

51
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**EFFECTO DEL URETANO SOBRE LOS RECEPTORES
PARA Fc Y C3b DE MACROFAGOS ALVEOLARES**

FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MARCELA GARCIA PASCUAL



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.

ABREVIATURAS

Ac	- Anticuerpo
Ag	- Antígeno
B	- Factor B
C	- Complemento
CAM	- Complejo de ataque a la membrana
cFc	- Fragmento de la porción constante con uniones covalentes
C1	- Componente 1 del complemento
<u>C1</u> _{c,r,s.}	- Componente 1 del complemento activado
C2	- Componente 2 del complemento
C2a	- Fragmento a del componente 2 del complemento
C2b	- Fragmento b del componente 2 del complemento
C3	- Componente 3 del complemento
C3a	- Fragmento a del componente 3 del complemento
C3b	- Fragmento b del componente 3 del complemento
C3bi	- Fragmento b del componente 3 del complemento inactivo
C3bB	- Fragmento b del componente 3 del complemento unido al factor B
C4	- Componente 4 del complemento
C4a	- Fragmento a del componente 4 del complemento
C4b	- Fragmento b del componente 4 del complemento
C5	- Componente 5 del complemento
C5a	- Fragmento a del componente 5 del complemento
C5b	- Fragmento b del componente 5 del complemento

- C6** - Componente 6 del complemento
- C7** - Componente 7 del complemento
- C8** - Componente 8 del complemento
- C9** - Componente 9 del complemento
- E** - Eritrocitos
- EA** - Eritrocitos con anticuerpo
- EAC3b** - Eritrocitos con anticuerpo y fragmento b del
componente 3 del complemento
- Fc** - Fragmento de la porción constante
- FM** - Fagocitos mononucleares
- GRC** - Glóbulos rojos de carnero
- HI** - Factor inhibidor
- Ig** - Inmunoglobulina
- IgG** - Inmunoglobulina clase G
- IgG1** - Inmunoglobulina clase G subclase 1
- IgG2** - Inmunoglobulina clase G subclase 2
- IgG3** - Inmunoglobulina clase G subclase 3
- IgG4** - Inmunoglobulina clase G subclase 4
- IgM** - Inmunoglobulina clase M
- LB** - Linfocito B
- LT** - Linfocito T
- µg** - Microgramos
- nFc** - Fragmento de la porción constante con uniones
no covalentes
- pFc'** - Fragmento de la porción constante obtenido por
tratamiento con pepsina

PMN - Polimerfonucleares
rpm - Revoluciones por minuto
SSF - Solución salina de fosfatos
SSF-G - Solución salina de fosfatos con gelatina
v/v - Volumen a volumen

INDICE

Resumen	1
Introducción	4
Planteamiento del problema	28
Hipotesis	27
Diseño Experimental	
Material y Métodos	29
Resultados	38
a) Tablas	39,43
b) Fotografías	40,45,47
Discusión	49
Conclusiones	52
Bibliografía	53

RESUMEN

El humo del tabaco es un aerosol que contiene gases, vapores orgánicos y material particulado con actividad carcinogénica, además algunos productos del tabaco tienen efecto mutagénico; cuando se purifican los productos derivados de la combustión del tabaco se logra una mayor actividad oncogénica.

Se ha demostrado que uno de los productos presentes en el humo del tabaco corresponde al uretano. Este compuesto tiene la capacidad de inducir adenocarcinomas pulmonares en ratones que han recibido dicha sustancia, debido a que presenta las siguientes propiedades: narcótico, antimitótico, oncogénico y carcinoclástico y que en bajas concentraciones puede actuar sobre los cromosomas provocando mutaciones y rompimientos.

La inmunosupresión por medios químicos y físicos incrementa la incidencia de tumores y favorece el crecimiento de las metástasis pulmonares. En el cáncer se ha postulado que hay múltiples factores que inciden en el desarrollo de la enfermedad, uno de estos corresponde a la respuesta inmune antitumoral que se desarrolla en los vertebrados y cuando esta no es suficiente da lugar a la muerte del hospedero.

Se ha tratado de establecer a que nivel de la respuesta inmune está ejerciendo su acción inhibitoria el tabaco, ya sea sobre la producción de anticuerpos o la inmunidad celular.

En este trabajo se intentó determinar la acción del uretano sobre los receptores para Fc y C3b de la membrana de los macrófagos alveolares, debido a que la vía de entrada natural del humo del tabaco en los fumadores activos y pasivos es la respiratoria y que la célula mencionada es una de las más importantes en el primer contacto entre el organismo y los productos del humo del tabaco.

La determinación de dicha acción se realizó por medio de la prueba de formación de rosetas, con eritrocitos sensibilizados con IgG y C3b.

La purificación de los macrófagos alveolares se realizó en cubreobjetos de vidrio para permitir la adherencia de las células fagocíticas y que fueron viables, se lavaron con medio de cultivo y después se incubaron durante 15 minutos con diversas concentraciones de uretano (10 mg a 1 ng/ml), posteriormente se añadieron los eritrocitos y finalmente se procesaron para teñirlos con hematoxilina-eosina.

Los resultados señalan que las dosis altas de uretano son tóxicas para los macrófagos y dosis menores no afectan la viabilidad, pero sí provocan una disminución en el porcentaje de rosetas, además de que el número de eritrocitos unidos a los macrófagos está en relación con la dosis de uretano empleada.

Debido a sus características, el uretano puede modificar

la capacidad de los macrófagos alveolares para reconocer al fragmento Fc de IgG y de C3b, siendo posible que inhiba la expresión de los receptores, o que disminuya la afinidad existente entre los mismos.

En forma especulativa se puede proponer que el uretano induce una modificación en las funciones de la respuesta inmune que son efectuadas por los macrófagos alveolares.

INTRODUCCION

El individuo que tiene la capacidad para defenderse de los agentes nocivos que se encuentran en el medio que lo rodea, lo hace gracias a una serie de mecanismos fisiológicos presentes desde el nacimiento; algunos de éstos son constitutivos y no requieren de experiencias previas con el agresor. El conjunto de mecanismos de defensa se conoce como estado de inmunidad (37) .

SISTEMA INMUNE

El sistema inmune está integrado por la inmunidad celular y la inmunidad humoral. Estos componentes se desarrollan por vías de diferenciación separadas pero estrechamente relacionadas, donde además intervienen otros tipos de células y tejidos. El linfocito es el eje central de la inmunidad, identificándose 2 poblaciones principales, designadas como: linfocitos T (LT) y linfocitos B (LB) (17) .

Los LT o células T, son llamadas así porque al pasar por el timo son modulados por él, permitiendo su maduración y son los responsables de la inmunidad celular; también se encuentran subpoblaciones de linfocitos T que corresponden a células supresoras, cooperadoras y citotóxicas (17) .

Los LB o células B, maduran en la bolsa de Fabricio de las aves, o en los análogos de la bolsa de Fabricio, la médula ósea de otras especies, incluyéndose a la humana.

Los LB y su progenie, las células plasmáticas, son los responsables de la inmunidad humoral, la cual se expresa a través de la producción de inmunoglobulinas (FIGURA 3) .

Los fagocitos mononucleares (FM) interactúan con los linfocitos en la regulación de la respuesta de tipo humoral ó celular, ó ambas (36) .

Estas células fagocíticas se originan de los promonocitos que se producen en la médula ósea de los vertebrados, circulan en la sangre como monocitos y luego migran a los tejidos.

Los monocitos se transforman en macrófagos cuando llegan a los diversos sitios anatómicos, incluyéndose el tejido conectivo donde se denominan histiocitos, médula ósea, cavidad peritoneal, sistema nervioso central (microglia), cavidades serosas (macrófagos pleurales), tejido óseo (osteoclastos), en pulmón (macrófagos alveolares), el bazo y ganglios linfáticos (libres y fijos) y el hígado (células de Kupffer)(16) .

Los macrófagos varían en su morfología y función dependiendo del lugar en donde se encuentren y en ocasiones pueden sobrevivir durante meses en ciertos tejidos. Poseen diversos receptores, enzimas y proteínas transportadoras en la superficie de la membrana celular . Existen cuatro grupos generales de receptores de membrana en los macrófagos:

- receptores para la porción Fc de las moléculas IgG1 e IgG3;
- receptores para el fragmento C3b;
- receptores " inespecíficos " que ligan partículas como las esferas de látex, de diversas proteínas, eritrocitos trata-

dos con aldehídos y

- receptores para lectinas (1, 17, 18, 32, 37, 38) .

TABAQUISMO

Existen varias enfermedades, como la bronquitis y el enfisema, que se han asociado con el hábito del tabaco. Es posible que se induzca una respuesta inmune humoral y celular contra algunos componentes del tabaco, ya sea en forma natural o experimentalmente inmunizando a diversas especies animales (28, 31) .

El humo del tabaco contiene sustancias que son capaces de inhibir los mecanismos de defensa del aparato respiratorio tales como: producción de la parálisis del movimiento ciliar (3), aumento en el número total de glóbulos blancos, pero disminución en el porcentaje de linfocitos (9); además alteración de la capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares (19); e inhibición de la adhesividad y posiblemente modifiquen el papel inmunoregulator de los mismos (25) .

Estos cambios pueden ocurrir debido al efecto tóxico y farmacológico de los componentes del humo del tabaco (Tabla 1) y también a los cambios en la respuesta inmune hacia esos compuestos que pueden participar en las lesiones de las vías respiratorias (9) .

