

142
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTANDARIZACION DE UN ENSAYO
COLORIMETRICO PARA LA CUANTIFICACION DE
ERITROFAGOCITOSIS EN MACROFAGOS:
SU APLICACION AL EFECTO MODULADOR
DE IL-1 E IL-6

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ISABEL PEREZ CRUZ



MEXICO, D. F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



DEDICADA TOTALMENTE

A LA FAMILIA PERRIN

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que contribuyeron, de alguna u otra manera, a la realización de este trabajo: el personal de los bioterios del IFC, del INP, del IBB (Juan, Beto y el Dr. Lomel), a las secretarías del Departamento de Inmunología, Soffa, Amada e Isabel y al personal de la biblioteca. Agradezco a los integrantes del personal académico de Insituto, estudiantes e investigadores, que siempre me prestaron su ayuda.

En especial, a mis adoradas compañeras, Marthita, Claudita, Carlita, Dianita, Martha Patricita; a Gino, Vero, la otra Claudia, Lulusa, Normita, Norma, Alejandro, Ernesto, Salvador, Beto, Vicky, Bertha Espinoza, Germán, Julio César y Chayo. Muchos besos para todos.

Mención especial también a mis amigos de la gloriosa Facultad de Ciencias, Aquiles, Javiero, Hugo, Angel, Arturo, Gloria, Horacio R y Horacio B., Jorgelina, Ricardo, Rómulo, la Chfo y Ariel, Edna, Eduardo M., mister Grecos, Janet, etc.

Mención especial también para Diana Jasso, Mireya, Miguel Angel, Rosalba, Paty, Carmen y Virginia.

A Horstensia González, Humberto Arce y escuincles, muchísimas gracias

Chivis, León y a mis inigualables y entrañables amigos , Monci y Alfredivo,
mucho cariño y besos. Para Lalito más besos todavía.

A los nuevos Zapatistas, por su dignidad.

Muchas gracias a Enrique Ortega por el apoyo y la enseñanza, que nos
ofrece con mucha generosidad, por ser paciente y comprensivo con nosotras.

Gracias sobre todo a mi mamá, a Claudia, Alo y Gabo, y perros de chicle
que los acompañan.

RESUMEN

La fagocitosis es una función conservada a lo largo de la evolución de los seres vivos; en el sistema inmununitario es una función efectora. El macrófago lleva a cabo dicha función a través de receptores para inmunoglobulina, complemento y receptores inespecíficos.

Un modelo ampliamente usado para el estudio de este fenómeno, es la fagocitosis de eritrocitos de carnero, realizada por macrófagos murinos.

La cuantificación de la fagocitosis es necesaria para evaluar la respuesta y el fenómeno inmunitario. Para la cuantificación de la ingestión se emplea generalmente la evaluación microscópica, técnica laboriosa y con varias desventajas. Este trabajo describe un método colorimétrico que, en contraste, permite evaluar rápida y fácilmente una amplia gama de condiciones para la fagocitosis de eritrocitos.

El método está basado en la característica de pseudoperoxidasa de la hemoglobina, que cataliza la oxidación de diaminobenzidina para generar un producto colorido. La fagocitosis de eritrocitos se puede evaluar entonces, fácilmente, por espectrofotometría.

Gracias al método estandarizado en esta tesis se evaluaron distintas condiciones de la fagocitosis, llevadas a cabo por macrófagos murinos, a través de sus receptores para IgG.

INTRODUCCION

1. EL SISTEMA INMUNOGENICO

El sistema inmunogénico de los vertebrados es el resultado de la evolución de un primigenio mecanismo de autoreconocimiento. Este es un fenómeno conservado a lo largo de toda la historia evolutiva de procariotos y eucariotos, lo que pone de relieve lo vital que para el individuo y para la especie es.

La importancia de reconocer lo que se encuentra en los alrededores es fácil de explicar: En ellos se encuentran los insumos, por un lado y por el otro individuos de otra y de la misma especie, hecho este último relevante porque no hay evolución, adaptación ni proceso semejante, sin la interacción de las poblaciones de la especie. Ciertos procesos deben poder realizarse entre individuos que, perteneciendo a la misma población dentro de una especie, puedan reconocerse. Las bacterias simbióticas debieron, desde su aparición, reconocer atinadamente a su hospedero de entre todo lo que el medio les ofrecía. De esa forma surgieron los eucariotos. El reconocimiento de lo inmediato es asimismo crucial en el surgimiento de los primeros seres pluricelulares: células de la misma especie se reúnen en una población primariamente diferenciada (tipo *Volvox sp*),

debiendo las células reconocerse entre sí específicamente, y asociarse. Posterior a esto, la diferenciación en las funciones implica una diferenciación en las proteínas expuestas y sin embargo el reconocimiento como células pertenecientes a la misma organización no solo no debe perderse, sino que debe agudizarse permitiendo así la diferenciación y especialización celular.

En los metazoarios actuales más sencillos, como las Phyla Porifera, Cnidaria y Nemertina, encontramos un bien establecido sistema de reconocimiento, que les permite el rechazo de implantes artificiales y de infecciones provocadas (1). El papel de ese rudimentario sistema de los invertebrados marinos es el de mantener la homeostasis del individuo ante células alogénicas e inclusive autógenas, empleando mecanismos citotóxicos y fagocíticos. Este sistema fácilmente puede ser considerado análogo al sistema inmunológico de los vertebrados.

En los cordados las funciones de reconocimiento de lo propio y lo ajeno se especializan, desarrollándose varios tipos y subtipos celulares, que llevan a cabo funciones específicas. Al parecer la complejidad de las nuevas relaciones que surgieron con estos animales, los cordados, demandaba una mayor rigurosidad para detectar y deshechar elementos indeseables, que se diversificaron y especializaron a su vez, como es el caso de los parásitos. De esta forma, en todos los vertebrados encontramos productos de los genes del MHC-I y MHC-II. Todas estas nuevas

adaptaciones han evolucionado con la aparición de nuevos grupos de animales y así tenemos que mientras en los peces cartilagosos el repertorio de inmunoglobulinas es limitado y éstas tienen una baja afinidad por el antígeno, en los mamíferos, uno de los grupos taxonómicos más recientes, poseen un repertorio más amplio de inmunoglobulinas, que a su vez presentan altas afinidades.

En los mamíferos es, pues, donde se puede definir al sistema inmunogénico con todo rigor. Compuesto de células que tienen un origen común, la médula ósea vía el sistema hematopoyético, el sistema inmunogénico de cada individuo se encarga de rechazar el establecimiento de células que no son las propias y/o normales. Aunque su modulación sobre y por el otro gran sistema corporal, el neuroendócrino, es ya más que evidente, se le conoció originalmente por su faceta "defensiva", en la que abundaremos.

Las células protagonistas de este sistema son los linfocitos T, B y NK (Natural killer), y el grupo de los monocitos-macrófagos. Las células mastoides, polimorfonucleares y plaquetas participan también en las reacciones que confieren inmunidad al individuo, aunque no siempre son consideradas células del sistema inmunogénico (2). Por otro lado, las actividades de todas estas células son reguladas a través de productos protéicos solubles que se conocen como citocinas.

Una característica básica del sistema inmunogénico de los vertebrados es su capacidad de anticiparse a la presencia y al reto de todo antígeno posible: el organismo no necesita tener contacto con la molécula antigénica para poder expresar receptores específicos para ella, anticuerpos y receptor de células T (el TCR). Esto se logra en parte gracias a la segunda gran ventaja del sistema: la versatilidad para formar, a partir de un reducido número de genes, la variedad necesaria de receptores para asegurar la capacidad de respuesta contra todo antígeno posible. Así, en las etapas embrionarias tempranas de un vertebrado, los linfocitos T juegan con los elementos genéticos que codifican para las distintas cadenas del TCR, logrando un número enorme de combinaciones a partir de un número original relativamente pequeño. Cada linfocito poseerá el resultado de una de esas combinaciones, dando origen a una clona que ofrecerá especificidad ante un grupo de antígenos único, en combinación con las moléculas presentadoras de antígeno, del MHC-II. El riesgo obvio es que dentro de esa enorme variedad de moléculas receptoras de antígenos, aparezcan algunas clonas autoreactivas. Por mecanismos que aún no conocemos con detalle, en el timo fetal se seleccionan negativamente las clonas autorreactivas y se eliminan, favoreciéndose así la existencia y posterior expansión de las que no lo son.

Para los linfocitos B, la generación del repertorio de anticuerpos, o inmunoglobulinas (Ig), a partir de un limitado número de genes tiene el mismo principio que para los linfocitos T: rearrreglo de los genes para las inmunoglobulinas y expresión de sólo una combinación como resultado para cada célula B, misma que dará lugar a una clona. Estas moléculas, gracias a su porción antígeno específica y a su porción Fc, afín a receptores de la membrana celular, tienen como funciones mediar fagocitosis vía receptores para Ig (FcR), remoción de los complejos antígeno-anticuerpo, promoción de la degranulación de algunas células, activación de la cascada del complemento (3). De estas últimas no hablaremos aquí.

El sistema actúa con base en la presentación del antígeno. En el caso de un autoantígeno, cada célula nucleada del cuerpo está facultada para presentarlo, embebido en una molécula especial para ello, producto del MHC-I. Así permite que se le reconozca como una célula normal y propia. Cuando un agente extraño penetra al organismo, la voz de alarma debe sonar. El macrófago lo ingiere, lo digiere y muestra los fragmentos embebidos en una molécula especializada para ello (del MHC-II) y que debió derivar de la molécula de autorreconocimiento (MHC-I). A continuación los grandes directores de la orquesta, los linfocitos T, son activados selectivamente por la presentación de ese antígeno; se activa a los

linfocitos B, se producen anticuerpos, se activa a la células mastoides, a megacariocitos, etc. En el caso de una célula transformada, se le reconoce por la exposición de antígenos transformados. Algunas fases de la respuesta son inespecíficas: no precisan anticuerpos ni se valen de receptores dirigidos a un antígeno en particular. Ejemplos de esto son la fagocitosis realizada por neutrófilos y la actividad bactericida de los eosinófilos, cuya importancia en la defensa del organismo se evidencia por la susceptibilidad a infecciones de los individuos que carecen del número normal de estas células. Aunque cada respuesta es predominantemente celular o mediada por anticuerpos, no cabe la menor duda de que el sistema funciona como un todo, que se coordina y modula gracias a la participación de todos sus miembros.

2. EL MACROFAGO EN EL SISTEMA INMUNOGENICO.

2.1 FILOGENIA

Ya en algunos grupos de invertebrados, como las esponjas, se distinguen células especializadas para realizar fagocitosis, lo que ilustra el hecho de que las estrategias de defensa son tan antiguas como los grupos taxonómicos de los que hemos hablado (1). Al comparar entre organismos, sin embargo, encontramos que estas células presentan, en los grupos más recientes y especializados, mayor

amplitud de acciones y capacidad de regulación del sistema al que pertenecen, hasta llegar a una célula tan versátil como el macrófago del sistema inmunogénico de los mamíferos.

2.2 ONTOGENIA

La médula ósea es lugar de origen del grueso contingente de células del sistema inmunogénico: linfocitos, monocitos y macrófagos, células mastoides, etc. La trayectoria ontogénica de las células que pueblan la médula ósea es por sí misma interesante: las primeras células hematopoyéticas en los embriones de los vertebrados, aparecen en los islotes sanguíneos del corion. Gracias a la conexión vascular que se establece entre este último y el hígado del embrión, la descendencia de estas células se aloja en el hígado, posteriormente en el bazo y finalmente, en la médula ósea. En este tejido medular encontramos a los precursores de varios tipos celulares. Uno de ellos es el conocido como Unidad Formadora de Colonias Granulocito-Macrófago (CFU-GM), del que se derivan tanto monocitos como neutrófilos, vía promonoblastos y promielocitos, respectivamente (4).

Elie Metchnikoff, a principios del siglo pasado, en sus observaciones de tejidos de animales invertebrados que le valió el premio Nobel, descubre a un peculiar tipo celular, grande y fagocítico. Atinadamente lo bautiza como

Macrófago. Ahora sabemos que este es uno de los estadios finales de maduración de las células del sistema fagocítico-mononuclear que comprende, por orden de aparición, al precursor CFU-GM, monoblasto, promonocito, monocito de médula ósea y de sangre, y macrófago en los tejidos. Las células de este sistema desde sus albores como monoblastos son fagocíticas, siendo capaces de fagocitar grandes partículas como algunos parásitos intracelulares. Estos procesos son mediados por receptores de opsoninas (anticuerpos y componentes del sistema del complemento) o por receptores inespecíficos, como el de fucosa-manosa. Adicionalmente desde estadios tempranos poseen lisozima, esterasa y peroxidasa, lo que les confiere una buena actividad bactericida (5).

El 95% de los macrófagos de los tejidos provienen de monocitos que abandonan el torrente sanguíneo a través del endotelio vascular. Una vez en el tejido estos monocitos se diferencian para dar lugar a la amplia variedad de macrófagos que conocemos. Durante esta diferenciación las actividades de peroxidasa y la capacidad de síntesis de DNA disminuyen, mientras aumenta la cantidad de lisosomas en el citoplasma, la expresión de receptores para IgG y C3, y concomitantemente la actividad fagocítica, como se muestra en la Figura. La célula establecida en un tejido no pierde por completo la motilidad y responde a diversos estímulos quimioatrayentes.

Un 5% de los macrófagos tisulares proviene de la división local de fagocitos mononucleares, que se reclutan de la sangre y se establecen en el lugar 24 horas antes de terminar la división celular. La muerte del macrófago al parecer, ocurre en los nódulos linfáticos y probablemente también en los tejidos y cavidades sanguíneas (5).

2.3 HETEROGENEIDAD

La célula monocítica debe poblar de macrófagos a todos los tejidos. Gracias a los receptores de superficie de las células del endotelio vascular, los monocitos abandonan el torrente sanguíneo para diferenciarse en macrófagos que se establecen en el hígado (como células de Kupffer), en pulmón (como macrófagos alveolares), en el tejido conectivo (como histiocitos), en el hígado (como macrófagos de la pulpa roja), en hueso (como osteocitos), en el tracto gastrointestinal, en sistema nervioso central y en general en todo el organismo en el subendotelio de las grandes arterias. No hay ninguna evidencia de que ciertos tipos de monocitos se diferencien en ciertos tipos de macrófagos: al parecer penetran en el tejido de manera aleatoria y ahí su diferenciación es influenciada por las células del tejido (5).

