

2 ej. 84



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



EFFECTO DE LA HCG SOBRE LA VIA ALTERNA DE
ACTIVACION CD2/CD3 EMPLEANDO
ANTICUERPOS MONOCLONALES

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A :
JOSE LUIS GOMEZ RIVERA

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 GENERAL

	Páginas
RESUMEN	i
I INTRODUCCION	1
1.1 ¿Es el embarazo un fenómeno paradójico de la inmunología?	2
1.2 Embarazo y respuesta inmunitaria	6
1.3 Origen de las células T	14
1.4 Marcadores de linfocitos T humanos	15
1.5 Vías de activación de linfocitos T	18
1.6 Consecuencias de las funciones asociadas a CD2/CD3	23
1.7 Objetivo	25
1.8 Hipótesis	25
II MATERIAL Y METODOS	26
III RESULTADOS	31
IV DISCUSION	41
V CONCLUSIONES	48
VI BIBLIOGRAFIA	49
VII APENDICE DE REACTIVOS	54

RESUMEN

Se ha descrito la presencia de moléculas inmunosupresoras en el embarazo temprano (primer trimestre), y en algunos casos se ha establecido su posible mecanismo de acción; en el caso particular de la gonadotropina coriónica humana (HCG), se ha mostrado un efecto dependiente de concentración y en este trabajo, se pretende establecer su posible vía de acción.

En la presente investigación, se estudió la interacción de la HCG con la molécula CD3 de linfocitos T humanos. El efecto fue valorado indirectamente por medio del porcentaje de inhibición de rosetas C.

Mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti-CD3 sobre linfocitos purificados en ficol-hypaque, se logró modular al receptor CD2 induciendo un porcentaje de inhibición de rosetas hasta 58.9 ± 12.7 , cuando los linfocitos fueron previamente tratados con HCG, se logró abatir el efecto, encontrando una diferencia estadísticamente significativa en la disminución del porcentaje de inhibición ($P < 0.001$). Esta disminución, hace suponer que la HCG bloquea la interacción del anticuerpo monoclonal con la molécula CD3.

Para determinar si la HCG interfiere en la unión del anticuerpo monoclonal, se realizó un experimento con perlas de sefarosa, en el cual, se utilizaron linfocitos sin tratar e incubados con HCG, que al incubarse con perlas de sefarosa con

el anticuerpo monoclonal acoplado, demostraron una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$).

Los resultados del presente estudio, sugieren que la HCG compete con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 por la molécula CD3, modulando la molécula CD2 mediante una vía alterna.

I INTRODUCCION

Se puede considerar al embarazo normal como uno de los --
 enigmas mas grandes de la inmunología, debido a que los fetos
 de todas las especies de mamíferos no consanguíneos presentan
 un juego de antígenos paternos extraños a la madre, y aun así
 el producto sobrevive durante el período intrauterino.

Actualmente, no se conocen todos los factores que inter--
 vienen en la protección del feto de un ataque inmunológico por
 parte de la madre. Dentro de los avances logrados en este campo
 po, se han aislado proteínas asociadas al embarazo que presen-
 tan actividad inmunosupresora. Una de estas proteínas, es la
 hormona gonadotropina coriónica humana (HCG), que es secretada
 desde el inicio del embarazo (embrión de preimplantación).

La actividad de la HCG como inmunosupresor, ha iniciado -
 una serie de controversias entre diversos investigadores, de--
 bido principalmente a las diferentes concentraciones de HCG -
 usadas para la inhibición mitógena de linfocitos.

En la presente investigación, se estudia la interacción -
 de la HCG con linfocitos T humanos, específicamente con la --
 molécula CD3 y su posible efecto en la vía alterna CD2/CD3.

1.1 ¿Es el embarazo un fenómeno paradójico de la inmunología?

Aparentemente el embarazo es un fenómeno paradójico de la inmunología reproductiva, debido a que los fetos de los mamíferos heredan antígenos de histocompatibilidad paternos que son diferentes a los de la madre y normalmente no existe un rechazo; sin embargo, la madre rechaza injertos de tejido fetal o del padre en cualquier lugar diferente al sitio de implantación (Rocklin et al., 1979).

Medwar (1954 en Rocklin et al., 1979), propone cinco hipótesis que tratan de explicar como es posible que el feto que puede ser considerado como un aloinjerto para la madre, pueda sobrevivir al período intrauterino sin ser rechazado por ésta, las hipótesis son: a) El feto no es inmunogénico y por lo tanto no provoca la respuesta inmunológica de la madre; b) durante el embarazo se altera la respuesta inmunológica materna; c) el útero es un sitio inmunológicamente privilegiado; d) la placenta es una barrera inmunológica efectiva; y e) El feto no lleva componentes inmunológicos.

Rocklin et al. (1979), analizaron las hipótesis de Medwar sobre las reacciones inmunológicas materno-embrión, y proponen que: El sistema inmunológico materno es "desafiado" con antígenos paternos expuestos por el tejido trofoblástico, y por células fetales a través de la placenta al interior de la circulación sanguínea materna. Lo anterior hace suponer que exis

te un balance sobre la superficie de las células del trofoblasto, en el cual participan anticuerpos específicos contra trofoblasto y aloantígenos embrionarios. Este "balance" se debe a la producción de anticuerpos bloqueadores y/o a células T supresoras; de hecho, los bajos niveles en la densidad del antígeno sobre la superficie celular es bloqueada por efectos de la Inmunoglobulina G (IgG).

El papel de los anticuerpos bloqueadores sugiere un mecanismo para la sobrevivencia fetal, ya que se ha encontrado una asociación entre la presencia de éstos anticuerpos en mujeres multigravidas y su ausencia en mujeres con abortos habituales.

Por otro lado Mendenhall (1976), considera cinco puntos importantes para la sobrevivencia del feto como un homoinjerto para la madre, debido posiblemente a numerosos mecanismos; --

- 1) La organización especial de la interfase fetal-materno; -
- 2) La protección generada de los anticuerpos contra antígenos específicos fetales; 3) Los posibles efectos bloqueadores del complejo antígeno anticuerpo; 4) Una modulación generada por la placenta proteínica, hormonas esteroides y las proteínas asociadas al embarazo sobre la inmunidad celular; y -
- 5) La acción supresora de los linfocitos fetales.

Dentro de las hormonas relacionadas con el embarazo, la gonadotropina coriónica humana (HCG) juega un papel importante para el buen desarrollo del embrión.

La gonadotropina coriónica humana se sintetiza y secreta en el cito y sinciciotrofoblasto. La secreción en el embarazo va a ser caracterizada por una elevación entre la 8^a y 12^a semanas de gestación, posteriormente disminuye y se conserva constante a partir de la 14^a a la 16^a semanas hasta que el embarazo termine (Braunstein et al., 1976 en Ayala et al., 1984). Se piensa que la elevación de la HCG en el embarazo temprano (menos de 12 semanas), es necesaria para conservar la producción de progesterona por el cuerpo lúteo del ovario, debido a que la producción de esteroides por el trofoblasto durante esta etapa es insuficiente para que continúe implantado el blastocisto (Ayala et al., 1984). Sin embargo, llama la atención que la administración exógena de HCG no pueda prolongar el funcionamiento del cuerpo lúteo en mujeres que ovulan normalmente; la causa podría ser en parte que la estimulación del ovario con HCG exógena no es fisiológica, al contrario de lo que sucede con las gonadotropinas hipofisarias (LH-FSH), que deben secretarse en "pulsos" (Ayala et al., 1984).

Asimismo, los niveles de HCG en mujeres embarazadas aumentan rápidamente en la sangre y su concentración en la circulación es de 30 a 100 UI/ml alrededor de la 8^a semana.

La hormona HCG se localiza sobre la membrana de las células del sinciciotrofoblasto, formando una cubierta que constituye una interfase entre el tejido materno y fetal; debido a este hecho, se piensa que la HCG pueda proveer una protección inmunológica hacia el trofoblasto y se especula que su disposi-

ción superficial juega un papel importante para la implanta---
ción del cigoto (Beling y Weksler, 1974).

Por otra parte, la HCG ha demostrado ser un potente inhi-
bidor de la respuesta proliferativa de linfocitos tratados con
mitógenos, antígenos ó células aloantígenas, además prolonga -
la sobrevivencia de injertos, lo que sugiere que tiene activi-
dad inmunosupresora (Han, 1974).

Por ejemplo, la HCG extraída de orina de mujer embarazada
para uso de humanos, ha demostrado ser inmunosupresiva. En --
vivo, la inyección de HCG purificada disminuye la hipersensibi-
lidad retardada para el derivado proteico purificado (PPD) en
cobayos, pero no interfiere en el rechazo de injertos de piel
intrauterinos en ratas (Rocklin, 1979). Los lotes de HCG puri-
ficada con un rango de 1,000 - 10,000 UI/ml inhibe la respues-
ta mitógena inducida por fitohemaglutina (PHA), asimismo, --
tiene igual efecto en linfocitos alogénicos en la reacción de
cultivo mixto de linfocitos (MLR). Por otra parte, el efecto
supresivo de la HCG se pierde cuando los linfocitos preincuba-
dos son lavados ó cuando se incrementa la dosis de PHA (Rocklin,
1979).

Schiff et al. (1975), encontraron que la HCG causa el --
15% de inhibición del MLR con 800 UI/ml, y del 15 - 20% de in-
hibición de la inducción mitógena del linfocito, con una dosis
entre 150 - 2000 UI/ml. Por otra parte demostraron que el --
efecto inhibitorio de la HCG sobre el MLR es reversible y no -
se debe a un efecto citotóxico, asimismo la HCG puede tener --

funciones para inhibir los eventos tempranos de la transformación linfoblástica.

Contractor y Davies (1973, en Schiff et al., 1975), sugieren que la HCG puede inhibir la respuesta linfocítica debido a una competencia con el antígeno por el receptor de membrana.