El uretano es una sustancia que se encuentra en el humo de un cigarrillo a una concentración de 10 a 35 μg , ésta sustancia tiene propiedades narcóticas, antimitóticas, carcinogénicas y carcinoclasticas. También existen otros compuestos en el humo del tabaco con diversas concentraciones

TABLA I: SUSTANCIAS MUTAGENICAS Y CARCINOGENICAS PRESENTES EN EL HUMO DEL TABACO.

I.- FASE PARTICULADA.		CONCENTRACION EN EL HUMO DE UN CIGARRILLO
A.- FRACCION NEUTRA		
-- Benzopireno	10 a 50	ng
-- Dibezoantraceno	40	ng
-- 5-metilcriseno	0.6	ng
-- Benzofluorantenos	90	ng
B.- FRACCION BASICA		
-- Nicotina	0.06 a 2	ng
-- N-nitrosomonnicotina	0.2 a 3.7	µg
C.- FRACCION ACIDA		
-- Catecol	40 a 280	µg
D.- RESIDUO		
-- Niquel	0 a 3	µf
-- Cadmio	80	ng
-- Polonio	0.03 a 1	pCi
II.- FASE VAPOR		
-- Hidracina	32	µg
-- Cloruro de vinilo	1 a 16	ng
-- Uretano	10 a 35	µg
-- Formol	20 a 29	µg
-- Oxido de nitrógeno	16 a 600	µg
-- Nitrosodietilamina	0.1 a 28	ng

(Tabla 1) . Su acción puede ser sinérgica con los efectos producidos por el uretano (12, 26, 40) .

El uretano fué utilizado en medicina como agente anti - neoplásico y como hipnótico, y como bactericida tópico asociado con la terapia de sulfonamida.

El uretano en grandes dosis produce depresión de la médula ósea por lo que fué utilizado durante un tiempo en el tratamiento de la leucemia crónica y el mieloma múltiple, (22), sin embargo el posible riesgo del efecto carcinogénico en el hombre obligó a su eliminación de la terapéutica antineoplásica. La actividad carcinogénica fué señalada inicialmente por las observaciones de Nettleship y sus colaboradores (34) desde 1943, quienes probaron la carcinogenicidad del uretano en ratones; sumándose a ésta información los estudios de Mirvish, con lo que se comprobó el alto riesgo de usar al uretano en humanos y en el área de la veterinaria, donde frecuentemente se empleaba como anestésico en varias especies (26) .

La vía de administración y la dosis determina el desarrollo de las neoplasias, lo cual también se relaciona con el sexo y la edad de los sujetos que reciben la droga.

El uretano es carcinogénico en ratones, ratas y hamsters después de administrarlo por vía oral, respiratoria, subcutánea e intraperitonealmente, produciéndose tumores pulmonares, linfomas, hepatomas, melanomas y tumores vasculares (22) .

Los ratones jóvenes y los recién nacidos son más suscep -

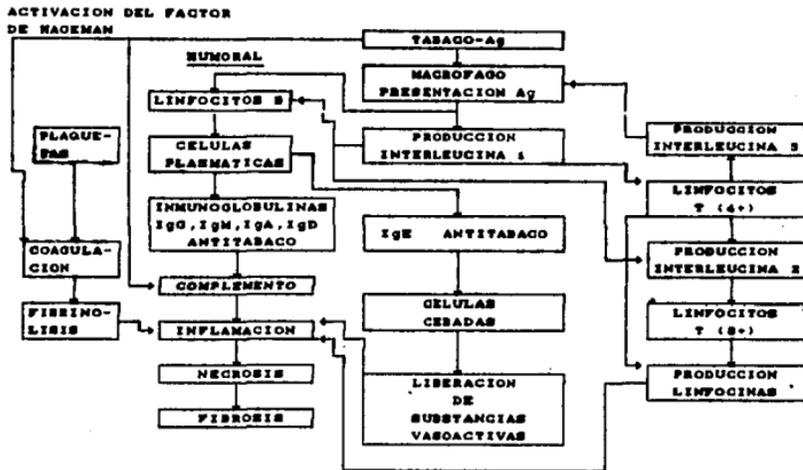
tibles al cáncer inducido por uretano que los ratones adultos (22) . La mayor proporción de ratones que son anestesiados con uretano presentan tumores pulmonares de 4 a 6 meses después; la dosis óptima del uretano para desencadenar un proceso neoplásico pulmonar en estos animales es de 1 mg por gramo de peso corporal (12) .

La respuesta inmune puede alterarse al iniciarse el proceso neoplásico, así como la producción de las metástasis (26), lo que permite la progresión tumoral en los adenocarcinomas. Se ha intentado establecer a que nivel de la respuesta inmune está actuando el tabaco y sus componentes, provocandose la inhibición de la producción de anticuerpos y la depresión de la inmunidad celular (FIGURA 1), pero se requieren más estudios sobre los efectos del uretano en el sistema inmune, especialmente en las fases iniciales de la relación hospedador-tumor (26) .

Las evaluaciones del Sector Salud sobre las principales causas de muerte entre los mexicanos muestran que existe un incremento en pacientes con cáncer pulmonar (26) . Los estudios realizados en varios países para conocer y manipular los mecanismos de protección contra el cáncer son intensos, sin embargo aún se desconocen los pasos iniciales del desarrollo tumoral, a pesar de que se conoce la asociación entre ciertos productos químicos y la incidencia de neoplasias (26) .

En individuos con tabaquismo hay una exposición constante a diversos agentes cancerígenos (43); así mismo a esta

FIGURA No.1 TABAQUISMO Y SU RELACION CON LA RESPUESTA INMUNE



adicción se incorporan otras enfermedades (FIGURA 2), pero no se conocen aún todos los mecanismos moleculares y celulares que condicionan este tipo de patología (2, 6, 9, 10, 13, 23, 25, 30, 31, 33, 38, 40, 41) .

EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

Se sabe que en toda reacción inmunológica es muy importante el sistema del complemento (C), que está formado por un conjunto de proteínas que normalmente están presentes en el suero, y que son relativamente independientes de la respuesta inmune. El C normalmente está inactivo, y para su activación se requiere de varios factores. Las dos vías del C que se conocen son:

- la vía clásica, que se activa fundamentalmente por la reacción Ag-Ac,
- y la vía alterna que se inicia por lipopolisacáridos (Zimotsán), IgA agregada, endotoxinas, inulina y dextranas y en la que existen de manera permanente complejos activos(FIGURA 3) .

Las funciones biológicas del complemento activado por cualquiera de las vías son:

- | | |
|-------------------------|----------------------------|
| - inmunocitoadherencia, | - inactivación de virus, |
| - opsonización, | - lisis, |
| - proinflamatoria, | - promueve la coagulación. |

El C está formado por una serie de proteínas, cada una de ellas con ciertas funciones dentro de la vía de activación en la que participa (Tabla 2) .

La vía clásica consta de una serie de reacciones no e-

FIGURA No.2 CAMBIOS INMUNOPATOLOGICOS MAS FRECUENTES
LIGADOS AL TABAQUISMO.

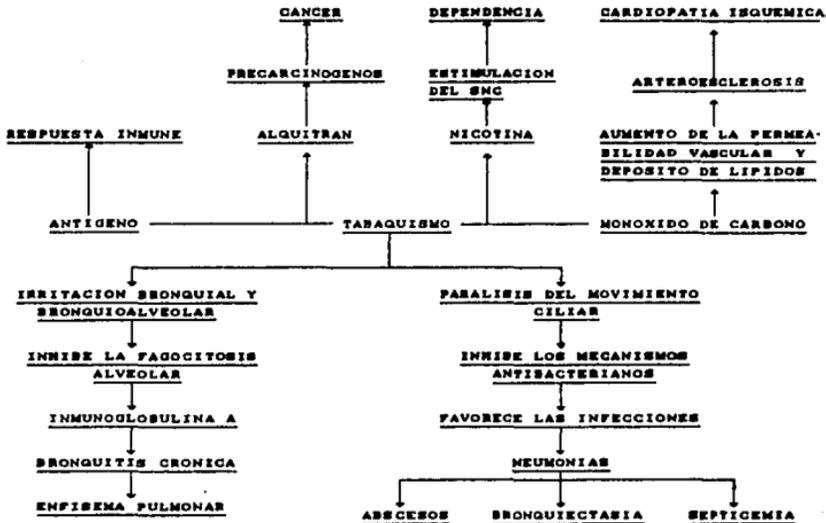


FIGURA No. 3 DIAGRAMA ESQUEMATICO DE LOS MECANISMOS DE ACCION EN CADENA DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO (CC) EN LA SUPERFICIE DE ALGUN ACTIVADOR DEL COMPLEMENTO (CP = PROPERDINA; B = FACTOR B; D = FACTOR D)