2.4 MORFOLOGIA

Los macrófagos se pueden distinguir morfológicamente con microscopia de luz como células grandes, de unos 25 a 50 μm de diámetro y de superficie irregular. Comúnmente la situación del núcleo, arriñonado en muchas observaciones, es excéntrica. Posee dos nucleolos prominentes y cromatina dispersa. El Complejo de Golgi se asienta en un citoplasma abundante, donde se encuentran también gránulos pequeños y grandes, así como las vacuolas fagocíticas. Cuando las células se adhieren a superficies plásticas o de vidrio, los orgánulos generalmente ocupan el centro, llegándose a apreciar la rugosidad de su superficie.

La ultraestructura citoplásmica de estas células revela un citoesqueleto conformado por microtúbulos y microfilamentos, que rodea al núcleo y se reparte ordenadamente por todo el citoplasma. Los filamentos de actina en la cara interna de la membrana celular, intervienen en la formación de pseudópodos, la motilidad celular y los procesos de endocitosis. El citoplasma presenta un bien desarrollado complejo de Golgi, un número variable de vacuolas y vesículas pinocíticas, mitocondrias grandes y lisosomas densos al paso de los electrones, asociados a membranas y que se pueden fusionar con fagosomas para formar lisosomas secundarios (5).

Como ya se ha mencionado, el macrófago no es un único tipo celular: dependiendo del tejido en que se encuentre logra algunas especializaciones, que nos hacen hablar de células de Kuffer, células tipo A de sinovio y todas ellas son macrófagos: un grupo celular versátil, multifuncional, multimodulador, con algunos detalles morfológicos que diferencian a los subgrupos. En la actualidad se cuenta con anticuerpos monoclonales que reconocen marcadores celulares específicos para las moléculas de superficie de las células. Estos anticuerpos han sido de gran utilidad para determinar la pertenencia de células con distintos fenotipos, al linaje celular de los monocitos -macrófagos.

2.5 FUNCIONES

Nuestro conocimiento de los sistemas que componen a los organismos es aún incompleto. Recientemente se ha reconocido la relación y regulación existentes entre los elementos celulares del sistema nervioso, el sistema inmunogénico y el sistema endócrino. Dentro de esta perspectiva, es evidente que las funciones de una célula que para nuestro conocimiento actual son vastas, seguramente superan la actual lista.

Los macrófagos tienen como función conspicua la fagocitosis de bacterias, hongos, protozoarios y virus, considerándoseles una importante adaptación para hacer frente a organismos invasores. Aunque el neutrófilo puede llegar a ser un

fagocito más eficiente, su capacidad en cuanto a la variedad de partículas que puede ingerir es limitada, por lo que el macrófago se gana la reputación de célula fagocítica por excelencia. El macrófago tiene también una función importante en la iniciación de respuestas inmunes debido a su papel como célula presentadora de antígeno, amén de poseer un gran potencial secretor de citocinas, enzimas, etc. Cuando una de sus funciones efectoras es dejada de lado, la célula generalmente incrementa sus capacidades para llevar a cabo otras funciones, como citotoxicidad, secreción de citocinas, enzimas o metabolitos microbicidas.

2.5.1.0. FAGOCITOSIS

La función de fagocitar es tan antigua como la vida misma. La endocitosis de nutrientes es un fenómeno celular vital, del que derivan especializaciones funcionales y morfológicas. La interiorización de partículas del medio que rodea a las células, función que es llevada a cabo por todas las células de un metazoario, se realiza por medio de receptores o prescindiendo de ellos. No obstante, hay que distinguir entre la endocitosis y la verdadera fagocitosis. En la primera se endocitan partículas solubles (pinocitosis) o bien de un tamaño máximo de $1\ \mu\text{m}$ de diámetro, el proceso puede llevarse a cabo a 18°C y no es inhibido por citocalasina D. La proteína que participa en la endocitosis es la clatrina, que viaja aleatoriamente por la membrana celular, y cuando se encuentra con alguna

hendidura en la membrana formada por la presencia de un ligando a endocitar, forma una "canasta de clatrina". La vesícula viajará al interior celular (6).

En el caso de la fagocitosis la proteína presente es la actina. El proceso se inhibe a bajas temperaturas (4°C), y por citocalasina D (7). En varios estudios de fagocitosis de glóbulos rojos por macrófagos se observa que la célula fagocítica extiende sus lamelopodios para rodear al eritrocito y de esa forma interiorizarlo. Las dos formas de lograrlo se han nombrado *convencional*, en donde se rodea al material englobándolo con la membrana, y la *fagocitosis por enrollamiento*, en la que el fagocito extiende un brazo que se enrolla a la partícula dando varias vueltas (8). Para la interiorización del material y la reunión posterior de las membranas, es necesario un punto inicial de fusión a partir del cual las áreas restantes de las membranas se unan con sus contrapartes (*Modelo del Zipper*). La fagocitosis se clasifica como específica (mediada por receptores) o inespecífica cuando los receptores no se conocen. La gran variedad de moléculas receptoras que median fagocitosis aumenta las posibilidades de llevar a cabo esta función. Los macrófagos poseen receptores para distintas moléculas del sistema inmunológico que median fagocitosis, como los receptores para las inmunoglobulinas del isotipo IgG y receptores para los componentes del complemento.

La fagocitosis en macrófagos mediada por receptores para IgG es primordial para hacer frente a las infecciones. Esto se constata al observar que la fagocitosis mediada por complemento o por receptores inespecíficos no siempre lleva a la muerte del patógeno (5,9). Sin embargo, el macrófago padece en apetito y capacidad bactericida frente a otras células encargadas de mantener la homeostasis contra posibles invasores, como son el neutrófilo y el eosinófilo. Sin embargo, la capacidad de ingerir una gran variedad de partículas, aún de grandes tamaños, así como su papel como célula presentadora de antígenos y la modulación de la respuesta inmune por sus hasta 1,000 productos proteicos, hace de ésta una célula fundamental en los organismos sanos.

2.5.1.1.RECEPTORES PARTICIPANTES EN LA FAGOCITOSIS

Fc γ R.

Mientras que los receptores de manosa-fucosa y de inmunoglobulina del isotipo IgG (Fc γ R) en fagocitos mononucleares, son constitutivamente competentes para la fagocitosis, la ingestión mediada por complemento precisa de la activación celular por un estímulo externo (9). Los receptores para IgG se clasifican en tres grupos (10,11), de acuerdo a su peso molecular, afinidad y especificidad por ligando, tipo celular en el que se expresan y por diferencias antigénicas evidenciadas por anticuerpos monoclonales:

GRUPO 1. El huFcγRI (humano) y muFcγRI (murino) se distinguen por su alta afinidad por el ligando aún siendo monomérico. En el caso murino, la más alta afinidad es para la IgG2a, con una $K_a = 10^8/M$. Después de ella, la afinidad se define como $2b \gg 1,3$. Se encuentra en monocitos, macrófagos y en neutrófilos humanos. Su expresión aumenta hasta 20 veces bajo influencia del IFNγ.

Estos receptores median fagocitosis y ADCC en macrófagos y líneas relacionadas. Se propone que células de circulación periférica tienen ocupado este receptor por IgG monomérica y en forma de complejos antígeno anticuerpo, los que compiten ventajosamente por el mismo. La carencia de este receptor no acarrea problemas fisiológicos (10).

GRUPO 2. Los receptores huFcγRII y muFcγRIIβ (en donde se distinguen el FcγRII1b y FcγRII2b), tienen baja afinidad por el ligando monomérico ($K_a < 10^7 M^{-1}$). La afinidad relativa de su interacción con distintos isotipos de IgG, sigue el orden: $2b > 2a > 1 > 3$. Se le clasifica como receptor de baja afinidad. Su distribución es amplia: fagocitos mononucleares, linfocitos T y B y neutrófilos. Faltan aún estudios concluyentes de la participación de estos receptores en la fagocitosis, ADCC, liberación de mediadores y estimulación de células B. Se sabe que uno de los transcritos del gen humano (huFcγRIIa) sí media fagocitosis y

ADCC en macrófagos, mientras que el transcrito huFc γ RIIb se relaciona con estimulación a linfocitos (12).

El receptor tipo II murino presenta las formas 1b y 2b, que se diferencian sólo en la presencia o ausencia por delección de un exón en la porción intracitoplasmática de la proteína. Cuando sí se encuentra (Fc γ RIIb1), el receptor se puede unir a la actina y fosforilarse, mediando fagocitosis de complejos inmunes y activación celular. Se presenta únicamente en linfocitos, macrófagos inmaduros y en la línea celular J774, mediando fagocitosis. En macrófagos maduros y algunas células linfoides, la proteína carece de esa porción (Fc γ RIIb2) y se puede unir a clatrina asociada a vesículas, por lo que media endocitosis de complejos inmunes. Para realizar la fagocitosis de partículas opsonizadas, el receptor de los macrófagos que se ocupa es este receptor (12,13,14,15).

GRUPO 3. Por sus similitudes en estructura primaria y organización genómica, distribución celular y actividad biológica, el anteriormente conocido como muFc γ RII α , ahora muFc γ RIII, así como el huFc γ RIII se reúnen en este grupo. Se encuentran en neutrófilos, granulocitos, macrófagos, líneas de macrófagos y células NK, presentando baja afinidad por el ligando. Tiene afinidad por hIgG1 y hIgG3, y por las Ig de ratón el orden es 2b > 2a > 1 > 3.

Las moléculas de este grupo están conservadas y se relacionan claramente con la remoción de complejos, fagocitosis y ADCC, siendo esta última actividad representada principalmente por las células NK, pero también está presente en macrófagos. La expresión de los receptores de este grupo es regulada por distintas citocinas (13). Bajo la influencia del $IFN\gamma$, los macrófagos y las líneas relacionadas aumentan tanto la cantidad de mRNA así como la expresión de esta proteína (14). Los macrófagos murinos peritoneales expresan normalmente altos niveles este receptor (14,15).

Los estudios en líneas celulares de tipo macrófago murino, así como en macrófagos peritoneales, reportan distintos resultados en cuanto a la afinidad y especificidad de unión de los distintos isotipos de Ig a sus receptores. No obstante, se coincide en la unión de las clases IgG e IgE y la no unión de las clases IgM e IgA (15,16).

RECEPTORES PARA COMPLEMENTO Y OTROS FcR's

Los fagocitos mononucleares expresan en su superficie diversos receptores para los elementos de esta vía primitiva de defensa. Entre ellos encontramos receptores para C3b, C3bi, C5a, C1q. Estos receptores son menos eficientes que los FcR para promover fagocitosis y/o actividades microbicidas. A diferencia de los receptores para $Fc\gamma$, la ocupación de estos receptores no conlleva la liberación

de ácido araquidónico o metabolitos reactivos del oxígeno, aunque se secreción de IL-1 y por lo tanto quimiotaxis (5).

Los receptores para IgE tipo 2 (FcεRII) y receptores para IgA, se encuentran en la superficie de las células fagocíticas mononucleares. Aunque los FcεRII pueden enviar señales al interior de la célula por entrecruzamiento, tanto en eosinófilos y plaquetas como en macrófagos (17), ni el receptor para IgA ni el FcεRII median fagocitosis en estas últimas células. El FcεRII se expresa en al menos un estadio del macrófago y su expresión se ve modulada positivamente por el IFN γ , IL-4, TPA, e IgE (18).

2.5.2. PRESENTACION DE ANTIGENO

Desde los invertebrados marinos se conoce la expresión de moléculas análogas a las moléculas presentadoras de antígeno en los vertebrados. Es aquí donde con certeza podemos afirmar la existencia de una respuesta específica y orquestada por distintas células subespecializadas. El organismo reconoce o rechaza al antígeno sólo cuando el mismo organismo se lo puede enseñar. Las células presentadoras de antígeno extraño se reparten por todo tejido, siendo las más importantes las células de Langerhans, células dendríticas y macrófagos. De entre estos, los menos eficientes vuelven a ser los macrófagos. Su importancia

como células presentadoras de antígeno (APC: Antigen-presenting cells) no se ve menoscabada por este hecho.

El proceso de presentar antígeno ajeno conlleva, en el macrófago, la fagocitosis (6). Una vez interiorizado el material, se fusionan las vesículas en donde se encuentra para degradarlo enzimáticamente. Fragmentos peptídicos del antígeno llegan al retículo endoplásmico, en donde se asocian a las moléculas del MHC-II. El conjunto viaja, vía complejo de Golgi, hacia la membrana citoplasmática para exponerse junto con su carga antigénica. Es ahí, y dogmáticamente sólo ahí, donde las células Th pueden reconocer al antígeno y activarse para montar una respuesta específica. Podemos reconsiderar la actividad como APC y como fagocito del macrófago al tomar en cuenta esta especialización derivada de la fagocitosis: amén de su alta capacidad para internalizar y destruir a patógenos, el macrófago puede presentar dinámicamente al antígeno, colocado en una molécula del MHC, a los linfocitos para amplificar y dirigir la respuesta hacia el antígeno en turno. La respuesta será drástica y localizada, primero, y después en todo el organismo se conocerá al antígeno para poder responder más rápida y eficientemente en el próximo reto.

2.5.3. OTRAS FUNCIONES DEL MACROFAGO

Las tareas de esta polifacética célula no terminan aquí. Sin restarles importancia, se nombrarán brevemente sólo algunas para completar el panorama de la participación de nuestra célula objeto en el sistema inmune.

SECRECIÓN. El macrófago produce unas 26 enzimas relevantes para el sistema inmunogénico, tales como lisozima, hidrolasas lisosomales ácidas, proteasas, lipasas, inhibidores de proteasas, arginasa e inhibidor de IL-1. También es una de las fuentes productoras de algunos componentes del complemento, C1, C4, C2, C3, C5, factor B, factor D, properdina, C3a, C3b, C5a, Bb. El desactivador de C3b (β -IH) también es producido por esta célula, así como cinco factores de coagulación, y las indispensables citocinas. Dentro de estas últimas el macrófago produce IL-1, IL-6, IL-8, $TNF\alpha$, $IFN\alpha$, $IFN\beta$, P-DGF, F-GF, $TGF\beta$, GM-CSF, M-CSF, eritropoyetina, F-IM, y Factor Angiogénico. Más de una docena de otros productos con diversas actividades biológicas son secretados por el macrófago, incluyendo a los derivados del ácido araquidónico, de los cuales el macrófago es uno de las principales fabricantes en el organismo (5,6).

