajo emplear la fijación de complemento, la cual dió buenos resultados.

La inmunoelectroforesis bidimensional fue la mejor, ya que demostró, sin lugar a dudas, la presencia de antígenos hepato-específicos.

Los datos obtenidos, demuestran que sí es posible detectar en circulación antígenos hepato-específicos en ratas con daño hepático, desde etapas tempranas del mismo; sin embargo, todavía se necesita una mayor purificación y localización precisa de tal antígeno.

Cabe mencionar que en este trabajo se ha establecido una prueba inmunológica sencilla y al alcance de cualquier laboratorio de rutina capaz de determinar, en forma temprana, el diagnóstico de hepatopatías que eliminan a la circulación antígenos hepáticos.

CONCLUSIONES.

- 1.- Es posible demostrar la presencia de un antígeno hepático mediante técnicas inmunológicas.
- 2.- Este antígeno es hepato-específico.
- 3.- Es posible detectar este antígeno en el suero circulante de ratas con daño hepático inducido experimentalmente.
- 4.- Las técnicas empleadas son capaces de detectar el daño desde las doce horas después de su inicio.
- 5.- Esta técnica puede ser un instrumento para el estudio de pacientes con daño hepático.

BIBLIOGRAFIA

1. Mclean A, Judah J. Cellular necrosis in the liver induced and modified by drugs. Int. Rev. Exp. Path. 4:128, 1965.
2. Kumate J. Lesión hepática experimental. Metabolismo del escape enzimático de arginasa, catalasa y esterasas en la intoxicación por tetracloruro de carbono y radiaciones ionizantes en distintos animales. Gac. Méd. (Méx.); 89:769, 1959.
3. Kumate J, Benavides L, Flores M.A. Lesión hepática experimental. Actividad esterásica en suero e hígado de animales intoxicados con CCl_4 . Bol.Med.Hosp.Infant. (Méx.), 17:319, 1960.
4. Dumonde D. Tissue-Specific antigens. Advances in Immunology. 5:285,1960.
5. Hirayama C, Toda T. Hepatic antigen in sera from patients with liver disease. Nature. 212:1061,1966.
6. Espinoza E, Insunza I. Hepatic antigens in the blood of rats with liver damage. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 111:174, 1962.
7. Grabar P. Williams C. Biochim Biophys Acta. 17:67,1955.
8. Isselbacher K, Tisdale W. Procedimientos diagnósticos en las enfermedades del hígado en Medicina Interna de

- Harrison. La Prensa Médica Mexicana. México, 4 Ed.; 1708, Cap.324, 1978.
9. Spiro H. Liver function studies in Clinical Gastroenterology. MacMillan Publishing Co. New York NY. 2 Ed. Ch 53:1090, 1977.
 10. Santamaría P, Chordi A, Ortiz de Lanzaduri E. Immunoelectrophoresis of human liver proteins. Path. Europ. 2:427, 1967.
 11. Arcos J.M., Alvarez Moreno C, Chordi A, Vázquez J, Macarulla J, Santiago E. Análisis antigénico de fracciones subcelulares hepáticas. Revista española de fisiología. 23:267, 1967.
 12. McFarlane I, Wojcicka B, Zucker G, Eddleston A, Williams R. Purification and characterization of human liver specific membrana lipoprotein (LSP). Clin.Exp.Immunol. 27:381, 1977.
 13. Miller J, Smith M, Mitchell C, Reed W, Eddleston A, Williams R. Cell mediated immunity to a human liver-specific antigen in patients with active chronic hepatitis and primary biliary cirrosis. The lancet. 12: 296, 1972.
 14. Manns M, Meyer zum Buschenfelde K, Hess G. Autoantibodies against liver-specific membrane lipoprotein in acute and chronic liver diseases: studies on organ, species and disease specificity. Gut;21:955, 1980.

15. Thomas H, Path M, Lok A. The immunopathology of autoimmune and hepatitis B virus-induced chronic hepatitis. *Seminars in Liver Disease*. 4:1, 1984.
16. Wolfrom C. Frommel D. Clinical relevance of liver membrane antibody in chronic liver disease of children. *Clin. Immunol. Immunopath.* 26:184, 1983.
17. Espinoza E. Circulating tissue antigens. II Studies on an organ-specific antigens of human liver. *Lab. Invest.* 29:556, 1973.
18. Edyngton T. Immune responses and liver disease, perhaps, but what about target organ defenses. *Hepat-ology*. 3:767, 1983.
19. Kakumi S, Arakawa Y, Goji H, Kashio T, Yata K. Occurrence and significance of antibody to liver-specific membrane lipoprotein by double antibody immunoprecipitation methods in sera of patients with acute and chronic liver diseases. *Gastroenterology* 76:665, 1979.
20. Kronburg I, Frazer I, Mackay I. Autoantibodies to liver antigens in chronic liver disease. I. A radioimmunoassay for antibody to liver membrane antigen. *J. Clin. Lab. Immunol.* 9:207, 1982.
21. Rizzeto M, Sware G, Doniach D. Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders. *Clin. Exp. Immunol.* 15:331, 1973.