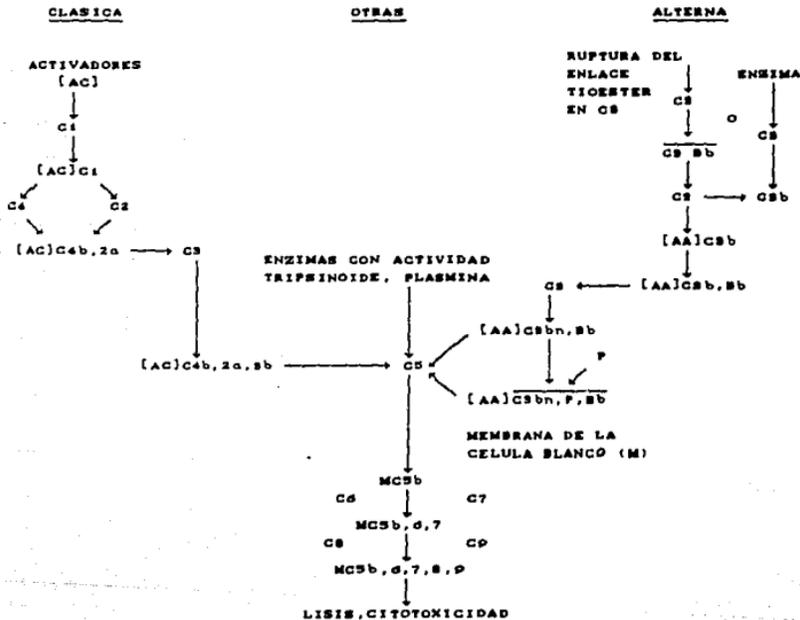


TABLA IIA- PROPIEDADES DE LOS COMPONENTES Y REGULADORES DEL COMPLEMENTO.				
NOMBRE	SINONIMOS	PESO MOLECULAR	MOVILIDAD ELECTROFORETICA	CONCENTRACION SERICA APROX. ($\mu\text{g/ml}$)
Via clasica				
C1q	C'D, proteina IIS	400,000	γ_2	70
C1r		190,000	β	34
C1s	Esterasa de C1	87,000	α	31
C2		117,000	β_1	25
C3	β_1 C	185,000	β_1	1,600
C4	β_1 E	206,000	β_1	600
Via alternativa				
C3	Factor A, factor sensible a la hidracina (HSF)	185,000	β_1	1,300
Factor B	Proactivador de C3 (C3PA) Glucoproteina- β rica en glicina (GBG)	93,000	β_2	200
Factor D	Glucoproteina II β_2 Convertasa del proactivador C3 (C3Pasa) Glucoproteinasa- β rica en glicina (GBG)	24,000	α	1
Factor I	Inactivador de C3b, KAF, C3b INA	88,000	β	34
Factor H	β_1 H, acelerador del inactivador de C3b	150,000	β_1	500
Properdina		220,000	γ_2	25

TABLA IIB- PROPIEDADES DE LOS COMPONENTES Y REGULADORES DEL COMPLEMENTO.

NOMBRE	SINONIMOS	PESO MOLECULAR	MOVILIDAD ELECTROFORETICA	CONCENTRACION SERICA APROX. ($\mu\text{g/ml}$)
Mecanismos de ataque a la membrana				
C5	$\beta_1\text{F}$	191,000	β_1	70
C6		120,000	β_2	64
C7		110,000	β_2	56
C8		151,000	γ_1	55
C9		71,000	α	59
Reguladores del complemento				
Inhibidor d' C1 C4 que se fija a proteina	Inhibidor de la esterasa de C1, in. de C1 C4bp	105,000 500,000	α_2 β	180 ---
Factor I	Inactivador de C3b, KAF, C3b INA	88,000	β	34
Factor H	$\beta_1\text{H}$, escalprador del inactivador de C3b	150,000	β_1	500
Properdina		220,000	γ_2	25
Proteina S	Inhibidor del complejo de ataque a la membrana, INH CAM	88,000	α	505
Inactivador de anafilatoxina	AI, SCPB, carboxipeptidasa N	300,000	α	---
Proteinas Anorales				
Factor nefritico C3	C3 NcF, NF	160,000	γ	---

quimoleculares, en la cual debe efectuarse la interacción Ag-Ac el cual puede ser una molécula de IgM o dos moléculas de IgG, uniéndose el antígeno en dos o más sitios activos de los anticuerpos, sucediéndose cambios conformacionales en el dominio constante de la fracción Fc de la inmunoglobulina que permite el reconocimiento del dominio C₂H por el primer componente del complemento (C1q), activándose el complejo C1q,r,s, que tiene una gran actividad enzimática para degradar al componente C4 en sus respectivos fragmentos C4a y C4b, que se une al complejo anterior y en presencia de iones magnesio fragmenta al componente C2 en C2a y C2b. Este componente C2a tiene como función biológica aumentar la permeabilidad vascular y la contracción de las fibras musculares lisas. Los fragmentos C2a y C4b se asocian para formar la C3 convertasa, denominada a sí por que fragmenta al componente C3 en C3a, que tiene función de anafilotoxina, y C3b que promueve la secreción de proteasas por los macrófagos, la inmunocitoadherencia, opsonización y estimula a LE. Este fragmento C3b, unido a C4bC2a forma la C5 convertasa, y fragmenta al componente C5 en C5a con función de anafilotoxina y actúa como factor quimiotáctico para polimorfonucleares (PMN) .

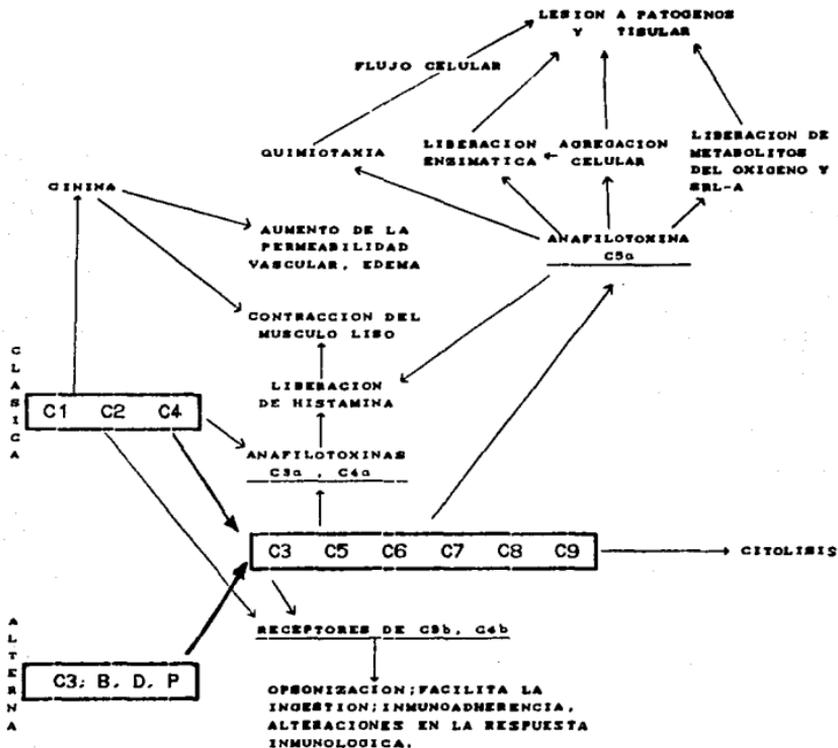
El fragmento C5b, resultante de la degradación de C5, se une a los componentes C6, C7 y C8, para formar un complejo

que se va a polimerizar en presencia de 12-18 moléculas del componente C9 para dar origen a lo que se conoce como complejo de ataque a la membrana (CAM) que altera las funciones de la membrana celular llevándose a cabo la lisis celular. El complejo que queda como C5 convertasa se encargará de romper más moléculas del componente C5 en sus respectivos fragmentos (FIGURA 4) .

La vía alterna necesita que el componente C3 se una al factor B, dando como resultado el complejo C3B que con iones magnesio (Mg^{++}) y el factor \bar{D} , formándose el $\overline{C3Bb}$ que tiene gran actividad enzimática para degradar al C3 en sus fragmentos C3a y C3b, dando origen al complejo conocido como C3 convertasa lenta o I, con la diferencia de que ésta es menos activa que la obtenida por la vía clásica.

Una parte de C3b se une a moléculas de agua, que en presencia del inactivador HI, origina C3bi y otra parte se une a la superficie de las membranas celulares, que contienen los activadores de vía alterna, activando al C3bB que con los iones magnesio (Mg^{++}) y el factor \bar{D} , divide el factor B en Ba y Bb formándose C3bBb o sea C3 convertasa que con la properdina forma $\overline{C3bPBb}$ que es más activa y estable y rompe a C3 en sus respectivos fragmentos C3a y se forma ($C3b$)_n PBb que fragmenta al componente C5 en C5a y C5b, que continúa igual que la vía clásica hasta la producción del CAM y la lisis celular respectiva.

FIGURA No. 4 CONSECUENCIAS BIOLÓGICAS DE LA ACTIVACION DEL COMPLEMENTO.
 (P = PROPERDINA; B = FACTOR B; D = FACTOR D)



Estos fenómenos ocurren como mecanismos de la regulación del complemento en el organismo y su participación en la amplificación del proceso inflamatorio.

LA CAPACIDAD CITOFILICA DE LAS INMUNOGLOBULINAS Y EL RECEPTOR PARA Fc DE IgG EN MACROFAGOS

Berken y Benacerraf (1966), usando la prueba de rosetas, establecieron que el anticuerpo anti-IgG2 del cobayo se une al receptor para la porción Fc en macrófagos alveolares.

La importancia biológica del fragmento Fc fué enfatizada por Abramson y colaboradores (1970), empleando eritrocitos sensibilizados con anticuerpos anti-Rh(D) y monocitos para la formación de rosetas. El fragmento Fc de IgG humana inhibió la formación de rosetas, mientras que el fragmento derivado del tratamiento con la pepsina (pFc') no bloqueó a las rosetas.

La reducción y alquilación del fragmento Fc produce cambios que anulan la actividad citofílica concluyéndose que la porción amino-terminal del dominio C_H2 del fragmento Fc es la que interacciona con el receptor para Fc en monocitos.