CONTROL CELULAR DE TUMORES. Se han identificado tres mecanismos diferentes de los que se vale este fagocito para controlar la aparición de tumores. El primero es la inhibición de la división de las células tumorales sin necesidad de contacto celular, a través de prostaglandinas, IL-1 y $TNF\alpha$. Un segundo

mecanismo es la citotoxicidad tumoral mediada por macrófagos (MTC), en donde parece que el trabajo lo realizan proteasas de serina y $TNF\alpha$, siendo independiente de anticuerpo. En tercer lugar se encuentra la citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (ADCC) que se realiza por la secreción de mediadores líticos, que se liberan después del entrecruzamiento de los FcR en la superficie del Macrófago (19).

La participación de esta célula en la producción de proteínas de la fase aguda, en la hematopoyesis, homeostasis (20), destrucción de microorganismos por metabolitos reactivos del oxígeno y enzimas, así como la remoción de células senescentes, reparación, remodelación de tejidos y aterogénesis, hablan de la casi omnipresencia del macrófago en la tarea de mantener la homeostasis de los organismos, opinión apoyada por la observación de macrófagos en los animales que representan hoy, a las formas primigenias: su actividad ha sido y es, imprescindible para los organismos.

MECANISMOS BACTERICIDAS. Los mecanismos oxidativos del macrófago se dividen en mieloperoxidasa dependientes e independientes, donde a partir de H_2O_2 y O_2 , se forman los metabolitos OH y el singulete de oxígeno, $1/2O_2$. Esta célula es productora de la multifacética molécula NO, a la que se adjudica actividad bactericida (8).

2.6. ACTIVACION DEL MACROFAGO

La activación del macrófago es un proceso de maduración/diferenciación, mediante el cual la célula bajo la influencia de distintas citocinas, adquiere capacidades funcionales que le permiten llevar a cabo con mayor eficiencia sus funciones de defensa. Aunque originalmente se describió como la adquisición de capacidades tumoricidas, la activación de los macrófagos se define actualmente de un modo más amplio, como la adquisición de ciertas propiedades que en conjunto permiten al macrófago activado llevar a cabo una función compleja, que la célula no activada no es capaz de realizar (21).

El principal factor que promueve la activación de macrófagos para la citotoxicidad contra células tumorales es el $IFN\gamma$. Sin embargo, es cada vez más evidente que otras citocinas tienen efectos moduladores sobre la activación de los macrófagos y también que la acción simultánea de dos o más citocinas sobre un macrófago generalmente tendrán efectos sinérgicos.

La activación del macrófago no es un fenómeno del todo o nada, ni tampoco sigue una secuencia única. Antes bien, los macrófagos pueden existir en los tejidos en un gran número de estados de activación diferentes, dependiendo de la acción del conjunto de citocinas a las que estén expuestos. Por otro lado, debemos mencionar que la activación de un macrófago para una función dada, no

necesariamente refleja una activación similar para otras funciones. Como ya mencionamos, cuando se incrementa la capacidad del macrófago para una determinada función, su capacidad para llevar a cabo otras funciones puede verse disminuída.

3. CITOCINAS

La respuesta inmune funciona principalmente como un sistema de amplificación: un pequeño cambio en la homeostasis local rápidamente escala hacia una respuesta sistémica. Las principales células que participan en la iniciación y resolución de las reacciones inmunes son los macrófagos y los linfocitos T. La comunicación intercelular entre estas y las demás células ocurre gracias a la síntesis, liberación y reconocimiento de glucoproteínas de bajo peso molecular (8 a 70 KD), llamadas **citocinas**. A pesar de sus similitudes con las hormonas del sistema endócrino, las citocinas se producen y actúan localmente en el sitio que enfrenta el reto inmune. La concentración fisiológica a la que se encuentran es del rango de 10^{-10} M (22).

Cada citocina interactúa con diferentes tipos celulares y exhibe funciones pleiotrópicas, dependiendo de su célula blanco (23,24). Por ello, las células productoras de citocinas y las células receptoras forman una compleja red que controla las funciones del sistema inmune y trasciende sus fronteras.

INTERFERON γ (IFN γ). Conocido como el activador principal del macrófago, el IFN γ es, junto a los otros interferones (IFN α e IFN β), una molécula inflamatoria y antiviral producida en el curso de un fenómeno inflamatorio por las células T y NK y durante la respuesta inmune (25,26,27). Como generalmente sucede con las citocinas, su actividad biológica es moduladora y modulada por el resto del organismo (28). Sobre el macrófago sus claros efectos son resultado de la dosis y la duración de este estímulo (29).

Dos moléculas son marcadores importantes resultado de la activación del macrófago: Moléculas Ia y Receptores para Fc. Para iniciar la respuesta inmune se precisan macrófagos portadores del antígeno Ia (30). La expresión de esta molécula aumenta drásticamente, hasta cinco veces, bajo la influencia del IFN γ o como también se le conoce, IFN inmune (31,32).

En el caso de la fagocitosis dependiente de Inmunoglobulinas, realizada por células mononucleares fagocíticas, el efecto positivo del IFN γ principia con el aumento en la expresión y la densidad de los receptores para Fc γ (32,33). La fagocitosis de partículas osponizadas con IgG aumenta hasta en cinco veces, lo que se registra desde las más bajas dosis de IFN γ (1 a 10 U/ml)(32). Dicho efecto comienza a ser explicado con el descubrimiento de que las dosis de 100u/ml de IFN γ durante 24 horas. aumentan tanto la abundancia relativa de mRNA del

receptor $Fc\gamma RIII$, como la expresión de esa proteína (11,14,15). Los interferones alfa (α) y beta (β) tienen el mismo efecto en cuanto a expresión de receptores, pero no en cuanto a ingestión. El fenómeno, no obstante ser paralelo, es independiente del incremento en la expresión de los Antígenos de Histocompatibilidad mencionados (32).

Sobre otros receptores para realizar fagocitosis, como los de complemento, el efecto es negativo (8,34,35). Se ha observado en estos casos que mientras $TNF\alpha$ y GM-CSF estimulan la fagocitosis vía CR3, el $IFN\gamma$, IL-4 y M-CSF la disminuyen.

Debido en gran parte a la disminución en la producción de PGE_2 , el $IFN\gamma$ deprime el crecimiento de los tejidos debido a que disminuye la transcripción de la colágena y la fibronectina (37), por lo que se le adjudican propiedades antiproliferativas y antiinflamatorias (37). La regulación que se observa entre $IFN\gamma$ e IL-1 pone ante nosotros un bonito ejemplo de homeostásis: mientras el efecto del primero es reducción del crecimiento, el segundo estimula la producción de colágena y fibronectina, gracias a la producción de PGE_2 . Esto autoestimulado por la producción de IL-1 en presencia de IL-1.

INTERLEUCINA-1 (IL-1) Se conocen como interleucinas a las citocinas que producen los leucocitos para comunicarse con otras células. Los genes de la IL-1

se han encontrado en todos los animales en donde se les ha buscado. Se ha encontrado una molécula similar en invertebrados marinos como equinodermos y tunicados, con efectos estimuladores en acciones de fagocitosis (38). Su existencia se evidenció por ser responsable de producir fiebre en animales cuando se les transfería pasivamente. A pesar de que la IL-1 son dos productos proteicos distintos provenientes de genes distintos, las proteínas IL-1 α e IL-1 β tienen la misma afinidad para el receptor de IL-1, de alta afinidad, y los mismos efectos biológicos en las células blanco. Ambas IL-1 se traducen como propéptidos de baja afinidad por su ligando, que al ser procesados en el medio extracelular por proteasas secretadas por la misma célula productora adquieren su alta actividad biológica (39,40).

De la lista de células productoras de IL-1 sobresalen los macrófagos y queratinocitos, aunque los primeros son los principales secretores. En condiciones normales se producen de 0 a 2 u/ml en macrófagos y células endoteliales (41). En sus células blanco, como linfocitos T y B, fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y del SNC, sus acciones son variadas: *in vivo* aumenta las reacciones inflamatorias sistémicas, produce fiebre, desencadena la respuesta de fase aguda del hígado, reduce la concentración de Hierro y Zinc del plasma y aumenta la concentración de Cobre. Induce infiltración neutrofílica y monofílica, edemas y

angiogénesis (39). Es, junto con IL-6 y $TNF\alpha$, de los principales productos de secreción del macrófago. Su presencia induce la producción de otros mensajeros extracelulares, como factores estimuladores para formación de colonias (42), la liberación de metabolitos relacionados con la respuesta de sistema (IL-6 y la misma IL-1), y su propia producción es inducida por otros productos de la inflamación, como la proteína C reactiva (43).

In vitro, un promotor de la aparición de la IL-1 es el LPS, conocido como activador del macrófago. Los genes asociados a las etapas tempranas de activación, *KC* y *JE*, se traducen en ese momento simultáneamente con IL-1 y $TNF\alpha$ (44). Por ello es considerado una molécula clave en el inicio de la respuesta inmunogénica.

INTERLEUCINA-6 (IL-6) Conocida principalmente como molécula activadora de células B, en las que actúa promoviendo la proliferación y diferenciación en célula plasmática, la IL-6 activa también a linfocitos T en sus primeros estadios, en sinergismo con la IL-1; estimula la maduración de megacariocitos y células estromales para su diferenciación en macrófagos, posee actividad trófica para neuronas e interviene de manera preponderante en la respuesta de fase aguda (45,46,47).

Dos receptores, uno de baja afinidad (IL-6R α) y otro de alta afinidad (subunidad α y subunidad de 130 KD) (45), se encuentran en las células que reciben señales de la IL-6, proteína de 23 KD como se le conoció originalmente: hepatocitos y macrófagos de hígado, células B y T y fibroblastos (39). La unión de la glucoproteína de 23 KD es competida por IL-1, IL-2, TNF α , IFN γ e IFN β . Las células productoras de IL-6 *in vivo* son linfocitos B y T. *In vitro*, células endoteliales y accesorias de los cultivos también secretan IL-6. Normalmente sus niveles de producción son nulos (41,45), pero en la infección aumentan por IL-1 y TNF α principalmente y después por IFN γ , IL-3, GM-CSF y el Factor de crecimiento derivado de plaquetas (P-DGF). Es un gen de expresión muy controlada (45).

Algo sumamente interesante en estas citocinas, es la relación existente entre IL-1, IL-6 y TNF α : IL-1 y TNF α inducen la aparición de IL-6, mientras que la producción de IL-1 es estimulada por TNF α y por sí misma (48). Las tres citocinas intervienen en la respuesta de fase aguda y se liberan coordinadamente por monocitos activados (38). Muchas de las actividades atribuidas a la IL-1, son producto de la presencia simultánea de la IL-6 (45). Bajo la influencia de dosis fisiológicas de la rIL-6 (25 u/ml) sobre células J774, la unión del anticuerpo 2.4G2, anti Fc γ RIII se duplica: aumenta la concentración del mRNA, mas no la

expresión de la proteína. Por ello se ha sugerido que esta citocina estimula la presencia de un receptor para IgG aún no caracterizado (14) .

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue el de estandarizar un microensayo que nos permita cuantificar la fagocitosis, mediada por receptores para IgG, llevada a cabo por macrófagos murinos.

El principal interés para estandarizar un microensayo se debe al hecho de que la evaluación microscópica de la fagocitosis que es el método más comúnmente utilizado, es sumamente laboriosa y fatigante, lo que impide que puedan examinarse en un mismo experimento, un número grande de muestras. En contraste, el microensayo colorimétrico es rápido y sencillo, lo que permite estudiar en un solo experimento, un número mucho mayor de muestras.

Objetivos derivados de la técnica estandarizada es la evaluación de evaluación de distintas condiciones de la fagocitosis, como son el bloqueo de receptores por la fracción Fc de anticuerpos, la efectividad para mediar fagocitosis de los distintos anticuerpos usados, y efecto del cultivo en presencia de algunas citocinas.

MATERIALES Y METODOS

CELULAS.

Células de la línea P388D₁. Monocito-macrófago murino.

Originalmente aisladas de una neoplasia linfoide inducida, se seleccionaron por su alta producción de IL-1. Fagocíticas gracias a sus receptores de Ig y receptor del complemento de tipo 3 (49).

Células de la línea J774A.1. Monocito-macrófago murino.

Originada de un tumor murino, estas células secretan grandes cantidades de lisozima, además de producir IL-1. Presenta receptores para Ig y complemento, así como fagocitosis dependiente de inmunoglobulina (49).

Células de la línea RAW 267.7. Monocito-macrófago murino.

Establecida a partir de ascitis de un tumor inducido en ratón, la línea fagocita zimosan y secreta lisozima. Es capaz de realizar lisis dependiente de anticuerpo, presentando receptores para Ig y complemento.

Macrófagos Residentes Peritoneales Murinos (50).

Colección. Al animal recién sacrificado e inmobilizado, se introducen intraperitonealmente y de manera violenta, 7 ml de medio RPMI 1640 sin suero, con 50 U/ml de heparina para evitar coagulación. Para ello se utiliza una jeringa estéril con ajuga de 25 X 16. Cuidando de no dejar escapar el fluido, al retirar la jeringa se aplica un masaje generoso con los dedos en la parte abdominal del animal. Con una aguja de 21 X 32 se extrae el líquido, en el que se encontrarán los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal acompañados de otros tipos celulares. Las células se lavan por centrifugación a 1,500 rpm por 5 minutos.

Cultivo. Se cuentan las células con la ayuda de un hemocitómetro y se colocan 50,000 a 70,000 células en 0.2 ml de medio RPMI complementado, en cada pozo de una placa de cultivo de 96 pozos. Las placas se incuban por una hora a 37°C en presencia de CO₂. Los cultivos se lavan 3 veces con PBS para retirar así a las células no adherentes, obteniendo un cultivo con cerca del 90% de macrófagos. Otras células no fagocíticas, positivas para la tinción de esterasa inespecífica (50) pero no para la peroxidasa específica (52), suelen permanecer aún después del lavado.

Las células se pueden cultivar 24 o 48 horas en 0.2 ml de medio complementado, a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂.

Macrófagos Inflamatorios Peritoneales Murinos (36).

Estas células se obtienen de la misma forma que las células residentes, pero inoculando al ratón 1.5 ml de tioglicolato, intraperitonealmente, 5 días antes de extraer las células. En este caso la proporción de células no fagocíticas adherentes puede variar ligeramente (51,52).