Odell y Griffin (1987), sugieren que el origen de la HCG en la sangre de humanos, proviene de la glándula pituitaria y además, los niveles de HCG en mujeres cambian en forma paralela con los de la LH durante el ciclo menstrual.

En el embarazo temprano, la población de linfocitos muestra un decremento significativo en la subpoblación CD4⁺. Este decremento es acompañado con el máximo nivel de HCG, lo cual puede ser compatible con ciertos mecanismos inmunológicos que participan en la tolerancia hacia el feto (Degeenne et al., 1988).

1.2 Embarazo y respuesta inmunitaria

La invasión trofoblástica es un componente primario de la placentación humana, que trae como consecuencia la expresión de tejido fetal para el suministro de sangre materna (Tuttle et al., 1985).

Poco tiempo después que la placenta se ha formado, el avance marginal del trofoblasto invasivo pierde la definición de -- los bordes de la pared celular del citotrofoblasto, dando origen al sinciciotrofoblasto que carece de bordes celulares. --- Además de estos cambios morfológicos, el sinciciotrofoblasto dá inicio a la biosíntesis funcional de proteínas, esteroides e -- incluye la producción de la gonadotropina coriónica humana --- (Tuttle et al., 1985).

El trofoblasto presenta una actividad invasiva, destructiva y durante las primeras semanas siguientes a la implantación las arteriolas, arterias y las venas endometriales son "taponeadas" por la proliferación del trofoblasto (Tuttle et al., 1985). La invasión trofoblástica de la arteria lumina y la destrucción de la decidua continúa a través del primer trimestre, con una consecuente dilatación de las arterias maternas. Si--- guiendo a la formación de la vellocidad terciaria, las células del citotrofoblasto penetran la periferia del sincitio y se extienden al interior de la decidua y a la superficie del miometrio. Tuttle et al. (1985), proponen que la fusión de los grandes grupos de las células mononucleares intersticiales producen la aislación del lecho placentario.

La diferenciación del endometrio es acompañada por el aumento de la síntesis y/o secreción de ciertas proteínas y por una reducción de la síntesis de otras. De las cuales se han -- identificado 17 proteínas endometriales (EP), las proteínas --- principalmente secretadas son la EP15 y la EP14. La EP14 es -- asociada con la desidualización del endometrio y su síntesis se

incrementa durante el embarazo temprano. La EP15 se secreta durante el ciclo menstrual y en el embarazo temprano, pero decrece a la 15^a semana (Bell et al., 1985). Estas proteínas pueden ser utilizadas como marcadores de la función y diferenciación endometrial durante el ciclo menstrual (Bell et al., 1985).

Las proteínas pueden ser secretadas en el interior del lumen del útero, en el fluido amniótico ó en la circulación en general. Estas proteínas han tenido un papel fundamental en la interrelación feto-materna como inmunosupresores, o como una señal para guiar al trofoblasto hacia el tejido materno. La inmunomodulación local debida a los productos de la decidua y el trofoblasto, representa el primer mecanismo en la interfase feto-materna que previene la activación de los linfocitos maternos, que son potencialmente citotóxicos "in situ" (Parhar et al., 1988).

Se ha demostrado que la prostaglandina E₂ (PGE₂) y la progesterona químicamente puras, pueden actuar sinérgicamente en la supresión policlonal de linfocitos (Parhar et al., 1988). Donde la PGE₂ regula la generación del receptor para interleucina 2 (IL-2) (Lala et al., 1988).

Wang et al. (1987), encontraron que el endometrio que aún no ha desarrollado la decidua, contiene un factor soluble implicado en la regulación de la respuesta inmunitaria celular, y que la producción del factor se incrementa conforme progresa

el ciclo menstrual en la mujer. La ausencia de este factor soluble, podría explicar la habitual pérdida de embriones antes de la implantación y el bajo porcentaje de fertilización --- "in Vitro".

Stankova y Rola-Pleszczynsky (1984), proponen que la actividad inmunitaria debe ocurrir en el útero, permitiendo el -- desarrollo de linfocitos supresores específicos. Asimismo, - investigaron si las células supresoras maternas y del cordón - umbilical muestran especificidad para el estímulo de antígenos en la reacción cultivo mixto de linfocitos (MLC) materno-re--- ción nacido, encontrando que: a) Las células maternas son - hiporeactivas en el MLC; b) Las células no relacionadas ma- terno-rección nacido no son tolerantes y c) La hiporeacción del MLC materno-rección nacido es debido a una mínima parte de células supresoras específicas, fundamentalmente en ambas po- blaciones.

Tekelioglu-Uysal et al. (1975), realizaron estudios sobre la estructura y las interrelaciones entre las células de la - decidua y los linfocitos durante la implantación temprana. -- Encontraron que los agregados de células de la decidua y del - trofoblasto en el endometrio durante el embarazo temprano (com- plejo deciduotrofoblasto), pueden funcionar como un regulador humoral local relacionando factores químicos y toman parte en el establecimiento inmunológico para la implantación.

La concentración de linfocitos íntimamente asociada con - las células de la decidua, puede elevarse durante el movimien-

to normal de linfocitos al interior del sitio de implantación, y entran al endometrio como resultado de la inflamación natural de la implantación, y no como una respuesta específica hacia el embrión (Tekelioglu-Uysal et al., 1975).

Durante el embarazo, la respuesta inmune hacia los aloantígenos puede provocar el rechazo del feto, lo cual es evitado por medio de factores inmuno-humorales o por los llamados anticuerpos facilitadores. Estos anticuerpos son observados hacia la placenta, enmascarando los antígenos determinantes y protegiendo al tejido fetal de un ataque materno (Youtananukorn y Matangkasombut, 1972).

En el caso particular del ratón, el fracaso en el embarazo se debe al rechazo inmune materno, en el cual los linfocitos citotóxicos maternos se acumulan en el sitio de implantación y pueden atravesar la placenta y entrar al feto (Regan y Braud, 1983 en Bargent et al., 1988).

Existen proteínas inmunosupresoras asociadas al embarazo - que han sido aisladas en su mayor parte de la placenta humana, estas proteínas se dividen en tres grupos (Horne y Nisbet, 1979 en Gironnet y Levrier, 1985).

- Las proteínas específicas del trofoblasto

HCG y HCS

Fosfatasa alcalina de placenta

Proteína plasmática asociada al embarazo (PAPP-A y PAPP-B)

Beta 1 glicoproteína específica de embarazo designada por las abreviaturas: PS G, SP1, Sp5 y PAPP-C.

- Las proteínas fetales; antígenos carcino-embrionario y alfa feto proteína.

- Otras proteínas

β_1 -globulina (SP2)

Embarazo asociado α_2 -glicoproteína (α_2 PAG)

Proteínas placentarias PP-1, PP-2, PP-3, PP-4, PP-6 y PP-7

Proteína normal inmunosupresora ó NIP

Proteína C reactiva ó CRP

2 H isoferitina globulina

Factor de embarazo temprano

Hochner-celnikier et al. (1984), encontraron que las células cultivadas a partir de la decidua mantienen su capacidad de producir prolactinas y varias prostaglandinas PGs y PGE2, y proponen que junto con la secreción de fibronectinas, juegan un papel importante en la implantación del óvulo fecundado y subsecuentemente en el crecimiento del embrión.

Asimismo, se ha encontrado que la prorenina plasmática materna sintetizada por células coriónicas, alcanza su máxima --

producción a la 4^a semana del embarazo y se mantiene por todo el período de gestación; por otra parte, la β -HCG alcanza su punto máximo a la 9^a semana (Sealey et al., 1985).

Toder et al. (1984), proponen que las moléculas inmunoregulatoras asociadas al embarazo, pueden prevenir la expresión potencial citotóxica de las células naturales asesinas (NK). Tales moléculas inmunoregulatoras son: Beta-estradiol, prostaglandinas y la alfa-fetoproteína, las cuales están presentes en el suero de mujer embarazada y en el fluido amniótico.

Por otra parte, cuando un tumor es desarrollado, se ha determinado que puede tener parámetros inmunológicos similares al embarazo, siendo idéntico al comportamiento de las células asesinas (NK) (Nair et al., 1980 en Toder et al., 1984).

Finn et al. (1977), mencionan que la protección del feto se debe a una reacción débil entre las células maternas y fetales, determinada por un inhibidor genético, además proponen que la madre tiene dos superficies alélicas marcadas, una de las cuales pasa al feto (así que el feto y la madre tienen siempre marcadores en común), y estos marcadores son mutuamente repulsivos.

Sargent et al. (1988), sintetizaron en tres puntos la relación inmune feto-materna: a) Hay células de la respuesta inmune materna hacia los fetos que se desarrollan durante -

el embarazo, los cuales necesitan ser bloqueados; b) Los anticuerpos bloqueadores logran que el embarazo evolucione exitosamente; c) En ausencia de anticuerpos bloqueadores existe una respuesta de rechazo contra el feto.

A través del tiempo, los conocimientos generados sobre la inmunología del embarazo han tratado de explicar los múltiples factores que contribuyen a evitar que el feto sea rechazado. En base a experimentos realizados, cada investigador en su tiempo ha abordado el fenómeno desde diferentes aspectos, contribuyendo así a la disección del fenómeno.

Actualmente, no se conocen todos los mecanismos implicados en la sobrevivencia fetal durante el período intrauterino; sin embargo, los descubrimientos realizados sugieren que desde el inicio del embarazo, se generan señales que desencadenan los mecanismos implicados en la sobrevivencia fetal. En tales mecanismos está implicado el complejo decidua-trofoblasto, los anticuerpos bloqueadores y proteínas inmunosupresoras; entre las que se encuentra la hormona gonadotropina coriónica humana que ha demostrado su acción en la inhibición mitógena de linfocitos.

1.3 Origen de las células T

El sistema celular T, está compuesto por células linfoides T que intervienen en los mecanismos de inmunidad humoral y celular (Papiernik, 1984). En general, los linfocitos tienen una -- elevada relación nucleocitoplasmática; el citoplasma es rico en ribosomas y escaso en lisosomas (Bach y Reyes, 1984). El tamaño de los linfocitos varía de diámetro entre 7 y 8 μ (Sell, 1981).