También se tienen datos que implican la interacción del dominio C_H3 de la IgG humana con el receptor de macrófagos. (37) .

Los eritrocitos sensibilizados con IgG humana forman rosetas con macrófagos peritoneales del cobayo y el fragmento

Fc y pFc' de IgG humana son capaces de inhibir la formación de rosetas.

Okafore y colaboradores (1974) usaron un sistema homólogo compuesto por eritrocitos humanos cubiertos con anticuerpos anti-D y monocitos de sangre periférica. El fragmento pFc', de IgG1 e IgG3 de proteínas de mieloma, fué más efectivo como inhibidor de la formación de rosetas que los fragmentos pFc' derivados de IgG2 o IgG4.

La actividad citoflítica de los fragmentos de inmunoglobulinas fué demostrada por inhibición de rosetas por bloqueo con IgG intacta marcada radioactivamente y con macrófagos peritoneales de ratón (Dissanayake y Hay, 1975). La inhibición de rosetas comparada con la actividad citoflítica de la inmunoglobulina completa permite la evaluación de la unión de los fragmentos Fc y pFc' de IgG2b de proteínas de mieloma de ratón. Los fragmentos Fc y pFc' tuvieron menor afinidad que la molécula de IgG2b-I¹²⁵ para bloquear la unión con los macrófagos. La caracterización del fragmento Fabb de IgG de conejo consistía de una inmunoglobulina que carecía del dominio C_H3 (FIGURA 5) y que permanecía la actividad de unión a Clq (Colomb y Porter, 1974) .

Ovary y colaboradores (1976 b) estudiaron la interacción entre eritrocitos de camero cubiertos con el fragmento Fabb de anticuerpos de conejo y con los macrófagos alveolares de cobayo. Los eritrocitos cubiertos con Fabb formaron rosetas tan efectivamente como los sensibilizados

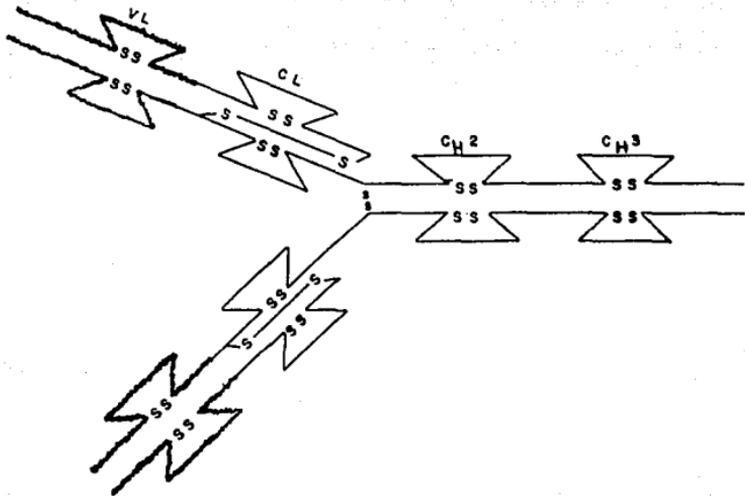


Figura 5 : Representación de la molécula de IgG mostrando el arreglo de los dominios de la inmunoglobulina

pero solamente el fragmento más largo de Fc muestra una adherencia fuerte a los receptores de macrófagos. Esta preparación contenía una mezcla de fragmentos de uniones covalentes (cFc) y no covalentes (nFc) en relación molar 2:1 .

La estrecha similitud entre la actividad relativa de unión de la preparación de Fc (0.6) y la fracción molar de cFc (0.67), permite inferir que la unión de los fragmentos covalentes al receptor para Fc son responsables primarios de la actividad citofílica. Esta posibilidad fué apoyada por la observación de que al reducir los puentes disulfuro en el cFc se anulaba la actividad citofílica.

La región C_H2 de IgG2 probablemente contiene el sitio de unión con el receptor y esta región es lábil, requiriéndose la porción amino-terminal y carboxilo-terminal de los dominios de C_H3 para mantener su configuración nativa (37) .

En conejos la actividad de unión citofílica esta en el fragmento Fc completo indicando que en esa zona también participa la región C_H2 en la unión al receptor Fc de macrófagos (37) . El fragmento Fc de conejo difiere con respecto al del cobayo, ya que la actividad citofílica no es abolida por la eliminación de la unión disulfuro, señalando una gran estabilidad de la estructura terciaria de la región C_H2 en la IgG de conejos. Esta observación apoya que la actividad citofílica reside en el fragmento Facb (37) .

En un intento por resolver los conflictos aparentes en los datos obtenidos de diferentes especies con diferentes

con anticuerpo íntegro y la inhibición de la formación de rosetas fué debida al fragmento Fc intacto de conejo pero no por el fragmento pFc', indicando que la región C_H2 es la que se une con el receptor Fc del macrófago.

La dificultad para la interpretación de este estudio fué haber usado una combinación heteróloga entre anticuerpos y macrófagos. Sin embargo, la demostración de que los monómeros de IgG de conejo dan reacción cruzada con los receptores de inmunoglobulinas homólogas en macrófagos peritoneales de cobayo (37) apoyan la validez de éstas observaciones.

La valoración cuantitativa de la actividad citofílica de los fragmentos de Fab, Fc y los subfragmentos de Fc, se ha hecho en el ratón, cobayos, conejos y en el hombre (37) .

La afinidad aparente de unión de los fragmentos derivados del Fc al receptor Fc, se ha calculado por la comparación de los promedios de la actividad de los fragmentos que tiene que ser expresada como una fracción de la constante de afinidad de la inmunoglobulina nativa (Tabla 3) .

La actividad citofílica de los anticuerpos está restringida a la región Fc de las inmunoglobulinas. La actividad expresada por el fragmento Fc aislado de la proteína IgG2a de ratones fué considerablemente más baja que la observada con la IgG2a nativa (37) .

En los cobayos se estudió una serie de fragmentos Fc preparados por digestión con papaína y pepsina (FIGURA 6),

TABLA III.- ACTIVIDAD DE UNION DE FRAGMENTOS Fc DE IgG A MACROFAGOS

Especie	Subclase de IgG	Actividad relativa de unión en:					
		IgG	Fab	Fc	iFc	Fc'	pFc'
Cobayo (Alexander, Leslie, y Cohen, 1976).	IgG2	1	+ 0.03	0.60	0.11	0.00	0.02
Ratón (Unkerless y Eisen, 1975).	IgG2a	1	0.00	0.20	--	--	--
Conejos (Ganezakowski y Leslie, 1979)	IgG	1	- 0.05	1.20	--	--	0.07
Hombre (Alexander y colaboradores, 1978)	IgG	1	--	0.30	--	--	0.07

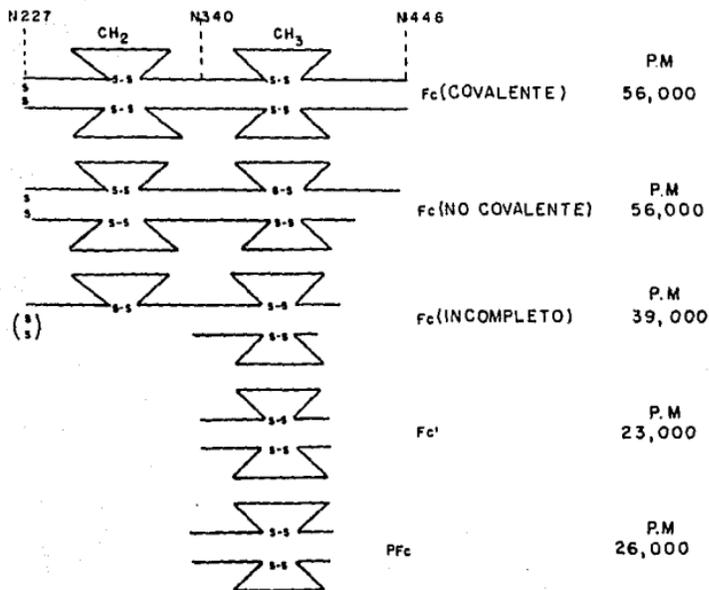


Figura 6 : Representación esquemática de los fragmentos Fc de IgG2 de cobayo obtenidos por hidrólisis con papaína y pepsina

experimentos, Alexander y sus colaboradores (1978) compararon la actividad citofílica de la IgG2 del cobayo con la IgG humana empleando macrófagos homólogos en la formación de rosetas y los monómeros de las IgG para inhibirlas.

Los resultados apoyan que el dominio C_H2 de ambas especies inhibieron la unión de los monómeros de IgG marcados con radioisótopos.

El porcentáje de máxima formación de rosetas graficado contra el logaritmo de la concentración de inhibición de las rosetas por la IgG intacta y el fragmento Fc fué similar.

El bloqueo parcial de las rosetas fué observado con el fragmento pFc' de las inmunoglobulinas humanas y de cobayos en sistemas homólogos. En ambos casos aún cuando la inhibición se hizo excediendo un 30% de la máxima concentración de inhibición examinada y el bloqueo de la actividad de pFc' fué consistente.

La determinación exacta del sitio responsable de la citofilia no ha sido llevado a cabo, sin embargo Ciccimara y colaboradores (37) reportaron (1975) que un decapeptido del dominio de C_H3 de IgG1 humana posee la actividad citofílica homóloga. Subsecuentemente se mostró por datos cristalográficos que este péptido, incluido dentro del dominio C_H3 , no es útil para la interacción con el receptor citofílico con ligandos largos en su forma nativa (37) .