El medio de cultivo utilizado para propagar las líneas celulares y para mantener viables las células obtenidas de animales fue el RPMI (GIBCO) suplementado con 10 % de suero fetal de ternera (SFB), 2 mM glutamina, 100 U/ml de penicilina, 0.25 µg/ml de estreptomicina. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

ANTICUERPOS.

Obtención de anticuerpos policlonales de conejo específicos para el 2-4,dinitrofenol (αDNP).

Se inmunizaron conejos con 0.1 mg de inmunógeno (Ovoalbúmina dinitrofenilada) emulsificado en Adyuvante Completo de Freund, por vía subcutánea (52). Las inmunizaciones subsiguientes se realizaron a intervalos de seis

semanas, utilizando para cada inmunización 0.1 mg de inmunógeno emulsificado en adyuvante incompleto de Freund, e inoculado por vía subcutánea.

El suero se obtuvo sangrando a los animales vía venas marginales de la oreja, previamente rasurada y desinfectada. Los sangrados se realizan de 10 a 14 días después de cada inmunización secundaria. La sangre obtenida (>20 ml) debe permanecer de 30 a 60 minutos a temperatura ambiente para que coagule. El coágulo se debe separar de las paredes del tubo en el que se colectó con una varilla de vidrio o palillo de madera y el tubo se coloca a 4°C para que el coágulo se compacte. Después de pasar una noche a 4°C, el suero puede ser extraído sin elementos figurados. El remanente se centrifuga a 2,000 rpm durante 5 minutos para recuperar la mayor cantidad de suero posible. Se puede guardar en alícuotas de 1 a 2 ml en congelación a -20°C, durante varios años.

Purificación de IgG.

Precipitación con sulfato de amonio (53). Al sobrenadante del suero previamente centrifugado a 3,000 g por 30 minutos, se agrega lentamente un volumen igual de una solución saturada de sulfato de amonio para llegar a una concentración final de 50% de saturación. Las sales compiten ventajosamente con las proteínas del suero por el agua, que las mantiene en solución. Las proteínas séricas se

precipitan. Después de centrifugar 3,000 g durante 30 minutos, el precipitado se recupera, se disuelve en agua y se dializa exhaustivamente contra PBS (fosfato de sodio 0.01 M, Cloruro de sodio 0.15 M, pH 7.4).

Purificación de IgG en columna de Proteína A (53). La proteína A es una proteína de origen bacteriano que se une específicamente a la porción Fc de la IgG de varias especies. En una columna de afinidad hecha de Proteína A unida a perlas de Sefarosa, se incubó la solución cruda del suero con inmunoglobulinas, a la cual se ha ajustado el pH a 8 con Tris 1 M. Después de incubar por 30 minutos a temperatura ambiente, la columna se lava con amortiguador Tris 10 mM pH 8.2, hasta que el eluido tenga una DO a 280 nm < 0.1. Esto indica que toda proteína no unida a la Proteína A ya fue eluida. Al lavar la columna con glicina 0.1 M pH 2.8, la IgG unida a la Proteína A, se desprende. Se eluye con este nuevo amortiguador hasta tener una DO < 0.1, recogiendo la elución en alícuotas de 2 ml en tubos con un par de gotas de Tris 2M, pH 8.2.

Purificación de IgG α DNP por cromatografía de afinidad (53). Uniendo DNP a perlas de Sefarosa, los anticuerpos específicos para este hapteno se unirán específicamente a las perlas, permitiendo separarlos de los anticuerpos dirigidos

contra otros antígenos. La IgG previamente purificada se incuba con perlas de DNP unido a Sefarosa durante una noche a 4°C. Se empaca una columna con las perlas que fueron incubadas con los anticuerpos. Se lava la columna con PBS pH 7.4 hasta obtener una DO < 0.1. Para desprender a la IgG α DNP se pasa lentamente por la columna una solución 0.1 M DNP. El DNP de la solución compete con el DNP unido a las perlas, obteniéndose en el eluido IgG α DNP unidos a DNP. Este eluido se pasa por otra columna de Dowex 1-8x (intercambiador iónico) en donde el DNP queda retenido. Se obtienen así en el eluido final anticuerpos específicos α DNP puros. Se guardan en aliquotas a -20°C.

Titulación de los anticuerpos α DNP. Se titularon por hemaglutinación los anticuerpos policlonales de conejo α DNP, así como los anticuerpos monoclonales de ratón de los isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b α DNP obtenidos en el laboratorio. La técnica consiste en hacer diluciones seriadas (1:2, 1:4, 1:8, etc) de la solución de anticuerpos en pozos con fondo V para microtitulación. A 25 μ l de cada dilución de anticuerpos, se añaden 25 μ l de una suspensión al 2% de eritrocitos de carnero sensibilizados con DNP (la sensibilización de eritrocitos se describe enseguida). Se mezclan cuidadosamente y se dejan sedimentar.

La aglutinación de los eritrocitos sensibilizados en ciertos pozos indica la presencia de una concentración suficiente de anticuerpos que puedan unirse a ellos y formen una malla, que se precipitará visiblemente. Si los Ac están en cantidad insuficiente o ausentes, se formará un botón compacto de eritrocitos en el fondo del pozo. El título del suero o solución de anticuerpos será la última dilución en la que se forma la malla. Se utilizan como controles sueros de conejo no inmunizado contra DNP y eritrocitos no sensibilizados.

ENSAYOS DE FAGOCITOSIS.

Obtención de eritocitos (54). Se obtienen, en condiciones de esterilidad, 20 ml de sangre de carnero joven. Inmediatamente después de obtenida la sangre, se mezcla con solución de Alsever (Citrato-ácido cítrico, dextrosa), con 0.02% de azida de sodio, en proporción de 1:1.5. En esta solución, los eritrocitos se mantienen viables a 4°C por periodos de 4 a 6 semanas.

Sensibilización de eritrocitos con TNBS (Acido trinitrobenzén sulfónico). Para marcar las proteínas de superficie de los glóbulos rojos con el grupo hapténico 2,4,6-trinitrofenol, se hacen reaccionar los grupos amino libres de las proteínas, con el TNBS, en condiciones ligeramente alcalinas, según lo describió Eisen en 1964. En la reacción se libera un grupo sulfónico, quedando el grupo TNP unido

covalentemente a la proteína. Ya que gran parte de los anticuerpos específicos para el hapteno 2-4, dinitrofenol presentan reacción cruzada con los grupos 2-4-6, trinitrofenol, se pueden opsonizar con anticuerpos específicos α DNP las células sensibilizadas con TNBS.

De la suspensión de sangre en Alsevers, se toma en condiciones de esterilidad, la cantidad necesaria del paquete celular, y se suspende en una solución amortiguadora DGVB²⁺: 2.5 mM veronal, pH 7.5, 75 mM NaCl, 2.5% dextrosa, 0.05% gelatina, 0.5 mM MgCl₂ y 0.15 mM CaCl₂. Mientras que la gelatina impide la adherencia de las células a la superficie del tubo, la dextrosa permite su sobrevivencia (55).

Después de los ensayos preliminares para determinar la concentración idónea de TNBS, que permite una opsonización adecuada para la ingestión y que no permite ni la unión ni, por ende, la ingestión de eritrocitos sensibilizados pero no opsonizados, se establecieron las siguientes condiciones para la sensibilización: En 3.5 ml de solución amortiguadora de boratos (0.2 M ácido bórico, 0.15 M NaCl, pH 8.5) se disuelven 3.5 mg de TNBS (Eastman Kodak Co.) por cada 400 μ l de eritrocitos de carnero previamente lavados en DGVB²⁺. Se dejan en agitación suave durante 15 minutos, en oscuridad. Para retirar el exceso de TNBS no unido, los eritrocitos se lavan dos veces por centrifugación. Los eritrocitos sensibilizados

(Es) y lavados se suspenden en $DBVB^{2+}$, preferentemente al 2% para el procedimiento siguiente (Opsonización).

Opsonización. Una vez titulado el suero o los Ac, se opsonizan los ES con una concentración subaglutinante de anticuerpos (54). Debido a que la superficie del Es está cubierta de TNP, los anticuerpos se deben administrar en una cantidad menor a la que permitió la formación de la malla, esto es, el contínuo de eritrocitos unidos por Ac. De otra forma se formarían agregados de células difíciles de manejar, y sobre todo, de fagocitar.

Se opsoniza la cantidad deseada de Es al 2%, en $DGVB^{2+}$, añadiendo la cantidad de Ac necesaria para obtener una dilución igual a la primera dilución que dejó de mostrar aglutinación. Es decir, si el título de hemaglutinación determinado fue 1:64, para opsonizar se debe emplear una dilución de 1:128. Los Es se incuban con anticuerpos por 30 minutos con agitación suave y constante. Posteriormente, los eritrocitos se lavan dos veces con $DGVB^{2+}$. los eritrocitos opsonizados (Eo) pueden permanecer hasta una semana a 4°C.

Ensayo colorimétrico para cuantificar fagocitosis de eritrocitos. Aprovechando la actividad de pseudoperoxidasa de la hemoglobina (Hb), para catalizar la

aparición de un producto colorido a partir de 3-3' Diaminobenzidina (DAB), en presencia de peróxido de hidrógeno, se puede cuantificar espectrofotométricamente la fagocitosis de eritrocitos por macrófagos, según lo reportó Jungi en 1985 (56).

El modelo de fagocitosis de eritrocitos por macrófagos es ampliamente explotado para estudiar las condiciones de activación, expresión de receptores, liberación de mediadores metabólicos, etc, por macrófagos, por ser la fagocitosis un parámetro importante de las células fagocíticas (57). Existen varias maneras de cuantificar la fagocitosis (58,59): una de las más utilizadas es el conteo directo por microscopía óptica, del número de eritrocitos ingeridos por cada uno de, al menos, 100 macrófagos, determinándose posteriormente el índice fagocítico (número promedio de eritrocitos ingeridos por célula). Otros métodos se basan en la evaluación radiométrica de la ingestión de partículas marcadas radiactivamente, o del medio radiactivo que acompaña a la ingestión de las partículas. Contrastando con estos métodos directos, se han establecido métodos indirectos, como es la cuantificación de glucólisis del fagocito, de la degranulación, del estallido respiratorio, o de la actividad de enzimas liberadas al medio (54). Todos estos métodos se basan en la premisa de que miden procesos que acompañan metabólicamente a la fagocitosis.

La cuantificación de la eritrofagocitosis por la medición espectrofotométrica de la hemoglobina en lisados celulares de los fagocitos, fue propuesta por Cooper en 1984. Desgraciadamente, esta medición directa de absorción de luz por la hemoglobina adolece de baja sensibilidad. La modificación al método hecha por Jungi, utilizado en este trabajo, salva este obstáculo y permite la medición de 100,000 a 1,000,000 de eritrocitos por pozo (56).

En breve, el ensayo consiste en agregar, a las células fagocíticas y adheridas a la superficie de los pozos de placas de cultivo con 96 pozos, eritrocitos opsonizados. Luego de incubar a 37°C por el tiempo previamente determinado, los eritrocitos no fagocitados se lisan por un choque hipotónico, y las monocapas celulares se lavan para eliminar la hemoglobina liberada. Una vez hecho esto, las células adheridas se lisan en presencia de detergente, para liberar al medio la hemoglobina de los eritrocitos que fueron ingeridos. En este medio se determina la concentración de hemoglobina, que será proporcional a la cantidad de eritrocitos ingeridos, a través de un ensayo colorimétrico que mide la actividad de pseudoperoxidasa de la hemoglobina. Por medio de una curva patrón que se hace midiendo la actividad de pseudoperoxidasa de cantidades conocidas de eritrocitos, se pueden relacionar los valores de densidad óptica observados, con el número de eritrocitos.

Protocolo para la determinación de fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados con IgG, mediante ensayo colorimétrico.

Tanto las líneas celulares como los macrófagos obtenidos de animales que se utilizaron en éstos estudios, son adherentes.

Se cultivan de 50,000 a 150,000 células/pozo, a lo que se añaden 25 a 30 μ l de una suspensión al 2% de EOp en medio de cultivo RPMI 1640 incompleto. La placa se incuba a 37°C en presencia de CO₂, por un lapso de 15 a 90 min. dependiendo del tipo celular.

Al dar por terminada la fagocitosis, los eritrocitos no fagocitados se eliminan por choque hipotónico, rebasando los pozos con una solución hemolisante durante 1 a 3 minutos. La lisis de los eritrocitos no ingeridos se puede verificar al microscopio. Inmediatamente se sumerge la placa entera en PBS, para remover la Hb en solución, lo cual se repite tres veces sin vaciar el contenido de los pozos, lo que evita movimientos violentos.

Una vez retirada la Hb de esta forma, se procede a vaciar el exceso de líquido de la placa invirtiéndola rápidamente una sola vez. Las células fagocíticas deben permanecer adheridas, lo cual nuevamente se puede verificar al microscopio.

Las células se lisan añadiendo a cada pozo 100 μ l de solución de SDS al 0.3% en PBS, pH 7.5. Inmediatamente después de la lisis de las células, se añade a cada pozo 200 μ l de una solución preparada minutos antes, con 0.4 mg/ml DAB, 4 μ l/ml H₂O₂, en PBS pH 7.5. Para evitar la precipitación de ácidos nucleicos y color, se homogeniza cuidadosamente el contenido de los pozos con micropipetas multicanal, evitando el burbujeo o eliminando a las mismas en caso de aparecer.

La lectura de la reacción se realiza de 30 a 60 minutos después de iniciada, en un espectrofotómetro para microplacas (Bio-Rad Microplate Reader 3550), a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados se reportan como la media y la desviación estandar, de los triplicados para cada condición.

Variables de opsonización. Para los ensayos, se utilizaron eritrocitos opsonizados con distintos anticuerpos:

- a) EOp con anticuerpos policlonales de conejo IgG anti-DNP.
- b) EOp con anticuerpos IgG monoclonales murinos anti-DNP (IgGs de distintos isotipos).
- c) EOp con anticuerpo monoclonal IgE murino anti-DNP.

Controles. En cada ensayo, se deben incluir los siguientes controles:

- a) Pozos con células a las que se agregan Es no opsonizados, como control de que la fagocitosis es vía receptores para inmunoglobulinas.

- b) Pozos con macrófagos a los que no se añaden eritrocitos.
- c) Curva patrón de eritrocitos sometida al mismo ensayo colorimétrico.
- d) Pozos con SDS y el sustrato para la reacción colorida (DAB) como blanco de reactivos.