22. Rizzeto M, Bianchi F, Doniach D. Characterization of the microsomal antigen related to a subclass of active chronic hepatitis. *J. Immunol.* 26:589, 1974.
23. Perlmann P, D'Amelio V. Soluble antigens in microsomes and other cell fractions of rat liver. *Nature* 181: 491, 1958.
24. Smith M, Williams R, Walker G. Hepatic disorders associated with liver/kidney microsomal antibodies. *Br.Med. J.* 2:80, 1974.
25. Gerber M, Shapiro J, Smith H. Antibodies to ribosomes in chronic active hepatitis. *Gastroenterology.* 76: 139, 1979.
26. Gerber M, Thung S. Ultrastructural localization of mitochondrial and ribosomal antigens by peroxidase labelled human antibodies. *Lab. Invest.* 39:101, 1978.
27. Swana G.T. Swana M, Bottazzo G, Doniach D. A human specific mitochondrial antibody. Its importance in the identification of organ-specific reactions. *Clin. Exp.Immunol.* 28:517, 1977.
28. Auer I, Milgram F, Studies on thermostable liver-specific antigens. *Int.Arch.Allergy* 42:87, 1972.
29. D'Amelio V, Perlmann P. The distribution of soluble antigens in cellular structures of rat liver. *Exp. Cell. Res.* 19:383, 1960.

30. Espinoza E. Circulating tissue antigens III identification and characterization of antigens of limited and of wide body distribution in human gallbladder bile. Presence in serum of patients with hepatitis. Clin.Exp.Immunol. 25:410, 1976.
31. Fravi G, Lindenmann J. Induction by allogenic extracts of liver-specific precipitating autoantibodies in the mouse. Nature. 218:141, 1968.
32. Smith J, Iverson G. Occurrence of liver-specific antigen in adult human serum. Clin.Exp.Immunol. 13:209, 1973.
33. Smith J, Baker L. α_1 -fetoprotein and liver-specific antigen in viral hepatitis type B. Arch. Intern.Med. 133:437, 1974.
34. Mihas A, Hirschowitz B, Saccomani G. Purification and characterization of a liver-specific antigen. J. Immunol. 116:1228, 1976.
35. Sugamura K, Smith J. Purification and characterization of human liver-specific F antigen. Clin.Exp.Immunol. 26:28, 1976.
36. Arakawa Y, Bull D, Schott Ch, Davidson Ch. F-Antigen, Nature, liver-specificity and release in experimental liver injury. Gastroenterology 71:118, 1976.

37. Mihas A, Saccomani G, Tomana M, Spenny D. Isolation and characterization of liver-specific antigen (F-Ag) from human liver. *Immunochemistry*. 14:727, 1977.
38. Mori Y, Iesato K, Ueda S, Wakashin Y, Wakashin M, Okuda K. Purification and immunological characterization of human-specific F-antigen *Clinica. Chimica. Acta* 112: 425, 1981.
39. Meyer zum Buschenfelde K, Miescher P. Liver-specific antigens, purification and characterization. *Clin. Exp. Immunol.* 10:89, 1972.
40. Sheffield J, Emmelot P. Studies on plasma membranes. XVI. Tissue specific antigens in the liver cell surface. *Exp. Cell. Res.* 71:97, 1972.
41. Hopf U, Meyer zum Buschenfelde K, Feudenberg J. Liver specific antigens of different species. II Localization of a membrana antigen at cell surface of isolated hepatocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 16:117, 1974.
42. McFarlane I, Wojcicka B, Zucker G, Eddleston W, Williams R. Purification and characterization of human liver-specific membrana lipoprotein (LSP). *Clin. Exp. Immunol.* 27:381, 1977.
43. Beherens U, Paronetto F. Liver-specific and shared cell membrane antigens. Studies by light and electron microscopy. *Immunology* 35:289, 1978.