HIPOTESIS

El uretano inyectado por vía intraperitoneal a ratones produce cáncer pulmonar experimental, sin embargo se desconoce la participación del sistema inmunocompetente en el desarrollo de los carcinomas pulmonares experimentales.

Una posible acción del uretano es sobre las células del sistema inmune, alterando los receptores para el fragmento Fc de IgG y C3b, especialmente en los fagocitos mononucleares pulmonares, disminuyéndose la cantidad de dichos receptores y/o modificando el funcionamiento correcto de los mismos, provocándose cambios en el procesamiento y presentación de los antígenos a los linfocitos T.

Otra alternativa sería el cambio de la afinidad por el fragmento Fc y C3b, debida posiblemente a que el uretano afecta la membrana e impide que se manifiesten, o que aun que se manifiesten no tengan la misma capacidad de reconocer al anticuerpo; inhibiéndose la regulación de la producción de anticuerpos y deprimiendo la inmunidad celular.

Inicialmente observaremos lo que sucede con dichos receptores "in vitro", que suponemos será alteración en la unión y afinidad por el fragmento Fc y C3b, comprobándolo por el número de rosetas formadas y la cantidad de eritrocitos presentes en cada roseta, y saber si se disminuye el número de los receptores o si sólo disminuye su afinidad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ya que aún se desconoce a que nivel de la respuesta inmune actúa el tabaco y sus derivados, para alterar la inmunidad humoral y celular, se decidió en este trabajo analizar el efecto del uretano, que es un compuesto presente en el humo del tabaco, sobre los receptores para el fragmento Fc de IgG y de C3b presentes en la membrana de los macrófagos alveolares de ratas.

MATERIAL Y METODOS

1.- Obtención de glóbulos rojos de carnero al 1%

Los eritrocitos de carnero permanecieron en una solución de Alsever (v/v), y se usaron de una a cuatro semanas después de haberlos tomado (14) .

La sangre se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos, se quitó el plasma sobrenadante, se lavaron los glóbulos rojos en 2 ó 3 veces su volumen de solución salina de fosfatos (SSF) pH 7.4 y se repitió el proceso tres veces.

Se tomó 1.0 ml del paquete globular y se llevó a un volumen final de 100 ml con SSF pH 7.4 adicionado de gelatina a una concentración de 1 mg/ml.

2.- Determinación de la unidad subaglutinante

Se colocaron 100 ul de cada una de las diluciones de anticuerpos contra glóbulos rojos de carnero (GRC) (hemolisina), y se añadió un volumen igual de una suspensión de eritrocitos de carnero al 1%. Se incubaron a 37°C por 30 minutos y se dejaron a 4°C durante una hora para observar la hemaglutinación.

Las diluciones del anti-cuerpo anti-GRC se efectuaron de la siguiente manera:

Dilución	ml de hemolisina	+	ml de SSF pH 7.4 con gelatina (1mg/ml)
1) 1:2	1.0		1.0
2) 1:20	0.1(1)		0.9
3) 1:40	0.5(2)		0.5

4)	1:80	0.5(3)	0.5
5)	1:160	0.5(4)	0.5
6)	1:320	0.5(5)	0.5
7)	1:640	0.5(6)	0.5
8)	1:1280	0.5(7)	0.5
9)	1:2560	0.5(8)	0.5
10)	1:5120	0.5(9)	0.5(desechar 0.5 ml)

La unidad aglutinante se dió en el tubo 6 que correspondió a una dilución de 1:320 y para la sensibilización de los eritrocitos se utilizó una dilución final de 1:640.

En toda ocasión en que se requirió de sensibilizar a los eritrocitos con hemolisina, ésta se diluyó 1:300 en SSF pH 7.4 y gelatina y se añadió un volumen igual de eritrocitos al 1%, y la dilución final de la hemolisina fué de 1:600.

Se colocaron 0.1 ml de hemolisina por cada 29.9 ml de SSF pH 7.4-gelatina. Se mezclaron la hemolisina (30 ml) y los eritrocitos de carnero al 1% (30 ml) y se incubaron a temperatura ambiente en agitación constante durante una hora. Se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante, se lavaron con un volumen dos veces mayor al del paquete globular de SSF pH 7.4-gelatina y se repitió el proceso 3 veces. Se resuspendió el botón en el volumen inicial de eritrocitos al 1% en medio de cultivo TC-199 conteniendo gelatina en una concentración de 1 mg/ml. Los glóbulos rojos de carnero al 1% sensibiliza -

dos con hemolisina fueron utilizados en la prueba de rosetas.

3.- Sensibilización de eritrocitos con G3b de rata

Los eritrocitos de carnero al 1% sensibilizados con hemolisina, se utilizaron para preparar los eritrocitos EAC3b, de la siguiente manera; se colocaron 4 ml de éstos eritrocitos con 4 ml de suero normal de rata diluido 1:50 en medio de cultivo TC-199 (0.1 ml de suero normal de rata con 4.9 ml de medio TC-199) .

Se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, y terminado el tiempo de incubación, se centrifugaron a 2000 rpm durante cinco minutos y sin lavar se resuspendieron en 4 ml de medio de cultivo TC-199-gelatina y antibióticos. Los eritrocitos permanecieron a 4°C hasta el momento de su utilización en la prueba de rosetas EAC3b.

4.- Prueba de rosetas para receptores del fragmento Fc de IgG y de G3b en macrófagos alveolares de rata

Se sacrificaron 3-5 ratas Wistar anestesiándolas con éter. Por punción cardíaca se obtuvo la sangre de la cual se separó el suero de rata normal, éste suero se utilizó en la sensibilización de eritrocitos para EAC3b.

Se realizó una incisión en el cuello y se disecó la tráquea para colocar un cateter por el cual se inyectaron 10ml de SSF pH 7.4 estéril, con penicilina y estreptomina; los pulmones se lavaron succionando 2 ó 3 veces la misma alcuota, que contenía a los macrófagos alveolares.

Se efectuaron tres lavados a cada rata y se mezclaron todas las alícuotas de las suspensiones alveolares manteniéndose a 4°C durante el proceso. Se centrifugó a 1000 rpm durante cinco minutos y se resuspendió el paquete celular en 2 ml de medio TC-199-gelatina y antibióticos.

Se tomó una muestra de 100 μ l y se mezcló con 100 μ l de azul de tripano al 0.2% en SSF. Se incubaron por cinco minutos y se colocó una muestra en la cámara de Neubauer, para determinar la cantidad y el porcentaje de viabilidad de los macrófagos presentes en las suspensiones alveolares.

De acuerdo a la cantidad de células alveolares se añadió el volumen de medio TC-199-gelatina-antibióticos necesario para obtener una concentración de 1×10^6 células/ml.

Los macrófagos se incubaron sobre un cubreobjetos de vidrio de 1 cm de diámetro y se depositó en un tubo de ensayo de fondo plano, se colocaron 200 μ l conteniendo 2×10^5 células, incubándose durante 60 minutos a 37°C y en ambiente húmedo, para permitir la adherencia al vidrio de los macrófagos.

Transcurrido el tiempo de adherencia se lavó con SSF pH 7.4-gelatina y antibióticos. estéril por 2 ó 3 veces y se eliminaron las células no adherentes y así se enriqueció la preparación con macrófagos alveolares.

Se marcaron los tubos y se añadieron 200 µl de las diluciones de uretano a los macrófagos adheridos al cubreobjeto, y se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente (20°C), después se lavaron con SSF pH 7.4-gelatina - antibióticos, para eliminar el exceso de uretano.

Se agregaron 200 µl de las suspensiones de los eritrocitos para formar rosetas EA y EAC3b, se incubaron a temperatura ambiente (20°C) durante una hora, para facilitar la formación de las rosetas y que los eritrocitos no fueran fagocitados.

Los cubreobjetos con los macrófagos y eritrocitos se lavaron con SSF pH 7.4-gelatina-antibióticos por 3 veces para eliminar los eritrocitos que no se unieron a los receptores correspondientes de los macrófagos.

Las células se fijaron con etanol al 96%, durante 6 minutos y se tiñeron las preparaciones con la técnica de Hematoxilina-eosina, en la cual para obtener buenos resultados deben considerarse los tiempos y el orden mencionados a continuación:

- | | |
|-----------------------------------|--------|
| 1) Fijar con etanol del 96% | 6 min. |
| 2) Hematoxilina | 5 min. |
| 3) Agua corriente | 10min. |
| 4) Eosina | 1 min. |
| 5) Etanol del 96% | 1 min. |

- 6) Etanol del 70% 1 min.
 - 7) Isopropanol 2 min.
 - 8) Isopropanol-xilol v/v 2 min.
 - 9) Xilol 2 min.
- 10) Montar con Bálsamo de Canadá, no muy concentrado para evitar la formación de burbujas que impidan contar al colocar la preparación en el microscopio.

Se contaron 300 células considerándose como rosetas aquéllas que tenían 3 ó más eritrocitos por célula. Además se agruparon de acuerdo al número de eritrocitos por célula en:

negativos, rosetas de 3 eritrocitos, 4 a 6 y más de 7 eritrocitos por macrófago.