Duración del ensayo de fagocitosis. Las líneas celulares utilizadas y los macrófagos peritoneales, muestran importantes diferencias en cuanto al tiempo de incubación con EOp necesario para observar fagocitosis. Esto puede ser atribuido a la cantidad de receptores que exhibe cada una de estas poblaciones celulares en su superficie, a la cantidad de moléculas accesorias que acompañen a estos receptores para la transmisión de la señal, al grado de activación en el caso de los macrófagos inflamatorios, etc. Los tiempos de incubación óptimos para cada una de las poblaciones celulares utilizadas en estos estudios fueron los siguientes:

P388D₁ - 60 a 90 minutos.

J774.A.1 - 15 a 45 minutos.

RAW 267.7 - 30 minutos.

Macrófagos residentes - 30 minutos.

Macrófagos inflamatorios - 30 minutos..

CULTIVO DE CELULAS EN PRESENCIA DE CITOCINAS:

Se preparan soluciones stock de citocinas en albúmina humana (huAL) al 0.01% en PBS pH 7.5, a las siguientes concentraciones: IFN γ : 5,000 U/ml, IL-1 β : 100 ng/ml e IL-6: 100 ng/ml.

Los ensayos de 24 horas de estimulación para las tres citocinas se hicieron simultáneamente en la misma placa de cultivo. Las concentraciones a las que se incubaron las células con citocinas previas al ensayo de fagocitosis fueron:

IFN γ (Gibco) Se administran dosis de 125 y 250 U/ml.

IL-1 β : Se administran 5 y 2.5 ng/ml.

IL-6: Se administran 5 y 2.5 ng/ml.

CUANTIFICACION DEL EFECTO DE LAS CITOCINAS INF γ , IL-1 β e IL-6 SOBRE EL CRECIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR, POR MEDIO DEL METODO DE CRISTAL VIOLETA.

ENSAYO PARA PLACAS DE CULTIVO DE 96 POZOS (60).

Las células se cultivan en placas de cultivo de 96 pozos en cantidades originales de 50,000 a 75,000 células/pozo. Al tiempo de incubación deseado, se evalúa el crecimiento celular de la siguiente forma:

1. Decantar el medio de cultivo.
2. Agregar glutaraldehído 1.1%/ D-MEM, 10 minutos (100 μ l/pozo).

3. Retirar glutaraldehído. Lavar ligeramente con agua bidestilada y secar.
4. Agregar una solución de *Cristal Violeta* 0.1% / amortiguador ácido fórmico 0.2 M pH 6, 20 minutos (50 μ l/pozo).
5. Retirar *Cristal Violeta*; lavar exhaustivamente. Secar perfectamente.
6. Añadir ácido acético 10% / agua destilada, 20 minutos (100 μ l/pozo).
7. Leer absorbencia en un lector espectrométrico de microplacas a una longitud de onda de 590 nm.

RESULTADOS

1. Ensayo colorimétrico para evaluar fagocitosis mediante la reducción de la 3-3'Diaminobenzidina

El sistema experimental que utilizamos fue la fagocitosis, por macrófagos murinos, de eritrocitos de carnero opsonizados por anticuerpos de la clase IgG. Para poder estudiar en el mismo sistema la influencia de algunas características del anticuerpo opsonizante (tales como isotipo, afinidad, etc) sobre la fagocitosis, usamos una opsonización indirecta. Primero se unieron covalentemente a las proteínas de membrana del eritrocito, grupos hapténicos (2,4,6-trinitrofenol). Estos eritrocitos fueron opsonizados con una variedad de distintos anticuerpos específicos para el hapteno 2,4-dinitrofenol.

La fagocitosis de eritrocitos opsonizados de esta manera por macrófagos murinos de la línea celular P388 se comprobó por microscopia (Figura 1). Como se muestra en la Tabla I, las células fagocitaron eritrocitos opsonizados con IgG de conejo anti-DNP, pero no eritrocitos opsonizados con IgE murina anti-DNP, ni eritrocitos haptenizados pero no opsonizados. Tampoco hubo fagocitosis de eritrocitos sin sensibilizar. En la misma Tabla se muestran los resultados con

respecto a la formación de rosetas entre células P388 y eritrocitos de carnero opsonizados con IgG o IgE anti-DNP, así como eritrocitos sensibilizados y sin sensibilizar.

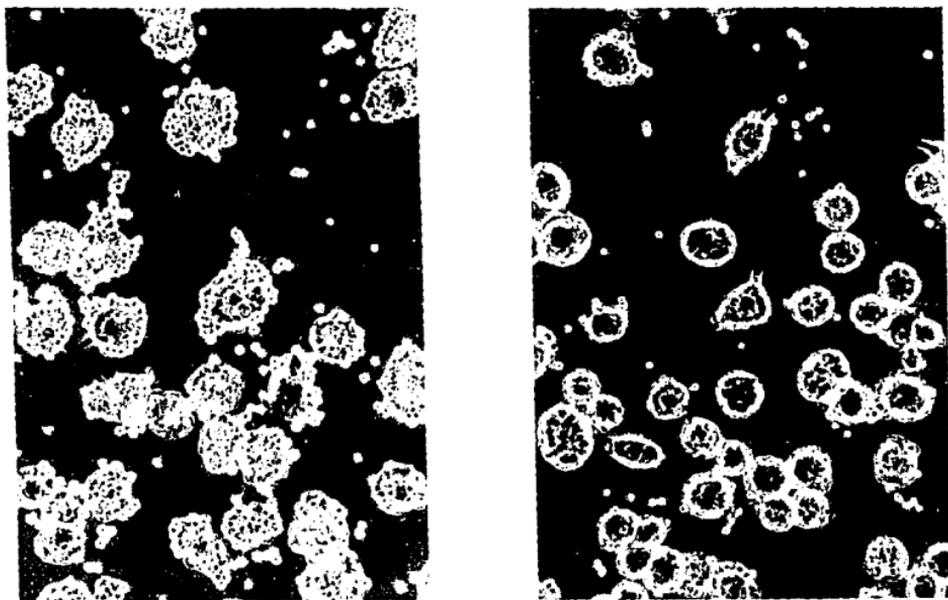


Figura 1. Macrófagos con rosetas (200 X) y fagocitosis de eritrocitos opsonizados (400 X)

ESTA TESIS SE REALIZO EN SU TOTALIDAD EN EL
LABORATORIO DEL DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO, EN EL
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA DEL INSITUTO DE
INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, U.N.A.M., GRACIAS AL APOYO
OTORGADO AL PROYECTO *MECANISMOS MOLECULARES DE
ACTIVACION DE CELULAS A TRAVES DE RECEPTORES DE
MEMBRANA PARA INMUNOGLOBULINA*, NUMERO IN205792, POR
LA DIRECCION PERSONAL DE APOYO AL PERSONAL
ACADEMICO.

CONDICIONES (FAGOCITOSIS)	MICROSCOPIA		COLORIMETRIA
	ROSETAS (%)	FAGOCITOSIS (%)	FAGOCITOSIS (DO)
IgG conejo α DNP	96	64	2.064
IgE α DNP	20	0	0.030
TNP	5	0	0.035
Eritrocitos solos	0	0	0.032
DO CELULAS	-----	-----	0.030

TABLA I. Comparación entre los resultados obtenidos mediante microscopía y colorimetría. Se aprecia la concordancia en los resultados obtenidos por ambos métodos, así como una coloración basal producto de las peroxidasa de los macrófagos en el ensayo colorimético.

Estos resultados demuestran que el proceso de haptización y opsonización previamente detallado, es adecuado para preparar eritrocitos que son fagocitados de manera específica vía receptores para IgG. Estos datos corroboran asimismo observaciones anteriores de la presencia en el macrófago de receptores para IgE y que estos receptores son incapaces de mediar fagocitosis (7). Esto demuestra que para la fagocitosis no basta la unión del eritrocito a la célula fagocítica, sino que esta unión debe ser a través de receptores con capacidad para mediar fagocitosis (54).

Como ya se ha mencionado, la evaluación por microscopía de la fagocitosis tiene varios inconvenientes para hacer estudios de varias condiciones de la fagocitosis. En vista de lo anterior decidimos estandarizar un microensayo colorimétrico que nos permitiera cuantificar la fagocitosis de eritrocitos de una manera más sencilla y rápida y con la sensibilidad adecuada. El método se basa en el propuesto originalmente por Jungi en 1985 (56), en el cual se explota la actividad de pseudoperoxidasa que presenta la hemoglobina, para catalizar la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la oxidación concomitante de la 3,3'-diaminobenzidina, que al oxidarse adquiere un color que puede medirse espectrofotométricamente. En las condiciones del ensayo, la cantidad de producto colorido formado está en función directa del número de eritrocitos internalizados (fagocitados) por las células.

En la figura 2 se observan los resultados de un experimento que demuestra la relación directa existente entre la densidad óptica medida espectrofotométricamente y el número de eritrocitos en cada pozo.

CURVA PATRON DE ERITROCITOS

ESPECTROFOTOMETRIA CON DAB

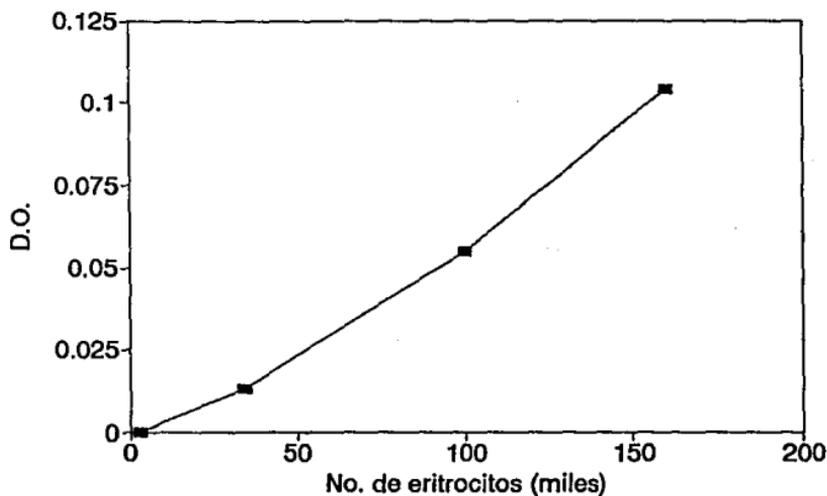


Figura 2

Curva de eritrocitos obtenida con el ensayo colorimétrico. Se aprecia la relación lineal entre número de eritrocitos y la DO obtenida.

La evaluación mediante el ensayo colorimétrico de la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG e IgE y de eritrocitos no opsonizados, por células de la línea P388, concuerda con los resultados obtenidos por microscopía, como lo muestra la Tabla I. La concordancia entre los resultados obtenidos por los dos métodos, apoya la validez del ensayo colorimétrico para cuantificar la fagocitosis de eritrocitos.

Una vez establecida la concordancia de la evaluación de la fagocitosis por el microensayo colorimétrico con los resultados obtenidos por evaluación al microscopio, utilizamos el microensayo para estudiar comparativamente la fagocitosis de eritrocitos opsonizados por distintas células del linaje monocito-macrófago. Se estudiaron las líneas celulares P388, J774 y RAW (macrófagos murinos), así como los macrófagos obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones. En la Figura 3 se muestra la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con diversos anticuerpos, por los distintos tipos de células fagocíticas utilizados. Es importante hacer notar que los tiempos del ensayo con cada una de las células son diferentes. Esto se hace necesario porque los distintos tipos celulares presentan diferencias en la eficiencia y rapidez con que llevan a cabo la fagocitosis. Así por ejemplo, mientras células de la línea P388 requieren una incubación de 90 minutos con los eritrocitos opsonizados, para fagocitar eritrocitos suficientes para dar valores de

DO significativos. Para las células de la línea J774 es de 15 a 45 minutos y para macrófagos inflamatorios, residentes y células RAW este tiempo es de 30 minutos.

CUANTIFICACION DE FAGOCITOSIS DENSIDAD OPTICA

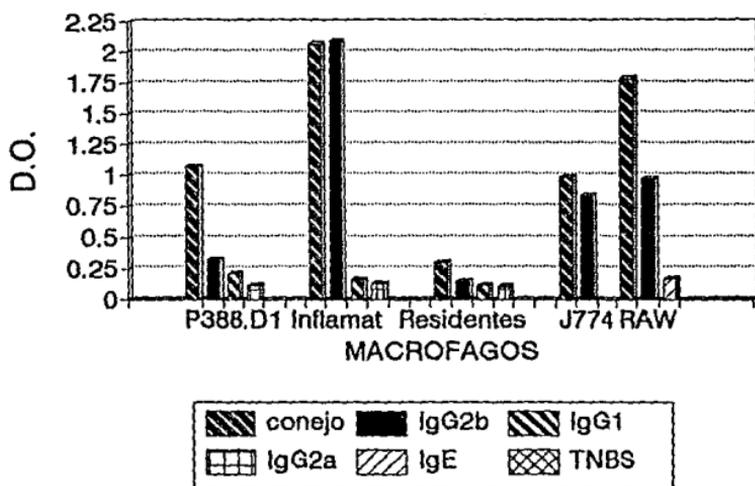


Figura 3

Presentación de un experimento representativo de la fagocitosis mediada por distintos anticuerpos, para cada tipo celular. No cabe comparación entre cada tipo celular por haberse realizado los experimentos en días distintos. Los resultados están dados en unidades de DO.

Mediante el ensayo colorimétrico se determinó, asimismo, la eficiencia de distintos anticuerpos opsonizantes para mediar la fagocitosis. Los resultados de varios experimentos para cada tipo celular se muestran en las Figuras 4 a 8. Los anticuerpos anti-DNP que se emplearon para opsonizar fueron: IgG policlonal de conejo, y los anticuerpos monoclonales murinos 3B5 (isotipo IgG2b), 4F8 (IgG2b), 2C5 (IgG1) y 3G10 (IgG2a). La opsonización, en todos los casos, se hizo utilizando concentraciones subhemaglutinantes del anticuerpo. Para graficar conjuntamente los resultados de experimentos realizados en días diferentes, los valores de densidad óptica se normalizaron para cada experimento individual, tomando el valor obtenido al opsonizar con anticuerpos 3B5 como 100%. Esta normalización es necesaria ya que los valores de densidad óptica obtenidos en cualquier experimento no pueden ser directamente comparados con los obtenidos en otros experimentos, ya que varios parámetros, como el tiempo de la reacción enzimática antes de hacer la lectura, el número de células por pozo, etc, pueden variar ligeramente de un día al otro.