Los linfocitos se van a originar a partir de las células - hematopoyéticas de la médula ósea. En estado embrionario éstas células hematopoyéticas se localizan en el saco vitelino y posteriormente migran al hígado, bazo y por último a médula ósea - (Bach y Reyes, 1984).

Una vez que las células precursoras de linfocitos T, han sido liberadas de médula ósea, viajan al timo. En el timo los linfocitos maduran y se diferencian hasta convertirse en células capaces de realizar actividades asociadas con la inmunidad celular y humoral (Vander et al., 1978).

Después que los linfocitos T abandonan el timo, viajan a los ganglios linfáticos en los cuales se identifican dos subpoblaciones celulares distintas con diferentes capacidades funcionales, linfocitos T reguladores y linfocitos T efectores -- (Katz, 1983). Los linfocitos T reguladores, son aquellos que pueden ampliar o suprimir las respuestas de otros linfocitos T o de linfocitos B, y los linfocitos T efectores son aquellos - que causan reacciones inmunitarias mediadas por células ----- (Katz, 1983).

1.4 Marcadores de linfocitos T humanos

El reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos T, se realiza con especificidad a través del receptor llamado receptor de T. Este reconocimiento es esencial para la activación de las células T con funciones efectoras (Meuer et al., 1984).

Los linfocitos T humanos forman rosetas espontáneas con los eritrocitos de carnero (rosetas E), y esta característica se usa para identificarlos. Otros receptores presentes en los linfocitos T periféricos humanos, para la porción del fragmento cristalizante (Fc) de las IgG y de las inmunoglobulinas M (IgM) monoméricas, son llamados receptores γ y μ respectivamente. Las células T μ tienen funciones auxiliares y las células T γ tienen funciones supresoras (Douglas, 1983).

El desarrollo de anticuerpos monoclonales ha permitido el análisis de las subpoblaciones de linfocitos. La reactividad de los linfocitos de sangre periférica contra los anticuerpos monoclonales, indica que los marcadores pueden delimitar subpoblaciones de linfocitos cooperadores (Th), supresores (Ts), y citotóxicos (Tc). Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-CD1 reacciona con el 100% de las células T periféricas, pero solamente con el 10% de timocitos. Los timocitos CD1⁺ son los únicos capaces de reaccionar en un cultivo mixto de linfocitos. Asimismo, el anticuerpo monoclonal anti-CD3 identifica la misma población. El anti-CD4 reacciona con el 75% -

de los timocitos y con el 60% de linfocitos T periféricos; --- parece ser que éste anticuerpo monoclonal puede identificar - células T cooperadoras o inductoras. Por otra parte, el --- anti-CD5 y el anti-CD8 reaccionan con alrededor del 80% de los timocitos y del 20 al 30% de células T periféricas; el ---- anti-CD8 puede identificar una subpoblación con capacidad supresora ó citotóxica (Douglas, 1983). Los anti-CD6, anti-CD9 y anti-CD10 reaccionan casi en su totalidad con timocitos. - Los timocitos inmaduros portan marcadores CD9 y CD10 ó única-- mente CD10; al parecer, el antígeno CD10 se pierde cuando las células han abandonado el timo. La subpoblación CD5⁺ es de -- aproximadamente el 80 - 90% de células T de sangre periférica (Douglas, 1983).

Por otro lado, existen poblaciones linfocíticas que ac--- túan como células asesinas naturales y células asesinas (K), que portan antígenos de células T, además poseen características de promonocitos que reaccionan con anticuerpos monoclonales que se unen a los macrófagos: OKM-1 y MAC-1 (Douglas, 1983).

La distribución tisular demuestra que las células CD4⁺ de tipo inductor predominan en la médula tímica, sangre y vías -- por donde pasan células T, incluyendo la paracorteza de las - amígdalas y la lámina propia intestinal. Las células CD8, --- constituyen una gran parte de la población de células T en la médula ósea y en el epitelio intestinal (Douglas, 1983).

Distribución del complejo de diferenciación (CD) (Shaw, -
1987).

Antígeno	Distribución
CD1a	Timocitos (células de Langerhans)
CD1b	timocitos
CD1c	timocitos
CD2	células T
CD3	células T
CD4	subpoblaciones de células T
CD5	células T
CD6	células T
CD7	células T
CD8	subpoblaciones de células T
CD17	granulocitos, monocitos y plaquetas
CD18	leucocitos
CD25	células T activadas
CDw26	células T activadas
CD27	células T y células plasmáticas
CD28	subpoblaciones de células T
CDw29	subpoblaciones de células T
CD30	células T activadas
CD31	monocitos, granulocitos
CDw32	monocitos, granulocitos
CD43	células T, granulocitos, células rojas y cerebro
CD44	células T, granulocitos y cerebro
CD45R	subpoblaciones de células T, --- granulocitos y monocitos.

1.5 Vías de activación de linfocitos T

Prácticamente existen dos vías de activación de linfocitos T: la vía de activación específica y la vía de activación inespecífica. La vía de activación específica la van a presentar los linfocitos que posean el receptor para el antígeno administrado, los cuales tienen la capacidad de transformarse (Bach, 1984). Dicho fenómeno es específico, ya que solo el antígeno inmunizante es capaz de provocarlo (Revillard, 1984).

Por otra parte, la vía de activación inespecífica de los linfocitos puede ser inducida por medio de sustancias obtenidas a partir de plantas (Ling y Kay, 1975). Por ejemplo, de Phaseolus vulgaris se extrae la fitohemaglutina ó PHA, la cual actúa como un mitógeno con propiedades de aglutinación. La concanavalina A (Con A), está caracterizada dentro de las lectinas y es un derivado de Canavalia ensiformis. Sin embargo, la Con A no es un aglutinante tan fuerte como el PHA, presumiblemente porque en las uniones tienen residuos de sacarina en su superficie.

El mitógeno fitolaca americana (PWM) derivado de Phytolacca americana tiene un bajo poder de aglutinación en comparación con el PHA ó con Con A, pero un mayor poder de estimulación.

Asimismo, existen productos derivados de microorganismos que igualmente actúan como activadores de la vía inespecífica

(Ling y Kay, 1975). Por ejemplo, todas las líneas de -----
 Staphylococcus aureus producen material difuso mitogénico.

Además, existen otros mitógenos que pueden activar a los linfocitos, como son: el periodato, iones de Zinc, iones de Mercurio, enzimas proteolíticas, extracto de nuez y extracto de leucocitos polimorfonucleares (Ling y Kay, 1975).

También se puede conseguir una activación moderada por -- agentes físicos, como el frío, el calor ó el ultrasonido ---- (Ling y Kay, 1975).

Por otra parte, las vías de activación pueden ser inducidas por anticuerpos monoclonales, las cuales definen distintas moléculas de superficie sobre las células T humanas. De esta manera, se logró conocer que existe una interacción del receptor de T con el CD3 (Reinherz, et al., 1982). Para tal efecto, se hizo uso de los anticuerpos monoclonales anti-CD3 y ----- anti-CD3_A, los cuales tienen patrones idénticos de reactividad sobre las células linfoides, ya que ambos definen a la misma glicoproteína de 20 Kd y una banda de 25 - 28 Kd (Reinherz et al., 1982).

El mecanismo de acción de estos anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD3_A, es que inducen el desprendimiento de la molécula CD3, provocando una marcada disminución del reconocimiento antígeno específico y bloqueando una variedad de funciones de las células T humanas periféricas (Reinherz et al., 1982). Por ejemplo, se ha observado que "in vitro" inhiben el

efecto citotóxico de los linfocitos T de los clones T4 y T8, -
asimismo, mantienen inhibida la producción de IL-2 evitando la
proliferación celular (Reinherz et al., 1982).

Los linfocitos T humanos son definidos y aislados por su
propiedad de formar rosetas con eritrocitos de carnero (Coombs
et al., 1970 y Jondal et al., 1982 en Palacios y Martínez-
Maza, 1982). Dichos linfocitos T tienen un receptor E, el --
cual puede también reaccionar con el anticuerpo monoclonal --
OKT11A, que detecta a un polipeptido de 50,000 MW (Kamoun --
et al., 1981 y Verbi et al., 1982, en Palacios y Martínez-Maza,
1982). El polipeptido de 50,000 MW fue definido como CD2 ---
(T, gp50) por la First International Workshop Leucocyte ----
Differentiation Antigens.

La interacción del anticuerpo monoclonal anti-CD2 con su
correspondiente antígeno, causa la inhibición de la prolifera-
ción de células T inducidas por antígenos (PPD y la reacción -
mixta con linfocitos autólogos) y por mitógenos (Con A y anti-
cuerpos monoclonales) (Palacios y Martínez-Maza, 1982). -----
Además, se encontró que el anticuerpo monoclonal anti-CD2 su--
prime la proliferación de los linfocitos T cuando son estimula
dos con PWM; pero no la suprime, cuando se estimula con virus
de Eptein barr. En otras palabras, el CD2 puede actuar como -
un receptor de señal negativa (Palacios y Martínez-Maza, 1982).

Se puede inducir la activación de linfocitos T, usando -- varias combinaciones de anticuerpos monoclonales dirigidos a -- epítopes particulares de la molécula CD2, por ejemplo, con el D66 y el 9.6/11, (Brottier et al., 1985). En el fenómeno de -- activación se pueden distinguir dos mecanismos de participa-- ción del ión Ca^{++} en el citoplasma celular. En las células T tratadas con anticuerpos monoclonales anti-CD2, se genera una elevación en los niveles de Ca^{++} ; sin embargo, cuando se le -- adiciona PMW, los niveles de Ca^{++} no aumentan (Holter et al., 1986).