ANEXO

Tabla IV.- Composición del medio de cultivo TC-199
para macrófagos.

compuesto	mg/L	compuesto	mg/L
L-arginina	70	Riboflavina	0.010
L-histidina	20	Piridoxina	0.025
L-lisina	70	Piridoxal	0.025
L-tirosina	40	Niacina	0.025
DL-triptofano	20	Niacinamida	0.025
DL-fenilalanina	50	Pantotenato	0.01
L-cistina	20	Biotina	0.01
DL-metionina	30	Acido fólico	0.01
DL-serina	50	Golina	0.50
DL-treonina	60	Inositol	0.05
DL-leucina	120	Ac. p-aminobenzoico	0.05
DL-isoleucina	40	Vitamina A	0.10
DL-valina	50	Calciferol(Vit.D)	0.10
DL-ácido glutámico	150	Menadiona(Vit.K)	0.01
DL-ácido aspártico	60	-tocoferol fosfato	
DL-alanina	50	(Vit.E)	0.01
L-prolina	40	Acido ascórbico	0.05
L-hidroxiprolina	10	Glutaciona	0.05
Glicina	50	Colesterol	0.20
Cisteína	0.1	Tween 80(ác.oléico)20	
Adenina	10	Acetato de sodio	50
Guanina	0.3	L-glutamina	100
Xantina	0.3	Adenosin-trifosfato	10
Hipoxantina	0.3	Acido adenílico	0.2
Tiamina	0.3	Nitrato férrico	0.1
Urecilo	0.3	Ribosa	0.5
Tiamina	0.010	Desoxirribosa	0.5

El medio TC-199 fué preparado de acuerdo a la fórmula dada por Morgan, Morton y Parker y Parker, excepto el contenido de la solución salina balanceada de Hanks (DIFCO).

Este medio contenía una solución salina balanceada con fosfatos. Se añadieron al medio gelatina (DIFCO) 1 mg/ml y dos antibióticos: estreptomina 50 μ g/ml y penicilina 100 U/ml. También se agregó HEPES (SIGMA Co.) 1M, 2ml por cada 200 ml de medio.

OTRAS SOLUCIONES

Solución de Alsever.-

Glucosa 2.05 g
Citrato de sodio 0.80 g
Cloruro de sodio 0.42 g

Se llevan a 100 ml con agua destilada y pH 6.1 con ácido cítrico. Esterilizar con filtro bacteriológico o al autoclave 10 minutos a 110°C y 10 libras (8) .

Solución salina de fosfatos pH 7.4-gelatina (SSP-G).-

Se utilizaron soluciones de cloruro de sodio, fosfato dibásico de sodio y fosfato monobásico de sodio (NaCl, Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4) todas en una concentración 0.15 M, para lo cual fué necesario preparar 900 ml de cloruro de sodio, pesando 7.89 g y disolviendo en agua destilada. Se disolvieron 2.12 g de fosfato dibásico de sodio en 100 ml de agua destilada y se mezclaron con los 900 ml de cloruro de sodio, se ajustó el pH a 7.4 con los 50 ml de fosfato monobásico, que tienen disueltos 1.03 g del compuesto.

Se esterilizó y cuando se enfrió se añadieron los antibióticos y la gelatina al 5% de acuerdo a las siguientes cantidades:

Gelatina 5% 0.4 ml por cada 20 ml de SSF.

Estreptomicina 100 μ g por cada 1 ml de SSF.

Penicilina sódica 100 U por cada 1 ml de SSF.

Se guardó en refrigeración para utilizarlos en el lavado de los glóbulos rojos de carnero y para los lavados de pulmón en las ratas, así como los cubreobjetos con los macrófagos adheridos.

Solución de azul de tripano al 0.2% .-

La preparación de la solución de azul de tripano para determinar la viabilidad de las células, se hizo pesando 20 μ g de azul de tripano y se disolvieron en 10 ml de SSF pH 7.4-gelatina-antibióticos y se guardó a 4°C hasta que se utilizó.

RESULTADOS

El número de rosetas formadas entre los EA y los EAC3b con los macrófagos alveolares provenientes de ratas Wistar tuvo pequeñas diferencias que no fueron significativas (Tabla 5); considerándose además que la purificación de los macrófagos por medio de la adherencia al vidrio dá por resultado una población celular uniforme en la expresión de receptores para Fc y C3b (Tabla 5). Sin embargo se observaron diferencias morfológicas en el tamaño de las células (Figura 1A), algunas de éstas presentaron 2 ó más núcleos (Figura 2 y 3 A) y el citoplasma de algunos macrófagos contenía mayor cantidad de vacuolas (Figura 1A).

La viabilidad de los fagocitos extraídos . medida por la exclusión de azul de tripan, fué mayor del 85% y sumada a la adherencia al vidrio, que requiere la vitalidad celular, dió una viabilidad final mayor del 95% en las células adheridas, ya que los macrófagos muertos no se adhieren al vidrio (Figura 2A).

La purificación de los macrófagos por la técnica de adherencia permite la eliminación de las células no adherentes y de los glóbulos rojos de la rata que contaminaron ocasionalmente a las suspensiones celulares (Figura 2A).

En las preparaciones de macrófagos que sirvieron como cultivos controles el porcentaje de rosetas totales fueron desde 90 al 95% para EA y 86 a 89% para EAC3b (Tabla 6) .

TABLA V.-

EFFECTO DEL URETANO SOBRE LOS RECEPTORES		Fc DE IgG Y DE C3b DE MACROFAGOS DE RATA.											
		MΦ	MΦ	MΦ	MΦ	MΦ	MΦ	MΦ	MΦ	MΦ	MΦ	MΦ	MΦ
		-	3E	4-6E	+7E	-	3E	4-6E	+7E	-	3E	4-6E	+7E
CONTROL	EA	7.3*	4.6	14.3	73.°	10.*	3.5	15.0	71.°	5.0*	7.0	9.0	79.°
	EAC3b	12.0	18.0	57.0	13.~	14.0	6.0	73.0	7.~	11.0	3.0	77.0	9.~
URETANO 10*	EA	60.3	31.3	7.0	1.3	69.0	20.0	6.5	4.5	64.0	21.0	9.0	6.0
	EAC3b	85.4	4.6	7.0	3.0	84.0	3.0	9.5	3.5	81.0	6.4	9.0	3.6
URETANO 1*	EA	65.8	16.6	10.0	7.6	63.3	17.7	11.0	8.0	61.0	14.0	16.0	9.0
	EAC3b	64.7	16.3	15.0	4.3	67.5	17.5	13.0	2.0	64.6	15.0	15.0	5.4
URETANO 0.1*	EA	60.4	15.3	15.3	9.0	58.4	15.8	14.2	11.6	55.0	11.0	19.0	15.0
	EAC3b	58.8	18.6	13.0	9.6	55.9	16.0	15.6	12.5	56.5	5.0	22.0	16.5
URETANO 0.01*	EA	56.1	14.3	18.3	11.3	51.0	11.3	20.0	17.7	46.0	10.6	25.5	18.0
	EAC3b	27.1	22.3	32.3	18.3	52.6	2.0	32.0	13.4	47.4	10.0	30.0	12.6
URETANO 0.001*	EA	16.7	14.0	24.0	45.3	11.0	5.0	21.3	62.7	9.3	6.6	32.1	52.0
	EAC3b	11.8	11.3	60.6	16.3	17.0	6.6	61.0	15.4	11.9	17.1	56.0	15.0
URETANO 0.0001*	EA	6.1	3.3	13.0	77.6	2.0	1.0	22.0	75.0	0.5	2.6	10.0	86.9
	EAC3b	11.5	16.6	60.3	11.6	9.3	0.5	74.0	16.2	1.6	8.4	77.0	13.0

MΦ MACROFAGOS

E ERITROCITOS

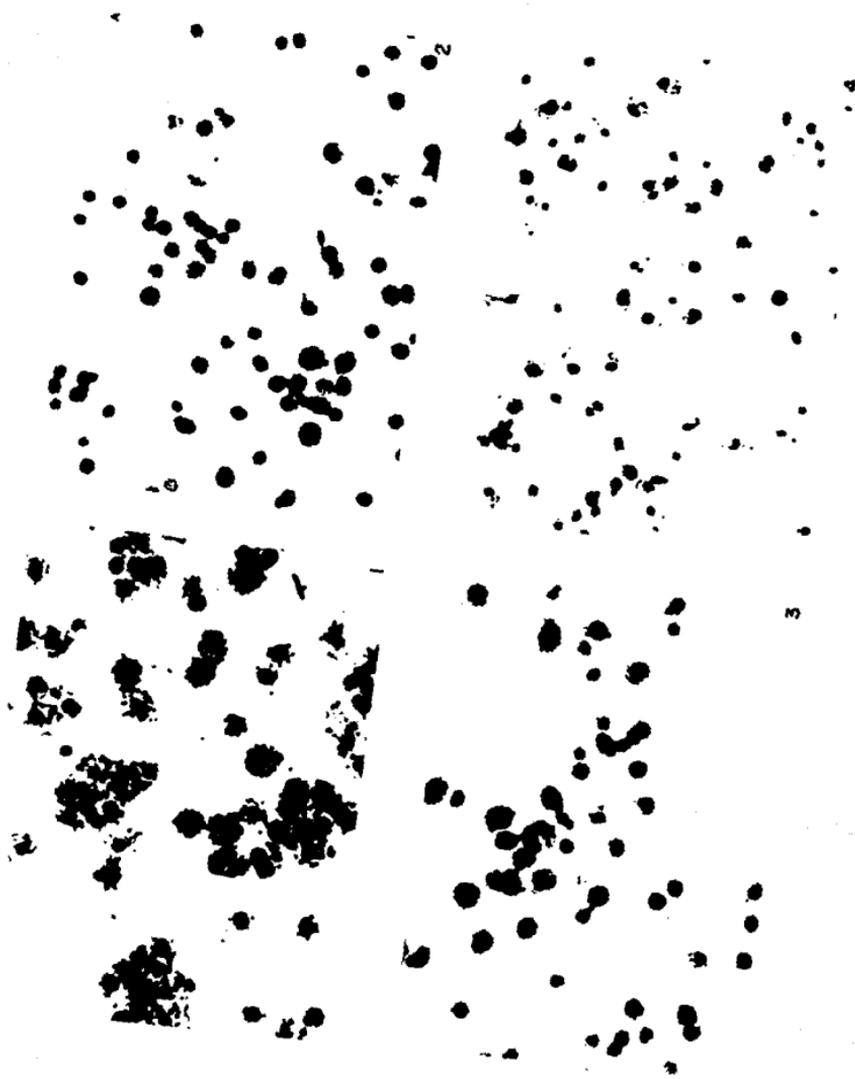
* % DE ROSETAS

° DE 15 A 20 E

~ DE 8 A 13 E

EAC3b EA + EAC3b

A



" FIGURA A "

Se muestran los macrófagos alveolares formando rosetas con eritrocitos cubiertos de IgG anti-glóbulos rojos de carnero (1).