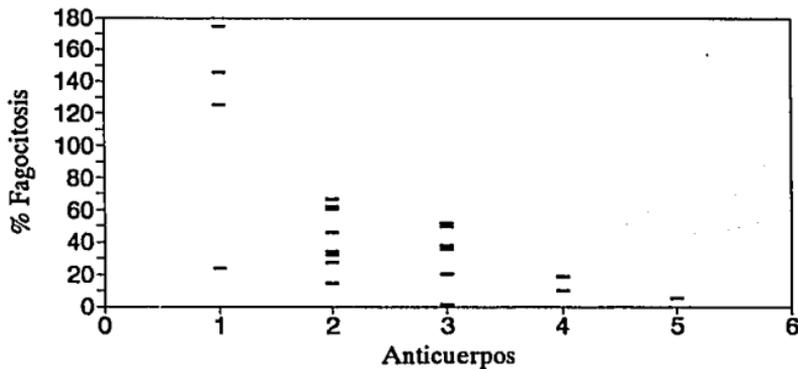
Los resultados muestran que la eficiencia de la fagocitosis depende en gran medida del anticuerpo opsonizante. No sólo existen diferencias notables entre anticuerpos de distintos isotipos, sino que aún entre dos anticuerpos del mismo isotipo (3B5 y 4F8), existen diferencias significativas. Es notable que

prácticamente en todos los distintos tipos de macrófagos examinados, el anticuerpo más eficiente para mediar la fagocitosis fué la IgG policlonal de conejo. En los siguientes párrafos nos referiremos a los resultados observados para cada tipo celular individual.

Células P388. Concordando con los resultados observados al microscopio, las células de la línea P388 fagocitan más eficientemente eritrocitos opsonizados con IgG de conejo, seguida de los anticuerpos 3B5 (IgG2b), 2C5 (IgG1) y 3G10 (IgG2a), mientras que los eritrocitos únicamente sensibilizados no son fagocitados (Figura 4). Esta línea celular fagocita comparativamente menos que las otras células empleadas. Las determinaciones independientes del número de rosetas entre eritrocitos opsonizados con IgG y los distintos tipos celulares, indicaron que las células P388 formaban rosetas más débiles, lo que hace pensar que la densidad de receptores Fc γ en estas células es menor. Esto podría determinar su relativamente baja capacidad fagocítica.

P388

Fagocitosis normalizada (3B5=100%)



- | | | |
|----------------|---------------|-----------------|
| - 1 conejo | - 2 IgG1(2C5) | - 3 IgG2a(3G10) |
| - 4 IgG2b(4F8) | - 5 TNP | |

Figura 4

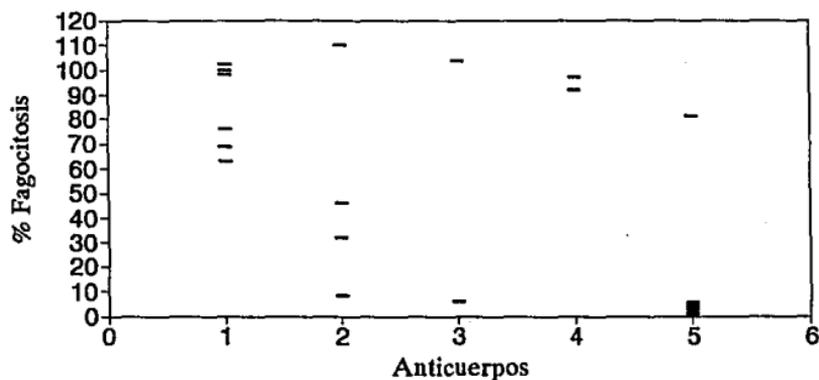
Fagocitosis de las células P388 normalizada con respecto al resultado del moAc 3B5. Se muestran los resultados normalizados para cada anticuerpo usado: 1-IgG conejo, 2-IgG1, 3-IgG2a, 4-IgG2b, 5-eritrocitos sin opsonizar. Cada línea representa el resultado de un experimento para cada anticuerpo.

Macrófagos inflamatorios. Estas células presentan menores variaciones en su capacidad fagocítica con respecto al tipo de anticuerpo opsonizante. Prácticamente presentan niveles similares de fagocitosis con eritrocitos opsonizados con IgG de conejo o con los anticuerpos 3B5 (IgG2b), 2C5 (IgG1), y 4F8 (IgG2b), y solamente la fagocitosis mediada por el anticuerpo 3G10 (IgG2a) es menor (Figura 5). Comparativamente con los otros tipos celulares estudiados, estas células son altamente fagocíticas.

Macrófagos residentes. Los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de los ratones presentan una alta actividad fagocítica de eritrocitos opsonizados con IgG de conejo (alrededor de dos veces la fagocitosis mediada por el anticuerpo 3B5). Por otro lado, no parece haber diferencias importantes en la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con los anticuerpos 3B5 y 4F8 (IgG2b), 2C5 (IgG1) y 3G10 (IgG2a) (Figura 6).

MACROFAGOS INFLAMATORIOS

Fagocitosis normalizada (3B5 = 100%)



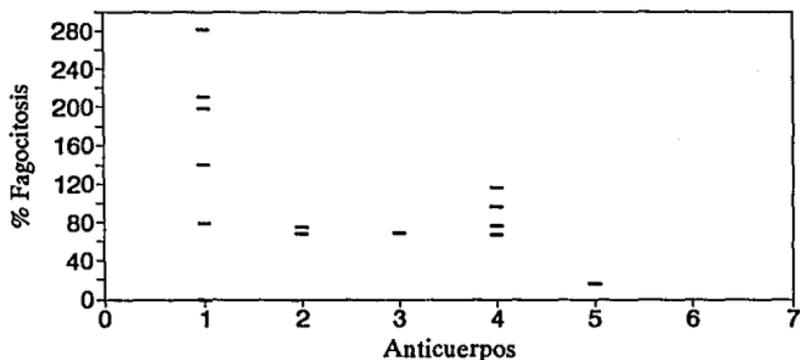
- 1 Conejo	- 2 IgG1(2C5)	- 3 IgG2a(3G10)
- 4 IgG2b(4f8)	- 5 TNP	

Figura 5

Fagocitosis de macrófagos inflamatorios, normalizada con respecto al resultado del moAc 3B5. Se muestran los resultados para cada anticuerpo usado al igual que la figura anterior.

MACROFAGOS RESIDENTES

Fagocitosis normalizada (3B5 = 100%)



- | | | |
|----------------|---------------|-----------------|
| - 1 Conejo | - 2 IgG1(2C5) | - 3 IgG2a(3G10) |
| - 4 IgG2b(4F8) | - 5 IgE(H10) | - 6 TNP |

Figura 6

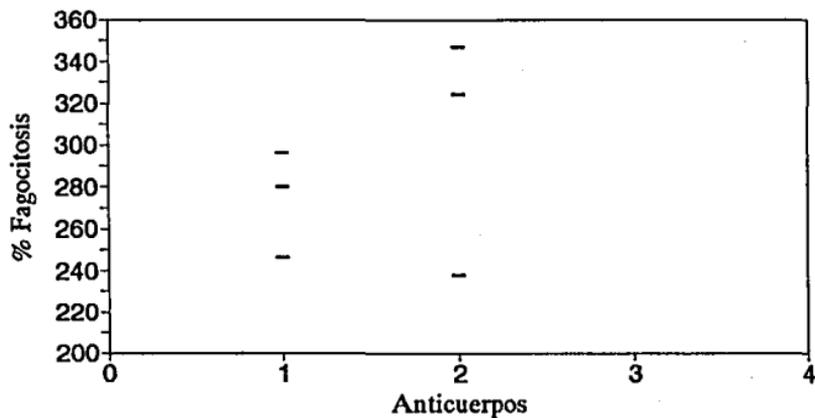
Fagocitosis de macrófagos residentes, normalizada con respecto al resultado de moAc 3B5. Se muestran los resultados normalizados para cada tipo de anticuerpo usado.

Células J774. Aunque con este tipo celular se hicieron menos determinaciones, es evidente (Figura 7) que tanto eritrocitos opsonizados con IgG de conejo, así como con el anticuerpo monoclonal 4F8 (IgG2b), son fagocitados más eficientemente que aquellos opsonizados con el anticuerpo 3B5.

Células RAW. La fagocitosis de los eritrocitos opsonizados con IgG de conejo o con los anticuerpos monoclonales 3B5 y 4F8, se muestra en la Figura 8. Aunque existe una gran dispersión de los valores obtenidos para eritrocitos opsonizados con IgG de conejo, podemos afirmar que la media de estos valores es moderadamente superior al 100%, mientras que los eritrocitos opsonizados con el anticuerpo 4F8 muestran valores similares a los obtenidos con el anticuerpo 3B5. Esto es lo que se esperaría dado que ambos anticuerpos pertenecen a la misma subclase. Eritrocitos opsonizados con anticuerpo de la clase IgE, no son fagocitados.

J774

Fagocitosis normalizada (3B5=100%)



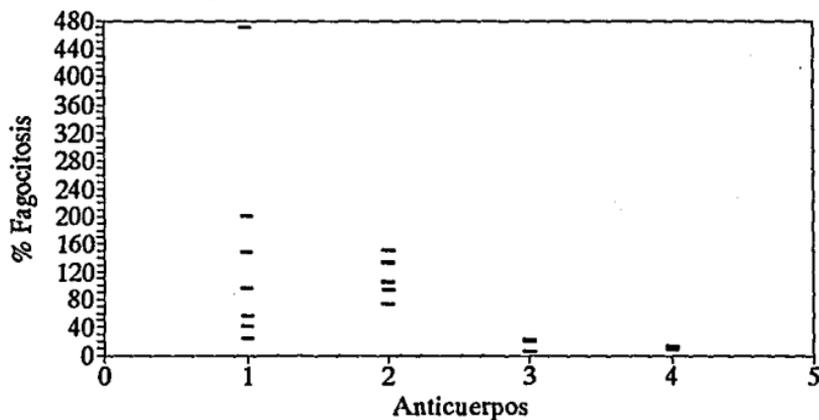
- 1 Conejo - 2 IgG2b(4F8) - 3 TNP

Figura 7

Fagocitosis de las células J774, normalizada con respecto al resultado del moAc 3B5.

RAW

Fagocitosis normalizada (3B5 = 100%)



- 1 Conejo - 2 IgG2b(4F8) - 3 IgE(H10) - 4 TNP

Figura 8

Fagocitosis de las células RAW, normalizada con respecto al resultado del moAc 3B5.

2. La inhibición de la fagocitosis por adición previa de complejos inmunes demuestra que la fagocitosis es vía FcR.

Una posible explicación para las diferencias observadas en la fagocitosis de los eritrocitos opsonizados por los distintos anticuerpos, es estos interaccionen con diversos receptores. Para examinar esta posibilidad se realizaron ensayos de inhibición de la fagocitosis por IgG soluble y por complejos inmunes.

Eritrocitos sensibilizados se opsonizaron con los anticuerpos monoclonales 3B5 (IgG2b) y 2C5 (IgG1) y se determinó la fagocitosis de éstos por células P388 preincubadas por 60 minutos a 4°C con IgG policlonal murina (purificada por cromatografía de afinidad a partir del suero de ratones normales) o bien con complejos inmunes formados con anticuerpo monoclonal (3B5 o 2C5) y antígeno multivalente (albúmina sérica bovina dinitrofenilada, DNP-BSA).

INHIBICION DE FAGOCITOSIS

Fagocitosis mediada por IgG1

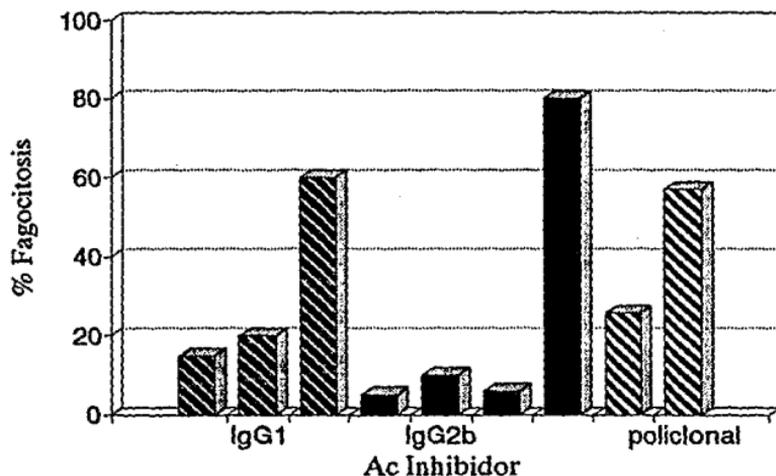


Figura 9

Inhibición de la fagocitosis por ocupación de los receptores. Los complejos DNP-BSA con anticuerpos de distintos isotipos ("IgG1, IgG2b"), así como IgG policlonal y monomérica de ratón ("policlonal"), se incuban con las células 30 minutos antes de la adición de los eritrocitos opsonizados con IgG1. Los resultados están dados en porcentaje del resultado en DO de las células sin inhibidores de la fagocitosis. Cada barra es un experimento, y está sombreada según la condición del ensayo.

Los resultados de la inhibición de la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con anticuerpo del isotipo IgG1, se muestran en la Figura 9. Los complejos inmunes formados con IgG1 provocan una inhibición del 40 al 95%, pudiendo considerársele una inhibición eficiente. Con la excepción de un solo experimento, la inhibición de la fagocitosis por complejos formados con IgG2b es aún más eficaz, con 95, 94, 90 y 20% de reducción de la ingestión. La IgG monomérica induce una inhibición menor, sin sobrepasar el 60% de inhibición.

La inhibición de la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con anticuerpos del isotipo IgG2b, se muestra en la Figura 10. Los complejos conteniendo IgG2b inducen una inhibición considerable de la fagocitosis (100, 92, 80 y 70%). La IgG monomérica provoca una inhibición de alrededor del 40%. Los complejos inmunes conteniendo anticuerpos del isotipo IgG1, no solo no inhiben la fagocitosis, sino que ésta aumenta hasta en un 30%. Estos resultados probablemente reflejen la distinta afinidad con la que la IgG1 y la IgG2b se unen a los dominios extracelulares de los diversos receptores Fc γ RI y Fc γ RII (ver Discusión).