44. McFarlane I, Wojcicka B, Williams R. Antigens of the human liver. *Clin. Exp. Immunol.* 40:1, 1980.
45. Lebwohl N, Gerber M. Characterization and demonstration of human liver-specific protein (LSP) and apo-LSP. *Clin Exp. Immunol.* 46:435, 1981.
46. Gerber M, Lebwohl N, Thung S. Liver-specific Protein. How specific is it? in *Frontiers in Liver Disease*. Ed. Berk and Chalmers. Chap. 12:139, 1982.
47. Chisari F.V. Liver-specific Protein in perspective. *Gastroenterology* 78:168, 1980.
48. Dienstag J, Isselbacher K. Liver-specific protein: more question than answers. *New. Engl. J. Med.* 299:40, 1978.
49. Beherens U, Paronetto F. Studies on "liver-specific antigens". I. Evaluation of the liver specificity of LSP and LP-2. *Gastroenterology.* 77:1045, 1979.
50. Poralla T, Dienes H, Dippold W, Manns M, Meyer zum Buschenfelde K. A monoclonal antibody direct against an organ-specific liver-cell-membrane antigen in rabbits. *Hepatology.* 3:5, 1983.
51. Manns S, Meyer zum Buschenfelde K, Hutteroth T, Hess G. The liver specific protein; evidence for species specific and non-specific determinants. *J. Clin. Lab. Immunol.* 3:9, 1980
52. Vierling J, Hammond D. Specificity of antibodies reacting with human Liver-specific protein (LSP) *Hepatology* 381, 1977.

53. Feighery C. How specific is liver-specific protein?
Gastroenterology 79:179, 1980.
54. Howard R, Christensen G, Pesch L. The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver J.Cell. Biol. 35:675, 1967.
55. Berry M.N., Friend D.S. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. J.Cell.Biol. 43:506, 1969.
56. Seglen P.O. Preparation of rat liver cells. III Enzymatic requirements for tissue dispersion. Exp. Cell. Res. 82:391, 1973.
57. Wagle S.R. Critical evaluation of methods used for the isolation of rat liver hepatocytes for metabolic studies. Life Sciences. 17: 827, 1976.
58. Drochmans P, Wanson J.C. Mosselmans R. Isolation and subfractionation on ficoll gradients of adult rat hepatocytes. J.Cell.Biol. 56:1, 1975.
59. Robbins S. Patología estructural y funcional. Hígado y Vías Biliares. Ed. Interamericana. 962, 1975.
60. Reynolds E. Liver parenchymal cell injury. I. Initial alterations of the cell following poisoning with carbon tetrachloride. J. Cell. Biol. 19:139, 1963.
61. Boisstesselin R. Experimental study of the effects of drugs on the liver. Excerpta Medica Foundation. 7:65, 1966.

62. Reynolds E.S. Fed. Proc. 21:305, 1962.
63. Reid L, Jefferson M, Culturing hepatocytes and other differentiated cells. Hepatology 4:598, 1984.
64. Ham R, McKechnan W. Media and growth requirements. Meth. Enzymol 58:44, 1979.
65. Gebhardt R, Mecke D. Perfused monolayer cultures of rat hepatocytes as an improved in vitro system for studies on urogenesis. Exp. Cell. Res. 124:349, 1979.
66. Lowry O.H. Rosenbrough N, Farr A. Randall R.J. Protein Measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265, 1951.
67. Stites D, Complemento hemolítico y fijación de complemento en inmunología básica y clínica. Cap. II. Pruebas inmunológicas de laboratorio 4 Ed. El Manual Moderno. México, 372, 1983.
68. Hudson L, Hay F.C. Antibody effector systems in practical immunology. Cap. 6. Blackwell Scientific Publication. Philadelphia, Pa. 134, 1976.
69. Sell S. Accessory systems in immunopathologic reactions in immunology, immunopathology and immunity. Cap. 10. Harper and Row Publishers. Hagerstown, Maryland 3 Ed. 186, 1980.
70. Garvey J, Crener N, Sussdorf D. Methods in Immunology 3 Ed. W. Benjamin Inc. 271, 1977.

71. Nakamura R, Dito W, Tucker E. Immunoassays in the clinical laboratory. Laboratory and research. *Methods in Biology and Medicine*. 13:39, 1979.
72. Kabat E. The reagents of immunology detection of antigen-antibody interaction. In *Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry*. Cap. 3. Holt, Rinehart and Winston Inc. New York, 40, 1968.