Se consideraron positivos los que tienen 3 ó más eritrocitos por célula.

La población de células adherentes muestra diferencias en el tamaño y en las vacuolas citoplásmicas (1).

Los macrófagos adheridos al vidrio y después tratados con uretano (10 y 1 mg/ml) no se desprendieron, conservándose la heterogeneidad morfológica pero el número de rosetas disminuyó notablemente (2 y 3). Concentraciones decrecientes de uretano afectan en menor grado la membrana del macrófago y se observan células formadoras de rosetas (4).

La dosis de uretano correspondiente a 10 mg/ml disminuye hasta el 31% a las rosetas EA y 14% a las EAC3b; concentraciones mayores de uretano provocan la destrucción de la mayor parte de los fagocitos mononucleares (datos no presentados).

Al ir disminuyendo la cantidad de uretano se observó el incremento del porcentaje de rosetas y con 0.001 mg/ml se tuvieron valores cercanos a los obtenidos en los cultivos controles (Tabla 6).

Un dato preliminar, que requiere ser analizado, es que con 0.0001 mg/ml se notó un discreto incremento del número de rosetas comparado con los controles siendo este del 94 al 99% para EA y de 88 a 98% para EAC3b, por lo que se consideró la posibilidad de una estimulación de los macrófagos por el uretano que ocasionó una mayor expresión de los receptores estudiados (Tabla 6).

Con el fin de evaluar la eficiencia de los macrófagos para formar rosetas se decidió agruparlos de acuerdo al número de EA ó EAC3b por cada célula fagocítica con los siguientes valores: 0 a 2; negativos y 3, 4 a 6 y más de 7 eritrocitos por célula, como positivos.

Los controles tuvieron entre 71 y 79% de rosetas EA con más de 7 eritrocitos por célula. Para EAC3b fueron de 57 a 77% de rosetas con 4 a 6 eritrocitos por célula.

Con la dosis de 10 mg/ml de uretano las rosetas EA disminuyen notablemente y además la mayoría de las rosetas so

		TABLA VI. TOTAL DE POSITIVOS		
CONTROL	EA	92.5 **	90.0	95.0
	EAC3b	88.0	86.0	89.0
URETANO 10*	EA	39.6	31.0	36.0
	EAC3b	14.7	16.0	19.0
URETANO 1*	EA	34.4	36.7	39.0
	EAC3b	35.7	32.5	35.4
URETANO 0.1*	EA	39.6	41.6	45.0
	EAC3b	41.4	44.1	43.5
URETANO 0.01*	EA	44.0	49.0	54.0
	EAC3b	73.0	47.4	52.6
URETANO 0.001*	EA	83.4	89.0	90.7
	EAC3b	88.4	83.0	88.1
URETANO 0.0001*	EA	94.0	98.0	99.5
	EAC3b	88.7	90.7	98.4

* mg / ml

** Porcentaje de Rosetas.

EAC3b EA + EAC3b

TA TESIS NO DEBE
LA BIBLIOTECA

lo tuvieron 3 EA por fagocito (21 a 31%) (Tabla 5).

Las rosetas con EAC3b presentaron un porcentaje simi -
lar con 3, 4 a 6 y 7 eritrocitos por célula (Tabla 5) .

Las concentraciones de uretano con 0.001 a 0.0001 mg/ml
no modificó el porcentaje total de rosetas (Tabla 6) e
inclusive parece que se produjo un discreto incremento
(Tabla 6) . Las células fagocíticas con más de 7 EA o
con 4 a 6 EAC3b se encontraron con valores parecidos a los
observados en los controles (Tabla 5) .

Con 0.001 mg/ml de uretano se modificó la relación de
EA o EAC3b con respecto al macrófago, disminuyéndose el
número de eritrocitos por célula (Tabla 5), aunque el
porcentaje total se acercó al valor de los controles (Ta-
bla 6) .

Estos datos apoyan que posiblemente el uretano afecta
a las moléculas que estan en la superficie de la membrana,
ya sea por ocasionar un daño en la misma e impedir que los
receptores se manifiesten, o porque ya manifestados alte -
re su estructura, siendo esto para los receptores para Fc
y C3b (Tablas 5 y 6), que se manifestó por la disminu -
ción en el porcentaje de rosetas y un menor número de EA
o EAC3b por macrófago (Figuras B y C) .

B



" FIGURA B "

Las células tratadas con 0.01 (1), 0.001 (2), 0.0001 (3) y 0.00001 mg/ml de uretano (4), presentaron características morfológicas similares a las señaladas en la figura A y en las preparaciones con 0.0001 (3) y 0.00001 mg/ml (4) de uretano tuvieron una cantidad de rosetas parecidas a las células controles no tratadas.



" FIGURA C "

Se muestran los macrófagos alveolares controles formando rosetas con eritrocitos cubiertos con el fragmento C3b. Las concentraciones elevadas de ureta no provocaron una drástica disminución de las rosetas, y solo con 0.1 mg/ml (2) se logró observar la formación de algunas rosetas. Algunos de los macrófagos fueron binucleados (2 y 3).

Las concentraciones de 0.001 mg/ml no afectaron la formación de rosetas EAC3b (4) .

DISCUSION DE RESULTADOS

Se considera que al inhalar el humo procedente de la combustión de un cigarrillo se introducen al organismo múltiples compuestos entre los que se encuentra el uretano (Tabla 1, 13) el cual tiene diversas acciones sobre las células de mamíferos y aquí se demostró el efecto dosis-respuesta y los cambios que se produjeron en los receptores de macrófagos alveolares cultivados " in vitro " (7, 12, 22, 34, 37, 40, 41, 42).

El uretano es citotóxico para los macrófagos a la concentración de 10 mg/ml, sin embargo quedaron adheridos al vidrio algunas células las cuales estuvieron lesionadas(Figura 2A, 1 y 2B). Dosis menores de uretano pueden afectar a los receptores para Fc y C3b pero se desconoce el tipo de cambios moleculares sobre dichos receptores.

Los experimentos realizados fueron de corta duración, por lo cual desconocemos lo que ocurre a largo plazo a las células y en particular a los receptores para Fc y C3b.

También parece que los receptores para C3b fueron más susceptibles al uretano a dosis de 10 mg/ml comparativa -mente con los receptores para Fc, lo cual se podría explicar tomando en cuenta las características fisicoquímicas de cada receptor (1, 18, 37) .

En la figura 1 se esquematiza el posible papel del humo de tabaco sobre los elementos del sistema inmunocompetente; si solo tomamos en cuenta el daño que produce el uretano sobre los macrófagos y los linfocitos B, haciendo hincapié en que ambas poblaciones tienen receptores para Fc, para C3b o para ambos, con lo cual se modificará el funcionamiento regular de la respuesta inmune, ya sea por la citotoxicidad del uretano o porque la concentración del uretano modifica a los receptores inhibiéndolos o aumentando su expresión, circunstancias que alteran la inmunoregulación.

El 90% del uretano introducido al organismo por diversas vías se elimina en el aire espirado a través de los pulmones, sitio en el cual se encuentran macrófagos y linfocitos (17, 37) por lo cual se tiene la posibilidad de modificar la respuesta inmune " in situ " y favorecer el desarrollo de adenocarcinomas pulmonares, lo cual puede ser debido también al efecto del uretano sobre las células pulmonares (Figura 1) .

El uretano asociado o no a otros compuestos del humo del tabaco interactúa con el sistema de la coagulación y del complemento activándolos y da lugar a cambios inflamatorios, los que a su vez permitirán la atracción de mayor cantidad de células inmunocompetentes favoreciéndose la retención de los productos derivados del humo del tabaco que son inhalados por los individuos fumadores (42, 43) .

Los receptores para Fc de IgG reconocen diversas porciones de los dominios C_H2 y C_H3 de IgG lo cual sugiere que existe una microheterogeneidad en los receptores o bien en los macrófagos, que posiblemente durante la maduración de los fagocitos mononucleares hay una selección de estos que puede reconocer con mayor eficiencia la región correspondiente al Fc de IgG. Lo anterior implica diferencias moleculares de los receptores y explicaría porque algunas células tienen receptores más resistentes al efecto del uretano (7, 12, 22).

Los receptores para C3b también tienen diferencias moleculares que apoyaran la propuesta para receptores de Fc.

CONCLUSIONES

En los macrófagos alveolares incubados con diversas cantidades de uretano se pierde su capacidad para reconocer el fragmento Fc de IgG (EA) y al fragmento C3b (EA C3b).