Por otra parte, es importante la presencia de células -- accesorias o substitutos (12-O-tetradecanoyphorbol 13 acetato), para que el par de anticuerpos monoclonales puedan activar las células T. En especial, cuando se usan el par de anticuerpos monoclonales GT2+9.6/T11, los linfocitos deben tener contacto con las células accesorias para poder expresar el receptor para IL-2 (Huet et al., 1986). El papel de las células acceso-- rias en el proceso mitogénico, no es por medio de un entrecru-- zamiento con la molécula CD2, sino que actúa como un regulador de la molécula CD2 (Olive et al., 1986).

Cuando se induce la "modulación" de las células T, por an-- ticuerpos monoclonales anti-CD2 no se evita una subsecuente es-- timulación de las células; sin embargo, cuando son activadas -- por medio de anticuerpos monoclonales anti-CD3-Ti se induce la modulación molecular, pero se evita una posterior estimulación (Moretta et al., 1986). El anti-CD3 no afecta la superficie --

de CD2; no obstante, inhibe la generación de receptores para IL-2 y la producción de IL-2 (Fox et al., 1986).

La coestimulación de linfocitos T con anti-CD3 (SP34) y un anti-CD2 (9-1), activan su proliferación (Young et al., --- 1986), sugiriendo que la diferenciación de los antígenos de -- las células T, CD3 y CD2 está implicada en la activación vía -- antígeno específico de las células T. HÜning et al. (1987), -- proponen que una de las señales indispensables para la activa-- ción a través de la vía alterna (CD2/CD3), se debe a la inte-- racción de la molécula CD2 con un complemento natural de la -- superficie molecular.

Por otro lado, las células T no pueden ser activadas des-- pués que un anticuerpo monoclonal ha inducido la modulación -- del complejo CD3-Ti, debido posiblemente a una refracción de -- las células T, provocada por la concentración de Ca^{++} libre en el citoplasma que inhibe algunos eventos metabólicos posterio-- res a la interacción receptor ligando (Pantaleo et al., 1987).

Los anticuerpos monoclonales Mo inhiben la proliferación de las células T, teniendo diferentes efectos sobre la síntesis de IL-2 y la expresión del receptor para IL-2, además tiene efectos regulatorios sobre la vía alterna de activación de las células T vía CD2 (Schwab et al., 1988). La prolifera-- ción de las células T inducida por estímulos de T3, requiere de células adherentes (Heumann y Vischer, 1987).

1.6 Consecuencia de las funciones asociadas a CD2/CD3

El anticuerpo monoclonal 9.6 que reconoce y se une al antígeno CD2, inhibe la producción de interferon gamma, la expresión de los receptores para IL-2 y también bloquea la proliferación de las células T. Deduciendo que los receptores para IL-2 son necesarios para llevar a cabo la proliferación de las células T (Wilkinson y Morris, 1984). También se puede inhibir la producción de interferon gamma, por medio del anticuerpo monoclonal OKT11A y el 35.1 que además, suprime la producción de IL-2 y receptores para IL-2 (Reed et al., 1985).

En síntesis, la activación de las células T, se debe a la interacción del receptor en la superficie de las células con su correspondiente ligando; por otro lado, el uso de anticuerpos monoclonales puede activar o bloquear una variedad de funciones de las células T, debido al reconocimiento antígeno-específico.

Se puede inducir la proliferación de las células T, por medio de antígenos ó mitógenos; sin embargo, dicha proliferación puede ser inhibida por medio del anticuerpo monoclonal anti-CD3 y anti-CD3_A, lo mismo que con el anticuerpo monoclonal anti-CD2, los cuales identifican las moléculas CD3 y CD2 respectivamente sobre la superficie de las células T humanas.

Por otra parte, se puede inducir la proliferación de los linfocitos T mediante la combinación de dos anticuerpos mono-

clonales anti-CD2 (D66 y 9.611₁). Para tal activación, es necesaria la presencia de células accesorias que actúan como --- reguladores de la molécula CD2.

No obstante, cuando las células T son activadas por medio del anticuerpo monoclonal anti-CD2, pueden responder a una --- subsecuente estimulación; en cambio, cuando son activadas por el anticuerpo monoclonal anti-CD3-Ti, no responden a una subseuente estimulación. Debido a que el anticuerpo monoclonal -- anti-CD3, inhibe la generación de receptores para IL-2 y la - producción de IL-2; no afectando la superficie molecular de - CD2.

Cuando son estimuladas las células T con el anticuerpo - monoclonal anti-CD3, en combinación con un anti-CD2, activan - su proliferación. Lo cual sugiere, que los antígenos CD2 y - CD3 están implicados en la activación vía antígeno específico de las células T.

1.7 Objetivo

Identificar la posible relación entre la hormona gonadotropina coriónica humana y la vía alterna de activación CD2/CD3 de los linfocitos T humanos, empleando anticuerpos monoclonales.

1.8 Hipótesis

Se sabe que las moléculas CD2 y CD3 están implicadas en la activación de linfocitos T; por otro lado, la gonadotropina coriónica humana ha demostrado ser un potente inhibidor de la respuesta proliferativa de los linfocitos. Entonces al incubar los linfocitos T con hormona gonadotropina coriónica humana, es de esperarse que ésta influya en la vía alterna de activación CD2/CD3.

II MATERIAL Y MÉTODOS

En la presente investigación la parte experimental fue -- desarrollada en área estéril (campana de flujo laminar), las -- soluciones empleadas, así como el material, fueron previamente esterilizados.

- Obtención de linfocitos humanos

Las muestras de sangre periférica humana fueron tomadas -- de 32 personas sanas, cuyas edades fluctuaban entre los 22 y -- 32 años de edad. A cada persona se le tomó una muestra de -- 5 ml y se les adicionó 250 ul del anticoagulante EDTA al 10%. A continuación, la sangre se pasó en partes iguales a dos tu-- bos de tapón de rosca de 13 X 100 mm, los cuales previamente contenían 1.17 ml de ficol-hypaque, con una densidad de ---- 1.077 gr/ml, y se procedió a centrifugar a 1500 rpm durante -- 30 minutos. Los linfocitos obtenidos de la interfase se lava-- ron tres veces con solución Hank*, en cada lavada se centrifu-- gó a 1500 rpm durante tres minutos, y al terminar se ajustó a una concentración de 10^6 células/ml de solución Hank.

- Obtención de eritrocitos de carnero

Los eritrocitos fueron obtenidos a partir de sangre de -- carnero, el cual fue alojado en el bioterio y alimentado con -- alfalfa, agua y alimento concentrado (Purina, S.A. de C.V.).

* ver apéndice de reactivos

- Eritrocitos de carnero preparados con neuroaminidasa

Se tomaron 0.2 ml de glóbulos rojos de carnero y se suspendieron en 9.8 ml de solución salina amortiguada con fosfatos* (SSA); posteriormente, se lavaron tres veces con SSA a 1500 rpm durante tres minutos y se resuspendieron en 9.8 ml de solución Hank, con 200 ul de solución de neuroaminidasa (a una concentración de 1 UI/1 ml de solución Hank), se incubaron por 30 minutos a 37°C, con agitación cada cinco minutos y nuevamente se lavaron con SSA; por último, se resuspendieron en 10 ml de solución Hank.

- Conteo de linfocitos humanos

El número de linfocitos humanos fue determinado mediante una dilución de la suspensión celular, en solución Hank y azul de tripano* al 0.2% en solución salina isotónica*, contando las células en la cámara de Neubauer.

La viabilidad celular se determinó por la incorporación de azul de tripano en la célula, ya que el azul de tripano es un colorante de exclusión y únicamente se incorpora en las células muertas.

El número de células vivas se determinó mediante la siguiente fórmula:

* ver apéndice de reactivos

$$\frac{\text{No. total de células} \times \text{dilución} \times 1000}{0.4} = \text{No. de células/ml}$$

- Inhibición de la formación de rosetas por el anticuerpo monoclonal anti-CD3

Los linfocitos fueron resuspendidos en solución MEM*, a una concentración de 10^6 células/ml y sembradas en una microplaca de fondo en U (Nunc), con un promedio de 50 000 células por pozo. A siete pozos se les adicionó el anticuerpo monoclonal anti-CD3 (OKT3 Bohering Co.), cuyas diluciones fueron: -- 1:230, 1:215, 1:200, 1:185, 1:170, 1:155 y 1:140; se dejaron tres pozos testigos y se incubaron durante 15 - 30 minutos a 37°C durante 15 minutos; por último, se dejaron durante toda la noche a 4°C .

- Inhibición de la formación de rosetas por el anticuerpo monoclonal anti-CD3 + la HCG

Los linfocitos fueron resuspendidos en solución MEM a una concentración de 10^6 células/ml y sembrados en seis pozos, con un promedio de 50 000 por pozo; a cuatro pozos se adicionaron dos diferentes concentraciones de HCG (30 y 50 UI/pozo), dejando dos pozos testigos y se incubaron a 37°C durante 15 minutos. A continuación se agregó el anticuerpo monoclonal anti-CD3 con dos diferentes diluciones (1:230 y 1:140), y se incubaron a 37°C por 15 minutos. La combinación de las diluciones fue:

ver apéndice de reactivos

- | | | | | | |
|----|---------|-------|---|-----|------------|
| a) | Mc | 1:230 | + | HCG | 30 UI/pozo |
| b) | Mc | 1:230 | + | HCG | 50 UI/pozo |
| c) | Mc | 1:140 | + | HCG | 30 UI/pozo |
| d) | Mc | 1:140 | + | HCG | 50 UI/pozo |
| e) | Testigo | | | | |
| f) | Testigo | | | | |

A continuación, a cada pozo se le agregaron glóbulos rojos de carnero tratados con neuroaminidasa, en una proporción de 20 eritrocitos por linfocito y se incubaron a 37°C durante 15 minutos; por último, se deraron durante toda la noche a 4°C.