INHIBICION DE FAGOCITOSIS

Fagocitosis mediada por IgG2b

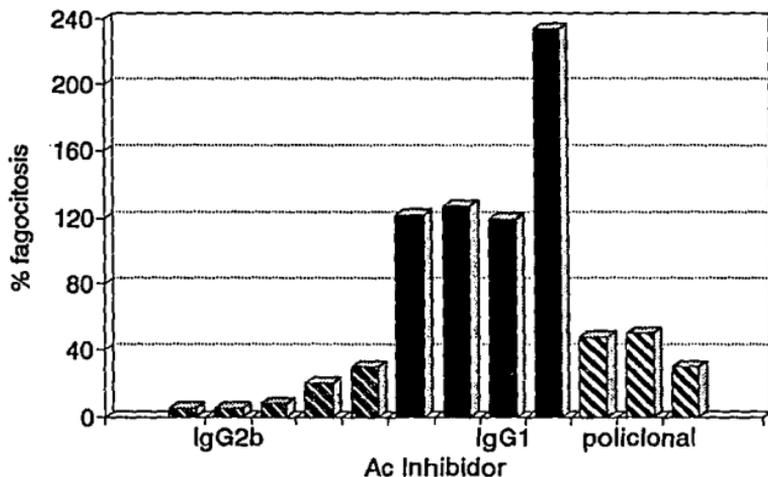


Figura 10

Inhibición de la fagocitosis por ocupación de los receptores. Los complejos DNP-BSA con anticuerpos de distintos isotipos ("IgG2b, IgG1"), así como IgG polimérica y monoclonal ("policlonal"), se incuban con las células 30 minutos antes de la adición de los eritrocitos opsonizados con IgG2b. Los resultados están dados en porcentaje de la DO de las células sin inhibidores de la fagocitosis. Cada barra es un experimento y está sombreada según la condición del ensayo.

3. Otras aplicaciones del método: Evaluación de la influencia de citocinas en la fagocitosis.

El microensayo colorimétrico que se estandarizó puede ser explotado para una gran variedad de tipos de experimentos. Uno de estos casos es la evaluación de la influencia de las citocinas u otros factores solubles en la fagocitosis, tema de interés en nuestro laboratorio.

En particular, existen ciertas evidencias que indican que las interleucinas IL-1 β e IL-6 podrían tener un efecto modulador positivo sobre la expresión de los receptores para IgG en células del linaje monocito-macrófago (25,46-49). Se sabe además, que ambas citocinas muestran actividades estimuladoras sobre células relacionadas con la respuesta inmune, aunque hasta el momento no existen reportes de que la IL-1 o la IL-6 induzcan activación de macrófagos para realizar fagocitosis. Dentro de este contexto, aplicamos el ensayo colorimétrico para investigar la posible actividad estimuladora de la IL-1 y la IL-6 sobre la fagocitosis, comparando sus actividades con la del Interferón gamma (IFN γ), cuya actividad estimuladora sobre macrófagos está bien documentada (15,16,41,52).

Células de la línea P388 fueron cultivadas en placas de 96 pozos durante 24 horas en presencia de IFN γ (a las concentraciones de 250 y 125 U/ml), IL-1 β , e

IL-6 (ambas a concentraciones de 5 y 2.5 ng/ml). Cada experimento se hizo en una placa con células provenientes del mismo cultivo y conteniendo el mismo número de células por pozo. Después de 24 hrs de incubación en presencia de las citocinas, se determinó la fagocitosis de eritrocitos opsonizados.

Los resultados de dos experimentos se muestran en las Figuras 11 y 12. El efecto estimulador del $\text{IFN}\gamma$ sobre la fagocitosis es bastante claro y estadísticamente significativo, lo que es confirmado por la prueba estadística de "t" de Student. Los resultados de la incubación con IL-1 muestran una estimulación menor que la inducida por $\text{IFN}\gamma$, aunque la prueba estadística "t" de Student indica que para este número de experimentos las diferencias no son significativas. La IL-6 tampoco indujo diferencias significativas en la fagocitosis con respecto a las células control.

El crecimiento de los cultivos celulares no se afecta por la incubación con ninguna de las citocinas utilizadas, como se pudo comprobar con el ensayo de evaluación del crecimiento del cultivo celular por *cristal Violeta*, del cual un resultado representativo se muestra en la Figura 13.

MODULACION DE LA FAGOCITOSIS(1) CITOCINAS

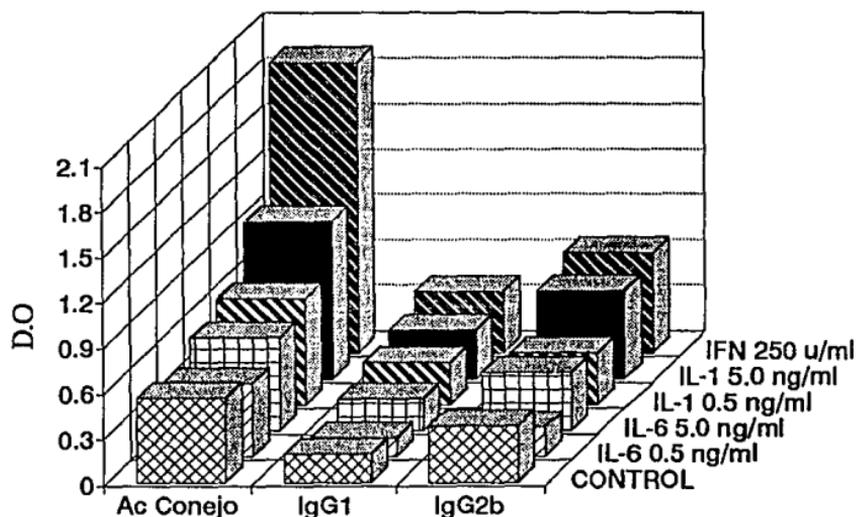


Figura 11

Modulación de la fagocitosis. Resultado en DO de un experimento de fagocitosis mediada por distintos anticuerpos, realizada por células P388 tras 24 horas de incubación con diversas concentraciones de $IFN\gamma$, IL-1 e IL-6.

MODULACION DE LA FAGOCITOSIS (2) CITOCINAS

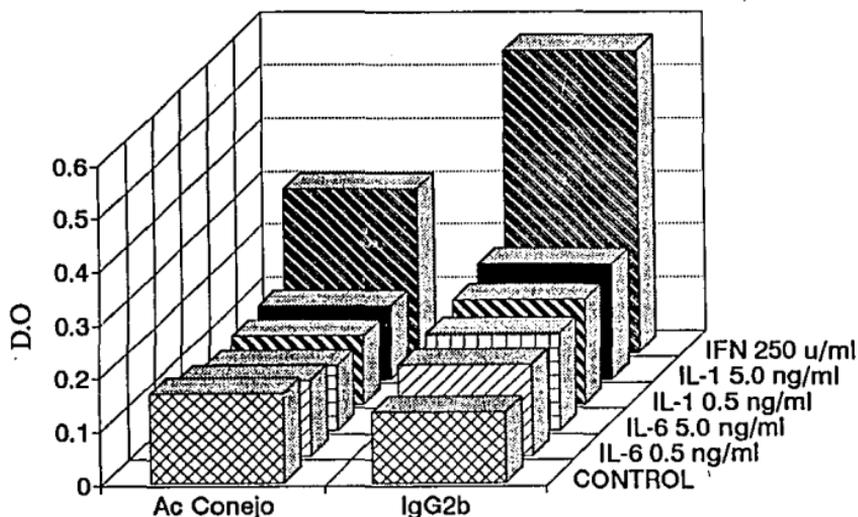


Figura 12

Modulación de la fagocitosis. Resultado en DO de un experimento de fagocitosis mediada por distintos anticuerpos, realizada por células P388 tras 24 horas de incubación con diversas concentraciones de IFN γ , IL-1 e IL-6.

CUANTIFICACION DE CRECIMIENTO CELULAR

Cultivos 24 hrs.con citocinas

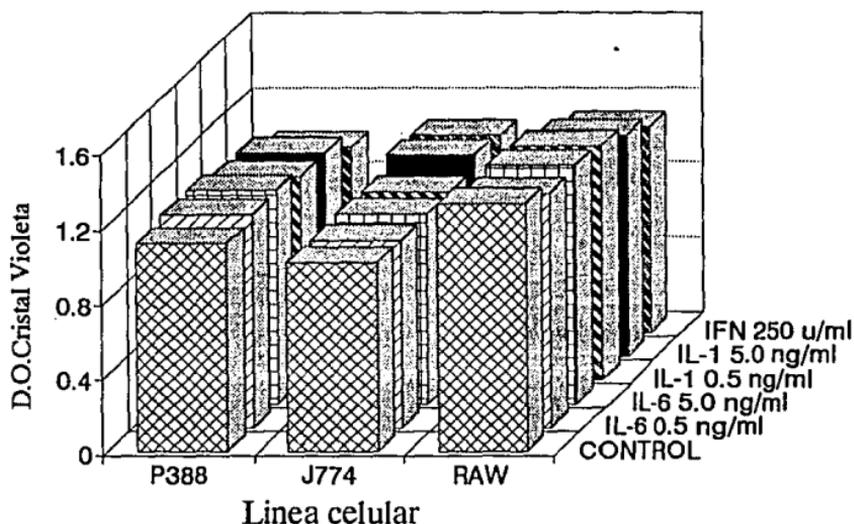


Figura 13

Cuantificación del crecimiento celular en presencia o ausencia de $INF\gamma$, IL-1 e IL-6. Se muestran los resultados de todos los tipos celulares utilizados.

DISCUSION

El modelo de fagocitosis que utiliza macrófagos murinos y eritrocitos opsonizados como partícula a fagocitar, es ampliamente usado para estudiar diversos aspectos de este proceso fisiológico. Los eritrocitos son relativamente de fácil obtención, manipulación y observación, al igual que los macrófagos murinos. La fagocitosis se evalúa la mayoría de las veces por microscopia. La evaluación microscópica de la fagocitosis tiene varios inconvenientes para aplicarse en el análisis de un número grande de muestras. Entre las principales podemos mencionar que cada condición experimental estudiada debe realizarse en cubreobjetos individuales, cuya manipulación para los lavados, incubaciones, montaje, etc, debe hacerse con mucho cuidado dado su extrema fragilidad. Pero quizás la mayor desventaja es el hecho de que la evaluación microscópica, que consiste en contar el número de eritrocitos ingeridos por cada una de al menos 200 células fagocíticas por cada condición experimental, requiere bastante tiempo y es fatigante para el experimentador.

El microsensayo colorimétrico como alternativa para evaluar la fagocitosis de eritrocitos presenta varias ventajas. Entre ellas están la sencillez y rapidez del método, así como el hecho de que la cuantificación colorimétrica está libre de

subjetividades y destrezas de los observadores. La validez de utilizar la actividad de pseudoperoxidasa de los eritrocitos ingeridos para cuantificar la fagocitosis, es apoyada por la concordancia observada entre los resultados obtenidos con el microensayo y con la evaluación microscópica de la fagocitosis. Asimismo demostramos que en las condiciones de nuestro ensayo, la densidad óptica muestra una relación directa con el número de eritrocitos por pozo.

De esta forma, afirmamos que la aparición de color en el ensayo de la fagocitosis, es debida a la oxidación de la DAB por la actividad de pseudoperoxidasa de la hemoglobina de los eritrocitos fagocitados. A pesar de que los macrófagos poseen en su citoplasma peroxidases, la cantidad de éstas no es suficiente como para hacer aparecer por sí mismas un notable producto colorido. El hecho de que los eritrocitos opsonizados con $IgE\alpha DNP$ no reporten color, nos asegura que éste es debido sólo a los eritrocitos ingeridos y no a los proporcionados a las células, a pesar de que se llegaron a unir a ellas (Tabla I)

Los resultados de la fagocitosis mostrados en la figura 3 nos ejemplifican un experimento representativo para cada tipo celular, en donde se notan tanto diferencias entre la fagocitosis por cada uno de los distintos tipos celulares, como la influencia del anticuerpo opsonizante. Estas diferencias pueden apreciarse al normalizar los resultados de DO, en este caso hechas con respecto al resultado del

moAc 3B5. Las células P388 son una línea celular que fagocita comparativamente menos que las otras células, requiriendo tiempos de incubación de hasta 90 minutos. Observaciones previas al microscopio revelaron que la cantidad de eritrocitos opsonizados con IgG en las rosetas que formaban estas células era menor comparando a las formadas con macrófagos inflamatorios, lo que nos lleva a pensar en un número menor de Fc γ R en la superficie celular de la línea P388, que realiza la fagocitosis menos eficiente. Esto mismo se aplica para el índice fagocítico, que rara vez alcanzó los 10 eritrocitos por célula, cifra obtenida por los pequeños macrófagos inflamatorios en tiempos aún más cortos.

La normalización de los resultados de la fagocitosis por los macrófagos inflamatorios nos permite definir el perfil de la fagocitosis del ensayo con estas células. Debido a que estas células provienen de un ratón estimulado con tioglicolato, no es de sorprendernos la gran capacidad fagocítica que presentan. Su comportamiento es muy parecido al de los macrófagos residentes del peritoneo, con respecto a los tiempos de fagocitosis y al orden de eficiencia relativa de los anticuerpos para mediar fagocitosis. Esto sugiere que la cantidad y tipo de receptores para IgG que poseen los macrófagos provenientes del peritoneo, son similares, a pesar de la característica de activación de los inflamatorios que no poseen los macrófagos residentes.

Las células J774 se suman al consenso encontrado del orden de eficiencia para mediar fagocitosis: IgG de conejo > IgG2b. Sin embargo, los moAc del isotipo IgG2b (3B5 y 4F8), presentaron diferencias en los resultados de la fagocitosis: la fagocitosis mediada por 4F8 se encontró al menos un 200% arriba del resultado de 3B5. Esta diferencia puede ser debida a las afinidades por el antígeno y el título de los anticuerpos en cada ensayo. Si uno de ellos tiene un título menor que el segundo, se debe opsonizar con una cantidad de anticuerpo mayor. Cabe la posibilidad de que se encuentren anticuerpos parcialmente activos, por lo que la cantidad de anticuerpo por eritrocito es mayor. En estas células, los casos de menor título de 4F8 sobre 3B5 fueron 2 de 3.

En el caso de las células RAW, la IgG de conejo aventaja nuevamente al isotipo IgG2b, mientras que de los eritrocitos opsonizados con el moAc IgE, el resultado es considerado una ingestión nula.