Este fenómeno es dependiente de la concentración de uretano con la cual se incubaron los macrófagos.

El receptor para C3b fué más sensible al efecto del uretano comparativamente con el receptor para Fc tomando en cuenta el porcentaje de positividad y el número de eritrocitos unidos a cada macrófago.

Los macrófagos incubados con 12 ó más mg/ml de uretano fueron destruidos y con dosis de 10 mg/ml ó menores se detectó que la viabilidad de estas células fué buena al evaluar su capacidad de adherencia al vidrio y al determinar las células formadoras de rosetas.

En base a los resultados se puede especular que los macrófagos alveolares pueden ser dañados en diversos grados por el uretano y que los receptores para Fc de IgG y para C3b pueden alterarse por el uretano provocándose una modificación en el proceso de regulación de la respuesta inmune en el tracto respiratorio.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Ahearn M. Joseph and Fearon T. Douglas. Structure and function of the complement receptors. Adv. in Immun. Vol. 46 : 183 - 219, 1989.
- 2) Bagasra, O., Howeedy, A., & Kajdacsy A., Balla : "Macrophage function in chronic experimental alcoholism". Modulation of surface receptors and phagocytosis. Immun. 65 : 405, 1988.
- 3) Bellenger J. M. : "Experimental effect of cigarette smoke on human respiratory cilia". New Eng. J. Med. 263 : 832, 1960.
- 4) Benedict, W. P., Rucker N., Faust, J. and Kouri, R.E. : " Malignant transformation of mouse cells by cigarette smoke condensate ". Cancer Res. 35 : 857, 1975.
- 5) Berwald, Y. & Sachs, L. : " In vitro cell transformation with chemical carcinogens ". Nature (Lond.) 200, 1182, 1963.
- 6) Blenton, R. H., Lyte, M., Meyers, M.J. and Bick, P.H. : " Immuno-moculation by polyaromatic hydrocarbons in mice and immune cells ". Cancer Res. 46 : 2735, 1986.
- 7) Boyland, E. : " The Biochemistry of urethane ". N. Z. Med. J. 67 : 4, 1968.
- 8) Bukantz, S.C., Rein, C. R., Hent, D.F.J. : Soluciones, Lab. Clin. Med. : 31 : 394, 1946.
- 9) Cano Valle F. : " Tabaquismo ". Rev. Fac. Med.(México) 27 : 46, 1984.
- 10) Chávez. J. : " Estudio " in vitro " para determinar el efecto de la combustión del tabaco sobre las propiedades inmunológicas de la albúmina. Tesis. Fac. Quím., U.N.A.M., 1987.
- 11) Choy, Janet W., Carl G. Becker, et. al. : Effects of tobacco glycoprotein (TGP) on the Immune System. " I-TGP Is a T-independent B Cell mitogen for murine Lymphoid cells ". J. Immun. Vol. 134: 3193, 1985.

- 12) Cornam, I. : " The properties of urethan considered in relation to its action on mitosis ". Int. Rev. Cyto. 3: 113, 1954.
- 13) Costabel, U., Bross, K.J., Renter, G., Ruhle, K.H. and Matthyss, H. : Alterations in immunoregulatory T-cell subsets in cigarette smokers. Chest. 90 : 39, 1986.
- 14) E. Kabat y M.Mayer. : Capítulo IV: Complemento y fijación de complemento. Inmunoquímica experimental. La Prensa Médica Mexicana: 123-126. Mexico, 1968.
- 15) Francus, Tovar., Renate F. Klein, et. al. : Effects of tobacco glycoprotein (TGP) on the Immune System. " II-TGP stimulates the proliferation of human T cells and differentiation of human B cells into Ig secreting cells". J. Immun. Vol. 140 : 1823, 1988.
- 16) Francus, Tovar., Yoseff Francus, et. al. : Effects of tobacco glycoprotein (TGP) on the Immune System. "III-The effect of aging on the mitogenic response of Human peripheral blood Lymphocytes to TGP". Cell. Immun. 105 : 1-8, 1987.
- 17) Fudenberg, H., Stites P. D., Caldwell L. J. and Wells V. J. : Inmunología Clínica, 6a. éd., Ed. El Manual Moderno S. A., México 29, 1982.
- 18) Gordon D. Ross and M. Edward Medof⁺ . : " Membrane complement receptors specific for bound fragments of C3 ". Adv. Immunol. Vol. 37 : 217-267, 1985.
- 19) Harris J., Swenson E. and Johnson III J. : " Human alveolar macrophages: Comparison of phagocytic ability, glucose utilization and ultrastructure in smokers and non smokers ". J. Clin. Invest. 49 : 2086, 1970.
- 20) Holt G. Patrick and David Keast. : " Environmentally induced changes in immunological function: Actue and chronic effects of inhalation of tobacco smoke and other atmospheric contaminants in Man and ~~s~~xperimental animals". Bact. Rev. Vol. 41 : 205, 1977.

- 21) Hughes D. A., Haslam P. L., P.J. Townsend & M. Turner Warwick. : " Numerical and functional alterations in circulatory lymphocytes in cigarette smokers ". Clin. Exp. Immun. 61 : 459-466, 1985.
- 22) IARC. : " Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans ". Lyon, France. 7 : 111, 1974.
- 23) Jacob C.V., G.T. Stelzer, and J.H. Wallace. : " The influence of cigarette tobacco smoke products on the immune response. The cellular basis of immunosuppression by a water-soluble condensate of tobacco smoke ". Immunol. 40 : 621, 1980.
- 24) Kier, L. D., Yamasaki, E. and Ames, B. N. : " Detection of mutagenic activity in cigarette smoke condensate ". Proc. Natl. Acad. SCI (USA) 71 : 4159, 1974.
- 25) Low R. : " Protein biosynthesis by the pulmonary alveolar macrophage: conditions of assay and effect of cigarette smoke extracts ". Am. Rev. Resp. Dis. 110 : 466, 1974.
- 26) Martínez, R.D. : " El cáncer y las metástasis asociadas al tabaquismo ". En : Mensaje Bioquímico 9 : 183, 1986. Ed. U.N.A.M.
- 27) Martínez, R. D. and Montfort, I. : " A study of the specificity of alveolar macrophages antigens ". Immunol. 25 : 197, 1973.
- 28) Martínez, R. D. y Preciado A. : " La respuesta inmune humoral contra el tabaco en individuos fumadores y no fumadores " . la. Reunión de alumnos de Maestría y Doctorado en Biomedicina, p. 112, 1982, México.
- 29) Martínez, R. D. and Ulloa, S. : " Effect of extracellular products of streptococcus on macrophage Fc receptors for IgG " . Allergol. Immunopathol. 14 : 183, 1986.

- 30) Morales, J. : " Estudio inmunoserológico de los anticuerpos contra antígenos del tabaco en el infarto al miocardio ". Tesis. ENEP Zaragoza, U.N.A.M., 1984.
- 31) Moreno, García A. : " Caracterización de los complejos inmunes circulantes tabaco-antitabaco en pacientes con enfermedades pulmonares ". Tesis. Maestría. Div. Estudios Posgrado. Fac. Medicina U.N.A.M., 1986.
- 32) Müller-Eberhard Hans J. : "Molecular organization and function of the complement system. Ann. Rev. Biochem. 57: 321-347, 1988.
- 33) Nakayama, T. : " Cigarette smoke induces DNA-single-strand breaks in human cells ". Nature 314 : 462, 1985.
- 34) Nettleship, A. Henshaw, P.S. & Meyer, H.L. : " Induction of pulmonary tumors in mice with ethyl-carbamate". J. Nat. Cancer. Inst. 4 : 309, 1943.
- 35) Neyman, J. and Scott, E. L. : " Statistical aspects of the problem of carcinogenesis ". En: Proceedings of the fifth Berkeley Symposium. " p. 745, Univ. of California, Press. USA, 1967.
- 36) Obe, G., Vogth, H. J., Madle, S., Fahning, A. and Heller, W. D. : " Double-blind study on the effects of cigarette smoking on the chromosomes of human peripheral blood lymphocytes in vivo ". Mutat. Res. 92 : 309, 1982.
- 37) R.G.Q. Leslie and M.D. Alexander. : Cytophilic Antibodies. Current topics in Microbiology and Immunology. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. New York, 48-52, 1980.
- 38) Rojas, W. : Inmunología, 4a.ed., Ed. Colina, Columbia, 875, 1978.

- 39) Rubio, M. H. y Selman, L.M. : " El cigarro nos consume"
ICYT. Vol. 9 : 124 : 38-40, 1987.
- 40) Shimkin, M. B. and Stoner, G. D. : " Lung tumors in
mice : Application to carcinogenesis bioassay " . Adv.
Cancer. Res. 21 : 1, 1975.
- 41) Sichak, S. P. and O'Flaherty, E. J. : " Consideration
of the mechanism of pulmonary adenogenesis in urethane-
treated mice ". Toxicol. Appl. Pharmacology 56 : 397,
1984.
- 42) Thomassen, M. J., Barna, E. P., Weidemann, H. P., Farmer,
E. and Ahmad N. : " Human Alveolar Macrophage Function,
Differences Between Smokers and Nonsmokers ". J. Leu -
kocyte. Biol. 44 : 313, 1988.
- 43) Vainio, H. and Heseltino, E. : " Tobacco and Cancer ".
Cancer Res. 46 : 444, 1986.
- 44) Wynder, E.L. and Hoffmann, D. : " Experimental tobacco
carcinogenesis ". SCIENCE 162 : 862, 1968.