- Tratamiento de la sefarosa

La sefarosa 4B activada con bromocianuro (Pharmacy Fine - Chemical, Piscataway, NJ), se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 (Bohering Co.) en un amortiguador de borato 0.1N, con un pH de 8.5 y NaCl 0.05 M durante 2 - 4 horas a temperatura ambiente. Los sitios de unión desocupados fueron bloqueados incubando en 0.2 M de glicina con un pH de 8.5 durante dos horas.

- Ensayo de linfocitos y sefarosa

Se colocaron aproximadamente 10 000 perlas de sefarosa en cada pozo, sembrando 30 pozos en tres experimentos, que fueron:

a) Separosa 4B acoplada con glicina e incubada con linfocitos (grupo testigo/unión inespecífica).

b) Separosa 4B acoplada con anticuerpo monoclonal -- anti-CD3 e incubada con linfocitos (unión específica).

c) Separosa 4B acoplada con anticuerpo monoclonal --- anti-CD3 e incubada con linfocitos tratados con HCG (inhibi--- ción específica).

III RESULTADOS

- Obtención de linfocitos

Se tomó una gota de solución Hank con linfocitos y se diluyó con cuatro gotas de solución de azul de tripano, contando el número de linfocitos en la cámara de Neubauer. Se contaron únicamente las células viables, debido a que el azul de tripano solamente penetra en células muertas o en aquellas células con pared dañada. La población de linfocitos obtenida de sangre periférica humana, fue de 2.5 a 5×10^6 células/5ml de sangre.

- Porcentaje de inhibición de rosetas debido al efecto del anticuerpo monoclonal anti-CD3

Con una pipeta Pasteur se tomó una muestra de cada pozo - (tres testigos y siete experimentales), la cual se depositó en un portaobjetos y auxiliándose en un microscopio, se contó el número de rosetas formadas. Para tal efecto, se contaron cien linfocitos y únicamente se consideró a una roseta, cuando un linfocito está unido a tres o más eritrocitos.

El porcentaje de inhibición de rosetas se obtuvo en base a la relación que existe entre la media del número de rosetas formadas en los pozos testigos (sin anticuerpo monoclonal), y el número de rosetas formadas en cada pozo experimental (con anticuerpo monoclonal anti-CD3), con diferentes diluciones en

cada pozo. La tabla I muestra los porcentajes de inhibición de rosetas debido al efecto de las diferentes diluciones del anticuerpo monoclonal anti-CD3. Representando los resultados en una gráfica de barras, se puede apreciar una relación entre la cantidad de anticuerpo monoclonal empleada y el porcentaje de inhibición (Fig.1). A los porcentajes de inhibición de rosetas causados por las diluciones del anticuerpo monoclonal anti-CD3 1:230 y 1:140, se les tomó como patrón de referencia, para establecer si la HCG tiene algún efecto sobre el porcentaje de inhibición de rosetas. Se tomaron estas dos diluciones como patrón, debido a su gran diferencia en el porcentaje de inhibición.

- Porcentaje de inhibición de rosetas debido al efecto de la HCG + el anticuerpo monoclonal anti-CD3.

Con una pipeta Pasteur se tomó una muestra de cada pozo - (dos testigos y cuatro experimentales), se depositó en un portaobjetos y auxiliándose en un microscopio, se contó el número de rosetas formadas. Para tal efecto, se contaron 100 linfocitos y únicamente se consideró a una roseta cuando un linfocito esta unido a tres o más eritrocitos.

El porcentaje de inhibición de rosetas, se obtuvo en base a la relación que existe entre la media del número de rosetas formadas en los pozos testigos (sin HCG, ni anticuerpo monoclonal), y el número de rosetas formadas en cada pozo experimental (con HCG + el anticuerpo monoclonal). La tabla II ---

muestra los porcentajes de inhibición de rosetas debido al --- efecto de la combinación de la HCG con el anticuerpo monoclonal anti-CD3, comparándolos con los porcentajes de inhibición que se tomaron como patrón de referencia del anticuerpo monoclonal anti-CD3 (diluciones 1:230 y 1:140).

Los linfocitos tratados con 30 UI y 50 UI de HCG por pozo, más 1:230 de dilución del anticuerpo monoclonal anti-CD3, dan como resultado un porcentaje de inhibición de rosetas de --- 9.5 ± 9.6 y 9.59 ± 8.8 respectivamente. Comparando estos --- porcentajes con el porcentaje de inhibición de rosetas que --- produce únicamente el anticuerpo monoclonal anti-CD3 a la misma dilución (18.4 ± 10.0), y mediante la prueba de χ^2 cruzada, se encontró que no existe una diferencia estadísticamente significativa. Por otra parte, los linfocitos incubados con --- 30 UI y 50 UI del HCG por pozo, más 1:140 de dilución de anticuerpo monoclonal anti-CD3, dan un porcentaje de inhibición de 7.68 ± 11.18 y 13.57 ± 9.44 respectivamente. Comparando --- estos porcentajes con el porcentaje de inhibición de rosetas --- que produce únicamente el anticuerpo monoclonal anti-CD3 a la misma dilución (58.9 ± 12.7), se encontró que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Estos resultados están representados en la figura 2, en la cual se puede apreciar la diferencia de los distintos porcentajes de inhibición.

- Ensayo de linfocitos y sefarosa

En este experimento se contaron 100 esferas por pozo, determinando el número de linfocitos adheridos, tomando como patrón las esferas que tenían 0, 1, 2 y 3 ó más linfocitos (tabla III).

Los resultados de este experimento en forma global muestran que: las perlas acopladas con glicina presentan una diferencia estadísticamente significativa en el número de linfocitos adheridos, respecto a las perlas de sefarosa acopladas con anticuerpo monoclonal anti-CD3 ($P < 0.001$). Igualmente, las perlas de sefarosa acopladas con anticuerpo monoclonal anti-CD3, presentan una diferencia estadísticamente significativa en el número de linfocitos adheridos, en relación a las perlas de sefarosa acopladas con anticuerpo monoclonal anti-CD3, pero incubadas con linfocitos previamente tratados con HCG ($P < 0.001$). En la figura III están representados en forma de gráfica de barras, los diferentes experimentos con sefarosa que muestran los porcentajes de esferas que tienen 0, 1, 2 y 3 ó más linfocitos adheridos.

I PORCENTAJE DE INHIBICION DE ROSETAS DEBIDO AL EFECTO
DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD3

Dilución del anticuerpo monoclonal anti-CD3		$\bar{X} \pm S$ de inhibición de rosetas(%)		
Mc	1:230	18.4	\pm	10.0
Mc	1:215	27.7	\pm	15.4
Mc	1:200	27.9	\pm	21.9
Mc	1:185	36.0	\pm	20.3
Mc	1:170	45.0	\pm	19.0
Mc	1:155	48.1	\pm	15.7
Mc	1:140	58.9	\pm	12.7

\bar{X} = Promedio de valores obtenidos en 18 ensayos

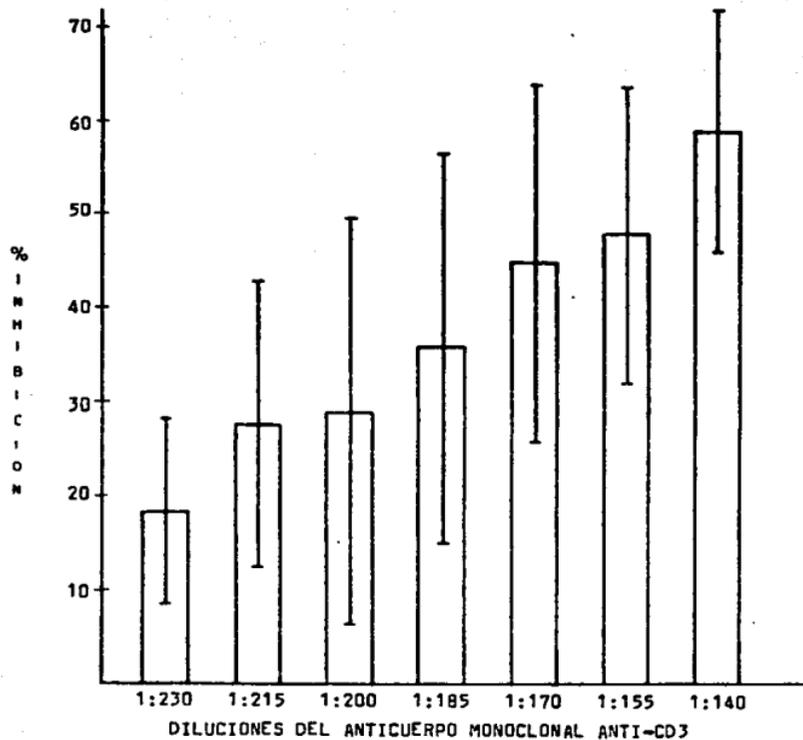


FIG. 1. PORCENTAJE DE INHIBICION DE ROSETAS DEBIDO AL EFECTO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD3.

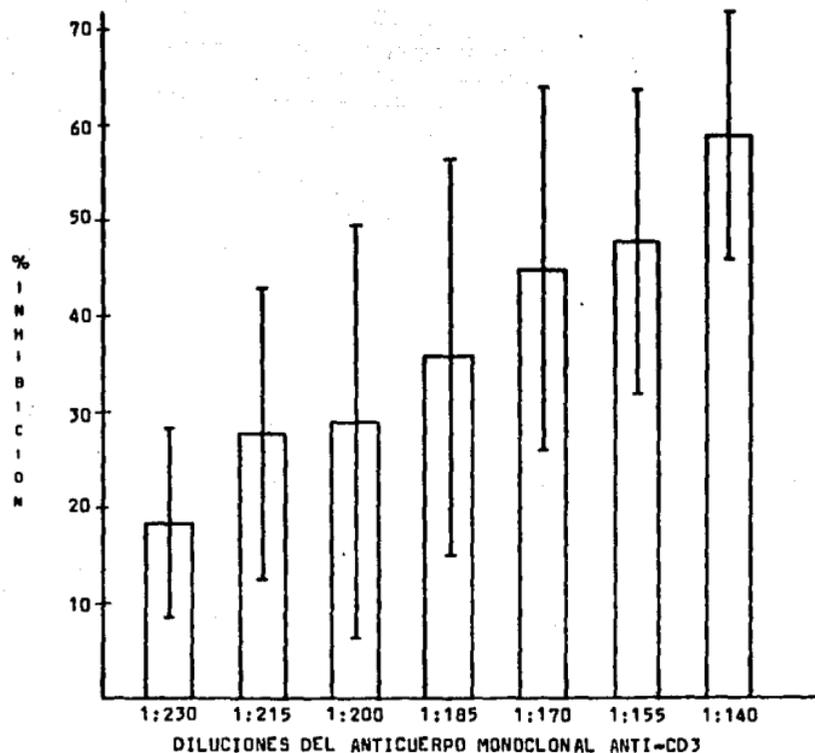
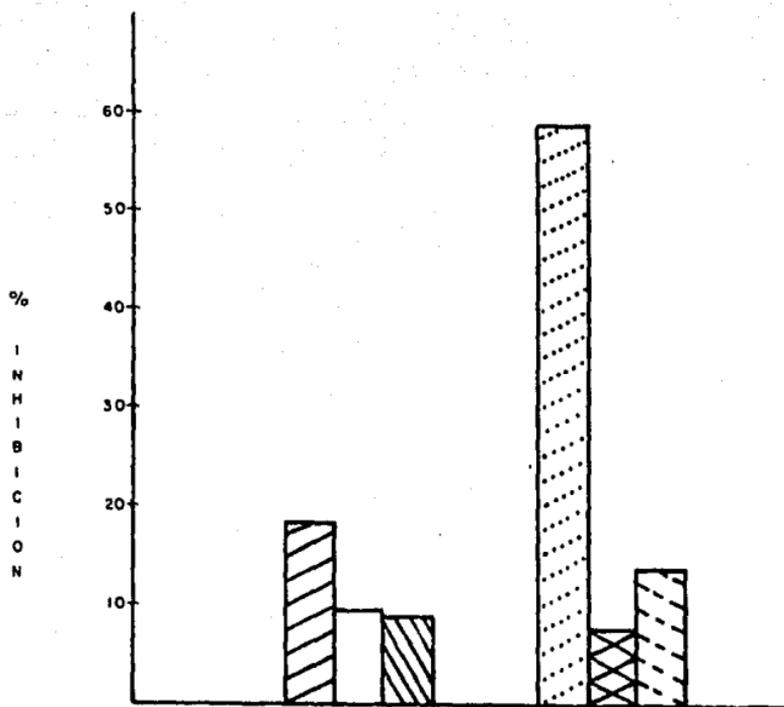


FIG. 1. PORCENTAJE DE INHIBICION DE ROSETAS DEBIDO AL EFECTO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD3.

II PORCENTAJES COMPARATIVOS DE LA INHIBICION DE ROSETAS DEBIDO AL EFECTO DEL
 ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD3 VS EL EFECTO DE LA HCG + EL
 ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD3

Dilución del anticuerpo monoclonal anti-CD3	$\bar{x} \pm S$ de inhibición de rosetas (%)	Concentración de HCG + la dilución del anticuerpo monoclonal anti-CD3	$\bar{x} \pm S$ de inhibición de rosetas (%)
Mc 1:230	18.4 \pm 10.0	Mc 1:230	7.57 \pm 9.6
		HCG 30 UI/ul	
Mc 1:230	18.4 \pm 10.0	Mc 1:230	8.59 \pm 0.8
		HCG 50 UI/ul	
Mc 1:140	58.9 \pm 12.7	Mc 1:140	7.68 \pm 11.10
		HCG 30 UI/ul	
Mc 1:140	58.9 \pm 12.7	Mc 1:140	13.57 \pm 9.44
		HCG 50 UI/ul	



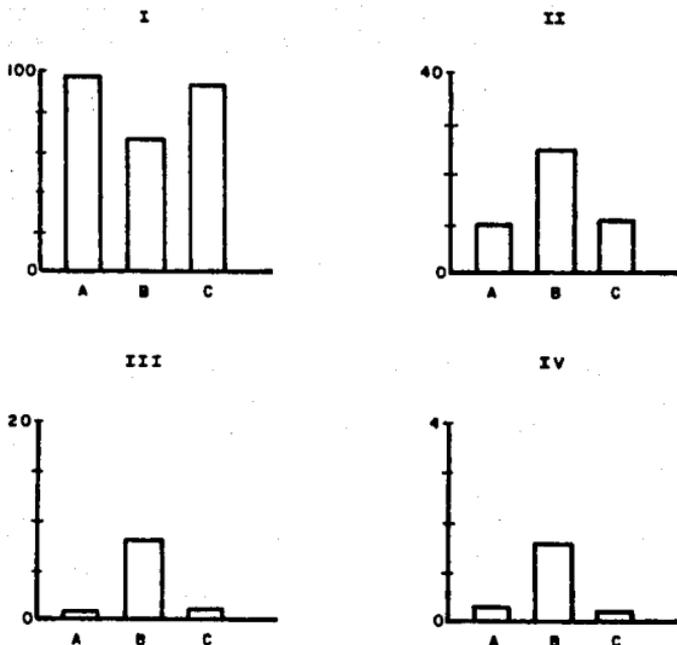
	ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD3	1:230
	ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD3	1:230 + 30 uI HCG
	ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD3	1:230 + 50 uI HCG
	ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD3	1:140
	ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD3	1:140 + 30 uI HCG
	ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD3	1:140 + 50 uI HCG

FIG. 2. GRAFICA DE BARRAS COMPARANDO LA INHIBICION DE ROSETAS DEBIDO AL EFECTO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD3 VS. EL EFECTO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD3 + HCG.

III ESFERAS DE SEFAROSA QUE PRESENTAN LINFOCITOS ADHERIDOS

	Sefarosa 4B acoplada con glicina e incubada con linfocitos.	Sefarosa 4B acoplada con anticuerpo monoclonal anti-CD3 e incubada con linfocitos.	Sefarosa 4B acoplada con anticuerpo monoclonal anti-CD3 e incubada con linfocitos tratados con HCG.
$\bar{X} \pm S^*$ de esferas de sefarosa que tienen 0 linfocitos adheridos.	89.1 \pm 2.5	65.3 \pm 5.9	87.0 \pm 2.4
$\bar{X} \pm S$ de esferas de sefarosa que tienen 1 linfocito adherido.	10.0 \pm 2.2	24.8 \pm 3.0	11.5 \pm 2.3
$\bar{X} \pm S$ de esferas de sefarosa que tienen 2 linfocitos adheridos.	0.5 \pm 0.5	8.2 \pm 6.2	1.2 \pm 0.9
$\bar{X} \pm S$ de esferas de sefarosa que tienen 3 ó más linfocitos adheridos.	0.3 \pm 0.7	1.6 \pm 1.1	0.2 \pm 0.4

* $\bar{X} \pm S$ Es el producto de 10 ensayos



- I PRESENTA 0 % DE LINFOCITOS ADHERIDOS A LAS ESFERAS DE SEFAROSA
 II PRESENTA 1 % DE LINFOCITOS ADHERIDOS A LAS ESFERAS DE SEFAROSA
 III PRESENTA 2 % DE LINFOCITOS ADHERIDOS A LAS ESFERAS DE SEFAROSA
 IV PRESENTA 3 % DE LINFOCITOS ADHERIDOS A LAS ESFERAS DE SEFAROSA

- A) SEFAROSA 4B ACOPLADA CON GLICINA E INCUBADA CON LINFOCITOS
 B) SEFAROSA 4B ACOPLADA CON ANTI-CD3 E INCUBADA CON LINFOCITOS
 C) SEFAROSA 4B ACOPLADA CON ANTI-CD3 E INCUBADA CON LINFOCITOS

FIG. 3. GRAFICAS QUE REPRESENTAN LAS MEDIAS Y DESVIACION ESTANDAR OBTENIDAS DEL ENSAYO DE LINFOCITOS Y SEFAROSA.

IV DISCUSION

Estudios realizados por diversos autores sugieren que en el embarazo temprano, se generan señales que desencadenan la producción de anticuerpos bloqueadores, sustancias inmunorreguladoras y otros mecanismos que permiten al feto sobrevivir durante el período intrauterino, a pesar de presentar un juego inmunológico de antígenos extraños a la madre (Rocklin et al., 1979; Ayala et al., 1984; Gironnet y Levrier, 1985). En esta discusión se pretende analizar el posible papel que desempeña la Gonadotropina Coriónica Humana (HCG) como inmunorregulador, específicamente en la vía alterna de activación CD2/CD3 en linfocitos T humanos.

La formación espontánea de rosetas se debe a que los linfocitos T humanos presentan un marcador en su superficie, que funciona como un receptor específico para los eritrocitos de carnero (receptor E). El receptor E, porta el marcador T11 (CD2); por otro lado, su ligando natural recibe el nombre de estructura blanco T11 (T11TS), presente en la superficie de los eritrocitos de carnero (Hüning, 1985). Se sabe que la formación de rosetas puede ser bloqueada mediante el anticuerpo monoclonal anti-T11, debido a que compete con los eritrocitos de carnero por el sitio de unión presente en la superficie de los linfocitos T humanos (Hüning, 1985).

En el presente trabajo se empleó el anticuerpo monoclonal anti-CD3, para inhibir la formación de rosetas. Las diluciones empleadas fueron llevadas de 1:230 a 1:140, encontrando que con una dilución de 1:140, se produce un porcentaje de inhibición de rosetas de 58.9 ± 12.7 , lo cual indica que el efecto - del anticuerpo monoclonal anti-CD3, es proporcional a la concentración empleada; por lo que, se puede sugerir que la molécula CD2 es modulada vía CD3, reafirmando así los reportes de - diferentes autores, que mencionan la estrecha relación que --- existe entre ambas moléculas (CD2 y CD3) (Young et al., 1986; Stohl et al., 1988; Schwab et al., 1988).

Por otra parte, se sabe que hay proteínas asociadas al em barazo que tienen propiedades inmunorreguladoras, entre las -- que se encuentra la HCG, que pertenece al grupo de las proteínas específicas del trofoblasto (Horne y Nisber, 1979 en ---- Gironnet y Levrier, 1985). La HCG se sintetiza en la membrana del trofoblasto y se calcula, para el décimo día después que - ha ocurrido la ovulación, un promedio de 3000 células que producen una concentración de 42 UI/día (Braunstein et al., 1973). La secreción de la HCG ocurre en descargas pulsadas cada 2 a 4 horas, importantes para mantener el cuerpo lúteo (Ayala et al., 1984; Odell y Griffin, 1987).

Las concentraciones de HCG, usadas en la experimentación para inhibir la reacción del cultivo mixto de linfocitos (MLR), han causado controversia. Schiff et al. (1988), reportan que solamente con concentraciones elevadas se puede causar la ---

inhibición del MLR, por ejemplo, con 800 UI de HCG se puede lograr un 15% de inhibición; mientras que, Seling y Weksler (1974 en Schiff et al., 1975), han reportado que con 40 UI/ml, se puede lograr un porcentaje de inhibición significativo; por otro lado, Benavides (1988), ha reportado que con concentraciones de 30 UI y 60 UI/ml de HCG, se puede inhibir la formación de rosetas cuando se incubó durante dos horas con linfocitos T.

Las concentraciones de HCG empleadas en este trabajo, están en función al décimo día en el que ha ocurrido la ovulación (Braunstein et al., 1973). El tiempo de incubación de la HCG con los linfocitos se determinó de 15 minutos, debido a que con un tiempo superior de 30 minutos, la HCG es capaz de inhibir por sí sola la formación de rosetas. Estos hallazgos corroboran los datos reportados por Benavides (1988).

Después de haber determinado que por medio del anticuerpo monoclonal anti-CD3, se logra modular indirectamente la molécula CD2, mediante una vía alterna, el siguiente paso consistió en investigar si la HCG tendría algún efecto sobre la interacción entre las moléculas CD2 y CD3. Para tal efecto, los linfocitos humanos fueron previamente tratados con 30 UI y 50 UI de HCG; posteriormente se agregaron 1:230 y 1:140 de dilución de anticuerpo monoclonal anti-CD3, respectivamente a cada concentración de HCG; por último, se adicionaron los eritrocitos de carnero.

Los resultados del experimento indican, que los linfocitos previamente tratados con 30 UI y 50 UI de HCG más 1:230 de dilución del anticuerpo monoclonal anti-CD3, producen un porcentaje de inhibición de rosetas de 9.5 ± 9.6 y 8.59 ± 8.8 -- respectivamente. Se compararon éstos porcentajes con el porcentaje de inhibición de rosetas que produce únicamente el anticuerpo monoclonal anti-CD3 con la misma dilución (18.4 ± 10.0), encontrando que no existen diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, los linfocitos tratados con 30 UI y 50 UI de HCG más 1:140 de dilución de anticuerpo monoclonal anti-CD3, produjeron un porcentaje de inhibición de -- 7.68 ± 11.18 y 13.57 ± 9.44 respectivamente. Se compararon éstos porcentajes contra el porcentaje de inhibición de rosetas que produce únicamente el anticuerpo monoclonal anti-CD3 con la misma dilución (58.9 ± 12.7), encontrando que existe una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$). -- En este resultado se puede apreciar una fuerte disminución en el porcentaje de inhibición de rosetas, lo que hace suponer -- que la HCG bloquea la interacción del anticuerpo monoclonal -- anti-CD3, con su antígeno.

Posteriormente se investigó el sitio de acción de la HCG sobre los linfocitos, por medio del anticuerpo monoclonal -- anti-CD3, unido covalentemente a perlas de sefarosa (Geppert y Lipsky, 1988). La hipótesis planteada en este ensayo fue la siguiente: si la HCG compete con el anticuerpo monoclonal --

por la molécula CD3, es de esperarse que sea inhibida su ---
 unión, cuando los linfocitos sean tratados previamente con --
 HCG. Por otra parte, si la HCG no inhibe la unión del anti-
 cuerpo monoclonal anti-CD3 con la molécula CD3, entonces ten-
 drá un sitio diferente de entrada al linfocito y esto ocasiona
 la modificación indirecta de la molécula CD2.

Para confirmar la hipótesis propuesta, el diseño experi-
 mental con las perlas de sefarosa se realizó en tres fases: -
 la primera consistió en que las perlas de sefarosa se acopla-
 ron con glicina y se incubaron con linfocitos (grupo testigo/
 unión inespecífica), en la segunda, las perlas de sefarosa -
 se acoplaron con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 y se incu-
 baron con linfocitos (unión específica); y en la tercera, las
 perlas de sefarosa se acoplaron con anticuerpo monoclonal --
 anti-CD3 y se incubaron con linfocitos tratados con HCG ---
 (inhibición específica). Posteriormente, se contaron 100 es-
 feras por ensayo, determinando el número de linfocitos adhe-
 ridos, tomando como patrón las esferas que tenían 0, 1, 2 y
 3 ó más linfocitos (tabla III). Los resultados de éste expe-
 rimento, en forma global indican, que las perlas de sefarosa
 acopladas con glicina tienen una diferencia estadísticamente
 significativa en el número de linfocitos adheridos, respecto
 a las perlas de sefarosa acopladas con anticuerpos monoclona-
 les anti-CD3 ($P < 0.001$). Asimismo, las perlas de sefarosa -
 acopladas con anticuerpo monoclonal anti-CD3, tienen una di-
 ferencia estadísticamente significativa en el número de lin-

focitos adheridos, respecto a las perlas de sefarosa acopladas con el anticuerpo monoclonal anti-CD3, pero incubadas con linfocitos tratados con HCG ($P < 0.001$).

Los resultados indican que los linfocitos tratados con -- HCG fueron bloqueados en la molécula CD3 directamente; sin embargo, no se invalida la posibilidad de una entrada externa -- diferente de la HCG que modifique indirectamente a la molécula CD3, evitando su unión con el anticuerpo monoclonal anti-CD3.

Por otra parte Stoho et al. (1988), mencionan que al estimular a la molécula CD3, se modula mediante una vía alterna a la molécula CD2. En base a este estudio, se sugiere que la HCG se une a la molécula CD3, modulando a la molécula CD2 y de esta forma, posiblemente pueda inhibir la formación del receptor para IL-2.

Las evidencias del presente estudio indican que la HCG -- compete con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 por la molécula CD3.

En base a este estudio, se propone que la HCG interviene -- en la vía alterna CD2/CD3 a nivel de membrana celular, lo cual podría ser vital para mantener deprimida la respuesta inmune -- en el sitio de implantación y posteriormente evita que el embrión sea rechazado.

Debido a que el antígeno T3 está implicado con el disparo de linfocitos T (Wauve et al., 1980 en Zanders et al., 1983), posiblemente con la HCG se inhiba su activación, evitando que se produzca IL-2 y receptores para IL-2, como se ha comprobado cuando se utilizó el anticuerpo monoclonal OKT11A (Reed et al., 1985).

V CONCLUSIONES

En base al modelo experimental desarrollado, se puede -- concluir lo siguiente:

- La formación de rosetas puede ser inhibida mediante - el anticuerpo monoclonal anti-CD3, y el porcentaje de inhibi-- ción está en función a la cantidad de anticuerpo monoclonal - empleado.

- Existe una competencia entre la HCG y el anticuerpo - monoclonal anti-CD3 a nivel de membrana celular por la molécula CD3, que modula mediante una vía alterna a la molécula CD2, provocando una disminución en la formación de rosetas, lo que probablemente indique un cambio estructural en la molécula --- CD2.

- La presente investigación debe considerarse como un - trabajo inicial que pretende abrir una línea de investigación, enfocada principalmente al aspecto biológico de la activación de linfocitos y al inmunoquímico, que demuestre fehacientemente si la HCG se une específicamente a la molécula CD3.

VI BIBLIOGRAFIA

- Ayala, A.R., et al., 1984. Secreción pulsátil de la gonadotropina coriónica humana. Arch. Invest. Méd., 15: 147-152.
- Bach, J.F., 1984. Linfocitos B y T. En: Bach, J-F., (Ed.). - Inmunología, Limusa, México; Págs. 65-104.
- Bach, J.F., y Reyes, F., 1984. Células linfoides. En: Bach, - J-F., (Ed.) Inmunología. Limusa, México; Págs. 45-64.
- Beling, C.G., y Weksler, M.E., 1974. Suppression of mixed -- lymphocyte reactivity by human chorionic gonadotrophin. Clin. exp. Immunol., 18: 537-541.
- Bell, S.C., et al., 1985. Protein synthesis and secretion by the human endometrium and decidua during early pregnancy. British Journal of Obstetrics and Gynaecology, 92: ---- 793-803.
- Benavides, M.A., 1988. Detección de un factor de embarazo temprano por prueba de inhibición de rosetas. Tesis Profesional, Facultad de Ciencias, UNAM. 70 pp.
- Braunstein, G.S., et al., 1973. Secretory rates of human --- chorionic gonadotropin by the normal trophoblast. Am J Obstet Gynecol., 115: 447-450.
- Brottier, P., et al., 1985. T cell activation via CD2 (T, gp50) molecules: Accessory cells are required to trigger T cell activation via CD2-C66 plus CD2-9.6/T11, epitopes. Journal of Immunology, 135: 1624-1631.
- Degenne, D., et al., 1988. Serial study of T-Lymphocytes ---- subsets in women during very early pregnancy. Clinical -- Immunology and Immunopathology, 48: 187-191.
- Douglas, S.D., 1983. Desarrollo y estructura de las células del sistema inmunológico. En: Stites, D.P., et al., (Eds.) Inmunología Básica y Clínica. 4a. ed. El Manual Moderno, México; Págs. 67-90.
- Finn, R., et al., 1977. Feto-maternal bidirectional mixed --- lymphocyte reaction and survival of fetal allograft. The Lancet, 10: 1200-1202.
- Fox, D.A., et al., 1986. Regulation of the alternative pathway of T cell activation by anti-T3 monoclonal antibody. The Journal of Immunology, 136: 1945-1950.

- Geppert, T.D., y Lipsky, P.E., 1988. Activation of T lymphocytes by immobilized monoclonal antibodies to CD3. *J. Clin. Invest.*, 81: 1497-1505.
- Gironnet, I., y Levrier, M., 1985. La dépression immunitaire non spécifique de la grossesse. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.*, 14: 959-964.
- Han, T., 1974. Inhibitory effect of human chorionic gonadotropin on lymphocyte blastogenic response to mitogen, antigen and allogeneic cell. *Clin. Exp. Immunol.*, 18: --- 529-535.
- Heumann, D., y Vischer, T.L., 1987. Activation of resting T lymphocytes by cross-linked anti-CD3 (T3). *Eur. J. --- Immunol.*, 17: 1657-1660.
- Hochner-celnikier, D., et al., 1984. Growth characteristics of human first trimester decidual cells cultured in serum-free medium: Production of prolactin, prostaglandins -- and fibronectin. *Biology of Reproduction*, 31: 827-836.
- Holter, W., et al., 1986. T cell stimulation via the erythrocyte receptor. *J. Exp. Med.*, 163: 654-664.
- Huet, S., et al., 1986. T cell activating via CD2 (T, gp50): The role of accessory cells in activating resting T cells via CD2. *The Journal of Immunology*, 137: 1420-1428.
- HÜning, T., 1985. The cell surface molecule recognized by the erythrocyte receptor of T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, -- 162: 890-901.
- HÜning, T., et al., 1987. Alternative pathway activation of T cells by binding of CD2 to its cell-surface ligand. -- *Nature*, 326: 298-301.
- Katz, D.H., 1983. El sistema inmunitario: Generalidades. -- En: Stites, D.P., et al., (Eds.) *Inmunología Básica y -- Clínica*. 4a. ed. El Manual Moderno, México; Págs. 13-21.
- Lala, P.K., et al., 1988. Suppression of lymphocyte allereactivity by early gestational human decidua. *Cellular --- Immunology*, 116: 411-422.
- Ling, N.R., y Kay, J.E., 1975. *Lymphocyte stimulation*. ---- North-Holland Publishing Company, Amsterdam-Oxford; Págs. 103-122.
- Mendenhall, H.W., 1976. The immunology of the fetal-maternal relationship. En: Scott, J.S., y Jones, W.R. (Eds.) --- *Immunology of Human Reproduction*. Academic Press, London; Págs. 61-77.

- Meuer, S.C., et al., 1984. The Human T-Cell Receptor. *Ann. - Rev. Immunol.*, 2: 23-50.
- Moretta, A., et al., 1986. Modulation of surface T11 molecules Enduced by monoclonal antibodies: analysis of the functional relationship between antigen-dependent and antigen-independent pathways of human T cell activation. *Eur. J. Immunol.*, 16: 1427-1432.
- Odell, W.D., y Griffin, J., 1987. Pulsatile Secretion of HCG in normal human adults. *The New Englan Journal of Medicine*, 317: 1688-1691.
- Olive, D., et al., 1986. Anti-CD2 (sheep red blood cell receptor) monoclonal antibodies and T cell activation I. Pairs of anti-T11.1 and T11.2 (CD2 subgroups) are strongly mitogenic for T cells in presence of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *Eur. J. Immunol.*, 16: 1063-1068.
- Palacios, R., y Martínez-Maza, O., 1982. Is the E receptor on human T lymphocytes A "negative signal receptor"? *The Journal of Immunology*, 129: 2479-2485.
- Pantaleo, G., et al., 1987. Antibody-induced modulation of the CD3/T cell receptor complex causes T cell refractoriness by inhibiting the early metabolic steps involved in T cell activation. *J. Exp. Med.*, 166: 619-624.
- Papiernik, M., 1984. *Organos linfoides*. En: Bach, J-F., (Ed.) *Inmunología*. Limusa, México; Págs. 23-44.
- Parhar, R.S., et al., 1988. Suppression of lymphocyte alloreactivity by early gestational human decidua. *Cellular Immunology*, 115: 310-324.
- Reed, J.C., et al., 1985. Suppression of interleukin 2 receptor Acquisition by monoclonal antibodies recognizing the -50 KD protein associated with the sheep erythrocyte receptor on human T lymphocytes. *The Journal of Immunology*, -134: 1631-1639.
- Reinherz, E.L., et al., 1982. Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex. *Cell*, 30: 735-743.
- Revillard, J.P., 1984. *Hipersensibilidad retardada*. En: --- Bach, J-F., (Ed.) *Inmunología*. Limusa. México; Págs. --329-358.

- Rocklin, R.E., et al., 1979. Immunobiology of the maternal - fetal relationship. *Ann. Rev. Med.*, 30: 375-404.
- Sargent, I.L., et al., 1988. Maternal Immune Responses to the fetus in early pregnancy and recurrent miscarriage. *The Lancet*, 12: 1099-1104.
- Schiff, R.I., et al., 1975. Inability of gestational hormones to account for the inhibitory effects of pregnancy plasmas on lymphocyte responses in vitro. *Cellular immunology*, 20: 69-80.
- Schwab, R., et al., 1988. CD3 pathway of T-Cell activation. *Cellular Immunology*, 115: 310-324.
- Sealey, J.E., et al., 1985. Plasma prorenin in first-trimester pregnancy: Relationship to changes in human chorionic gonadotropin. *Am J Obstet Gynecol.*, 153: 513-519.
- Sell, S., 1981. *Inmunología, Inmunopatología e Inmunidad*. - 2a. ed. Harla, México; 386 pp.
- Shaw, S., 1987. Characterization of human leukocyte differentiation antigen. *Immunology Today*, 8: 1-3.
- Stankova, J., y Rola-Pleszczynski, M., 1984. Suppressor cells in the human maternal-fetal relationship. *Journal of Reproductive Immunology*, 6: 49-59.
- Stohl, W., et al., 1988. Differential Immunomodulation by -- Anti-CD2 monoclonal antibodies of Anti-CD3-induced T cell activation: Dependence upon the individual anti-CD3 monoclonal antibody used for activation. *Cellular Immunology*, 116: 73-85.
- Tekililoglu-Uysal, M., et al., 1975. Ultrastructural relationships between decidua, trophoblast and lymphocytes at the beginning of human pregnancy. *J. Reprod. Fert.*, 42: 431-438.
- Toder, V., et al., 1984. Studies of natural killer cells in pregnancy II. The immunoregulatory effect of pregnancy substances. *J. Clin. Lab. Immunol.*, 14: 129-133.
- Tuttle, S.E., et al., 1985. Immunohistochemical evaluation of human placental implantation: An initial study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 153: 239-244.
- Wang, H-S., et al., 1987. Suppression of lymphocyte reactivity in vitro by supernatants of explants of human endometrium. *Am J. Obstet Gyneco.*, 157: 956-963.

- Wilkinson, M., y Morris, A., 1984. The E receptor regulates - interferon-gamma production: four-receptor model for --- human lymphocyte activation. Eur. J. Immunol., 14: 708-713.
- Vander, A.J., et al., 1978. Fisiología Humana. McGraw-Hill, México; Págs. 364-391.
- Young, S., et al., 1986. A common pathway for T lymphocyte -- activation involving both the CD3-Ti complex and CD2 --- sheep erythrocyte receptor determinants. The Journal of Immunology, 137: 1097-1100.
- Youtananukorn, V., y Matangkasombut, P., 1972. Human maternal cell mediated immune reaction to placental antigens. --- Clin. exp. Immunol., 11: 549-556.
- Zanders, E.D., et al., 1983. Tolerance of T-cell clones is - associated with membrane antigen changes. Nature, 303: 625-627.

VII APENDICE DE REACTIVOS

Solución de Hank

NaCl	8.0	gr
KCl	0.4	gr
CaCl ₂	0.14	gr
MgSO ₄	0.20	gr
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	0.12	gr
KH ₂ PO ₄	0.6	gr
NaHCO ₃	0.35	gr
MgCl ₂	0.1	gr
Dextrosa	1.0	gr
Rojo de fenol	0.020	gr

Ajustar el pH a 7.2 y aforar con agua destilada a 1 litro

Solución de Alsever

Glucosa	2.05	gr
Citrato de Sodio	0.8	gr
Cloruro de Sodio	0.42	gr
Agua destilada	100	ml

Ajustar el pH a 6.2 con ácido cítrico al 10%.

Esterilizar por filtración.

Solución Salina Isotónica

Cloruro de Sodio	0.85	gr
Agua destilada	100	ml

Azul de Tripano (0.2%).

Azul de tripano	0.2	gr
Solución salina isotónica	100	ml

Solución MEM

Solución Hank	9.8	ml
Suero fetal de ternera	0.2	ml

Solución Salina Amortiguada. pH 7.4

Solución A

NaCl	8.0	gr
KCl	0.4	gr
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2	gr
Na ₂ HPO ₄	0.045	gr
KH ₂ PO ₄	0.060	gr

Disolver en 500 ml de agua destilada

Solución B

CaCl₂ 2H₂O 0.147 gr

Disolver en 500 ml de agua destilada

Solución C

Glucosa 1.06 gr

Disolver en 100 ml de agua destilada y mezclar con 1000 ml de partes iguales de la solución A + B

Solución D

Rojo Fenol 0.002 gr

Disolver en 10 ml de agua destilada. Añadir a la mezcla A + B + C

Solución E

Tris Hidroximetil - Aminometano 19.1 gr

Disolver en 800 ml de agua destilada.