Con respecto a los resultados de inhibición de la fagocitosis, nos sugieren que los anticuerpos policlonales monoméricos se unen con menor afinidad a los receptores, por lo que la inhibición aunque visible es modesta (Figuras 9 y 10). Los complejos formados con el moAc 3b5, del isotipo IgG2b, se unen más eficientemente a los receptores y por ello inhiben la fagocitosis en porcentajes que llegan al 100%. Los casos de inhibición casi total de la ingestión ocurren cuando

la opsonina es la misma IgG2b y es no total cuando ésta es IgG1 y la opsonina es IgG2b (Figura 10). Por otro lado, la fagocitosis mediada por IgG1 se inhibe mejor con los complejos formados con IgG2b que por IgG1, aunque no es total en ningún caso.

Esto puede explicarse considerando que la IgG2b se une al dominio extracelular de los receptores Fc γ RI y Fc γ RII/III (estos últimos iguales extracelularmente), mientras que el isotipo IgG1 se une preferentemente al receptor de alta afinidad, Fc γ RI (10). Postulamos por ello que los complejos inmunes conteniendo IgG2b estarían bloqueando eficientemente todos los receptores, tanto Fc γ RI como Fc γ RII/III, por lo que inhiben la fagocitosis mediada por los anticuerpos IgG1 e IgG2b. Los complejos de IgG1 dejan libres dos receptores (Fc γ RII y Fc γ RIII).

Por ello la fagocitosis mediada por IgG1 se inhibe relativamente bien con los complejos formados con IgG1, pero este complejo no bloquea los receptores Fc γ RII/III, que sí pueden ser ocupados por IgG2b. Ahora bien, puede ser por esto que se observa un incremento ligero de la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG2b: se facilitaría la ingestión de los eritrocitos al realizarse una opsonización *in situ*, si los anticuerpos pertenecientes al complejo exhibieran uno de sus sitios activos libres, que entonces se uniría a grupos TNP libres del eritrocito. Estos

grupos TNP existen puesto que la opsonización se hace con concentraciones subhemaglutinantes, que dejan sitios sin ocupar por anticuerpo. Si este es IgG2b, puede unirse, ocupar los receptores II/III y mediar fagocitosis.

La aplicación del método a una gran cantidad de protocolos de investigación es inmediata. Para demostrarlo se realizaron algunos experimentos de modulación de la fagocitosis por citocinas, en donde apreciamos que el método colorimétrico y nuestro sistema de opsonización es lo suficientemente sensible para la cuantificación y caracterización de estas condiciones. Ello se ejemplifica en las figuras 11 y 12, dos experimentos con resultados preliminares en este sentido. Los mismos nos invitan a continuar el estudio de estos moduladores de la fagocitosis, puesto que aún no se tiene resultados concluyentes en cuanto a la acción de las interleucinas 1 y 6.

La experimentación en esta dirección sin contar con un método como el descrito en esta tesis, se antoja un trabajo arduo, engorroso y tardado. Sin embargo, gracias al microensayo ésta y otras preguntas se pueden formular y avocarse a buscarles una respuesta.

La figura 13 nos muestra el efecto nulo de las citocinas sobre el crecimiento celular de nuestros cultivos, cuantificado por el método de cristal violeta (60).

CONCLUSIONES

- 1) El método de opsonización indirecta, que se vale de la molécula TNBS, nos permite explorar la fagocitosis mediada por distintos isotipos de anticuerpos monoclonales dirigidos contra un solo antígeno, DNP.
- 2) El método colorimétrico estandarizado en este trabajo, ofrece una cuantificación confiable de la fagocitosis mediada por $Fc\gamma R$, de una manera sencilla, rápida y sensible.
- 3) Gracias a este método se han podido clasificar por su eficiencia para mediar fagocitosis, a los anticuerpos monoclonales y policlonales obtenidos en nuestro laboratorio, así como la eficiencia de realizar fagocitosis de las distintas líneas celulares con las que se trabajó.
- 4) Los experimentos referentes a la modulación de la fagocitosis aún no arrojan resultados concluyentes. No obstante el método se aplica al estudio de esta faceta del sistema inmune.

BIBLIOGRAFIA

1. Du Pasquier, L. (1989) **Evolution of the Immune System.** En *Fundamental Immunology, 2th Ed.*, editado por W. Paul, pp 139-165. Raven Press, N.Y.
2. Klein, J. (1990) **Lymphocytes and the rest.** En *Immunology*, editado por J. Klein, pp 29-49. Blackwell Sci.Publ., Gran Bretaña.
3. Klein, J. (1990) **Immunoglobulins and Their Receptors.** En *Immunology*, editado por J. Klein, pp 102-160. Blackwell Sci.Publ., Gran Bretaña.
4. Bablinsky (1978) *Introducción a la embriología.* pp 305, Editorial Omega, España.
5. Auger, M. (1992) **The biology of the Macrophage.** En *The Natural Immune System. The Macrophage.* Editado por C. Lewis, pp 3-74. Oxford Univ. Press, N.Y.
6. Klein, J. (1990) **Defense reactions mediated by phagocytes.** En *Immunology*, editado por J. Klein, pp 311-334. Blackwell Sci.Publ., Gran Bretaña.
7. Silverstein, S. (1993) **Phagocytosis.** En *Fundamental Immunology, 3th Ed.*, editado por W. Paul pp 941. Raven Press, N.Y.

8. Speert, D. (1992) **Macrophages in bacterial infection.** En *The Natural Immune System. The Macrophage.* Edit. por C. Lewis, pp 215-264. Oxford Univ. Press, N.Y.
9. Hellen, C. (1992) **Citokine enhancement of complement-dependent phagocytosis by macrophages: synergy of TNF α and GM-CSF for phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*.** *Eur.J.Immunol.* 22:1447
10. Jeffrey, V. (1990) **Antibody-Mediated Endocytosis.** En *Fc Receptors and the Action of Antibodies.* Editado por H. Metzger, pp 211-235. Am.Soc.Microbiol., Washington, D.C.
11. Sheireiber, R. (1990) **Expression of murine FcR for IgG.** *J.Immunol.* 144(12):4735.
12. Kinet, J.P. (1989) **Antibody-Cell interactions: Fc receptors.** *Cell* 57:351.
13. Fridman, W. (1991) **Fc receptors and Ig binding Factors.** *FASEB J.* 5:2684.
14. Odin, J. (1990) **Fc γ Receptors, a diverse and multifunctional gene family.** En *Cellular and Molecular Mechanisms of inflammation.* Vol.1:1. Editado por Cochrane, C. Academic Press, USA.
15. Ravetch, J (1991). **Fc Receptors.** *Ann.Rev.Immunol.* 9:457.
16. Haeflner-Cavaillon, N. (1979) **Studies on the Fc γ Receptor of the murine macrophage-like cell line P388D $_1$.** *J.Immunol.* 123(5):1905.

17. Capron, M. (1989) **The second receptor for IgE in Eosinophil effector function.** En *Structures and functions of low affinity Fc receptors. Chem.Immunol.* Editado por W.Fridman, pp 128-178. Karger, Suiza.
18. Yodoi, J. (1989) **Regulation of the expression of FcER and IgE-BF.** En *Structures and Function of low affinity receptors.* Editado por Fridman Karger Ed. Chem.Immunol., Suiza.
19. Rees, R. (1992) **Macrophages in tumor immunity.** En *The Natural Immune System. The Macrophage.* Editado por C. Lewis, pp 315-358. Oxford.Univ.Press, N.Y.
20. Crocker, P. (1992) **The macrophage in the control of the Haematopoiesis.** En *The Natural Immune System. The Macrophage.* Editado por C. Lewis, pp 115-156. Oxford Univ.Press, N.Y.
21. Adams, D. (1992) **Molecular Basis of Macrophage activation: Diversity and Origins.** En *The Natural Immune System. The Macrophage.* Editado por C. Lewis, pp 75-114. Oxford Univ.Press, 22. Arai, K. (1990) **Citokines: coordinators of immune and inflammatory responses.** *Ann.Rev.Biochem.* 59:783.
23. Miyajama (1992) **Common subunits of cytokine receptors and the functional redundance of citokines.** *TIBS.* 17:378.

24. Nacy, C. (1990) **Intercellular Communication: Macrophages and Citokines.**
En: *Molecular aspects of immune response and infectious disease* Editado por
H.Kiyono, Raven Press, LTD, New York.
25. Ganes, C. (1992) **The Interferon System.** *J.Biol.Chem.* 267(8):5017.
26. Murray, H (1985) **Activation of mouse peritoneal macrophages *in vitro* and
in vivo by IFN γ .** *J.Immunol.* 134(3): 1619.
27. Corradin, B. (1991) **Phagocytosis enhances murine macrophage activation
by IFN γ and TNF α .** *Eur.J.Immunol.* 21:2553.
28. Narumi, S. (1990) **IFN γ and IL-2 synergize to induce selective monokine
expression in murine peritoneal macrophages.** *J.Biol.Chem.* 265(12):7036.
29. Celada, A. (1984) **IFN γ activates multiple pathways to regulate the
expression of genes for MHC-II I-A β , TNF and complement component C3 in
mouse macrophages.** *Eur.J.Immunol.* 19:1103.
30. Thomas, L. (1977) **The role of Ia antigen in T cell activation.** *Immunol.Rev.*
35:7.
31. Steeg, M. (1982) **Regulation of macrophage Ia antigen expression by
lymphokine with immune IFN γ activity.** *J. Exp. Med* 155:1780.
32. Warren, M. (1985) **Opposing effects of glucocorticoids of IFN γ induced
murine macrophage FcR and Ia expression.** *J.Immunol.* 134:2462.

33. Guyne, P. (1983) Recombinant IFN γ increases Fc γ R on cultured human mononuclear phagocytes. *J. Clin. Invest.* 72:393.
34. Beckec, S. (1984) IFN γ inhibits phagocytosis of opsonized zimosan. *J. Immunol.* 132:1245.
35. Wright, S. (1986) IFN γ depresses binding of ligand by C3b and C3bi receptors on cultured human monocytes, and effect reversed by fibronectin. *J. Exp. Med.* 163:1245.
36. Granstein, O. (1987) IFN γ inhibits collagen synthesis in vitro in the mouse. *J. Clin. Invest.* 79:1254.
37. Ghezzi, L. (1988) IFN γ inhibits IL-1 production. *J. Immunol.* 140:4238.
38. Travis, J. (1993) Tracing the Immune System's Evolutionary History. *Science.* 261:164.
39. Durum, S. (1985) IL-1: an immunological perspective. *Ann. Rev. Immunol.* 3:263.
40. Durum, S. (1989) Macrophage derived mediators: IL-1, TNF α , IL-6, IFN and related cytokines. En *Fundamental immunology, 2th Ed.* editado por W. Paul, Raven Press, LTD, Nueva York.
41. Feder, L. (1993) Characterization of IL-1 and IL-6 production by hepatic endothelial cells and macrophages. *J. Leuko. Biol.* 48:412.

42. Théry, C. (1992) **IL-1 and TNF α stimulate the production of colony-stimulating Factor 1 by murine astrocytes.** *J.Neurochem.* 59(3):1183.
43. Galve de Rochemonteix, B. (1992) **C reactive protein increases production of IL-1 α , IL-1 β and TNF α and expresion of mRNA by human alveolar macrophages.** *J.Leukol.Biol.* 53(4):439.
44. Yu, S. (1990) **Gene regulation in macrophage activation: differential regulation of genes encoding for TNF α , IL-1, JE, and KC by INF γ and LPS.** *J.Leukol.Biol.* 48:412.
45. Van Snick, J. (1990) **IL-6: an overview.** *Ann.Rev.Immunol.* 8:253.
46. Hirano, T. (1992) **Biological and clinical aspects of IL-6.** *Imm.Today.* 11(12):443.
47. Hirano, T. (1985) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 82:5490.
48. Alosi, F. (1992) **Production of hemolympoietic cytokines (IL-6, IL-8, Colony Stimulating Factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 β and Tumor Necrosis Factor α .** *J.Immun.* 149(7): 2358.
49. Weir, D. (1985) **Macrophages cells lines.** En *Handbook of experimental immunology.* Pp 45.1. Editado por D.Weir, Blackwell Scientific Publications.
50. McCarron, R. (1984) **Methods for the collection of peritoneal and alveolar macrophages.** *Meth.Enzym.* 108: 274.

51. Bozdech, M. (1981) Identification of α -Naphthyl butirrate esterase as a plasma ectoenzyme of monocytes and a discrete intracellular membrane bounded organelle in lymphocytes. *J.Exp.Med.* 153:182.
52. Nathan, C. (1977) Characterization of the nonphagocytic adherent cell from the peritoneal cavity of normal and BCG-treated mice. *J.Immunol.* 118(5):1612.
53. Harlow, E. (1988) Antibodies. Cold Spring Harbor, Lab. USA.
54. Wright, S. (1986) Methods for the study of receptor-mediated phagocytosis. *Meth.Enzym.* 132:204.
55. Darryl R. (1986) Basic methods for the study of phagocytosis *Meth.Enzym.* 132:95.
56. Jungi, T (1985) A rapid and sensitive method allowing photometric determination of erythrophagocytosis by mononuclear phagocytes. *J.Immunol.Meth.* 82:141.
57. Kata, M. (1992) Antibody mediated lysis of hapten-conjugated target cells by macrophages and by complement: the influence of IgG subclass, Ab and hapten density. *Mol.Immunol.* 29(3): 379.
58. Kawai, M. (1991) Binding and endocytosis of erythrocytes sensitized with rabbit IgG via Fc gamma receptors on human monocytes. *Immunol.* 74: 657.

59. Tolnay, M. (1992) Interaction between rat peritoneal macrophages and sensitized erythrocytes: dependence on IgG subclass, antibody density and degree of hapten conjugation. *Mol.Immunol.* 29(3):385.
60. Kuengw, E. (1989) Cuantification of cell culture on 96-well plate. *Analytical Biochem.* 182:16.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADCC** - Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo
- APC** - Célula presentadora de antígeno
- CFU-GM** - Unidades Formadoras de Colonias Granulocito Macrófago
- DGVB₂₊** - Amortiguador de Gelatina, Dextrosa y Veronal
- DAB** - 3,3'-Diaminobenzidina
- DNP** - Dinitrofenol
- DO** - Densidad Optica
- Eop** - Eritrocitos opsonizados
- Es** - Eritrocitos sensibilizados
- Fc** - Fracción cristalizable de los Anticuerpos
- Fc γ** - Fc de Ig "Gama"
- F-GF** - Factor de crecimiento de Fibroblastos
- GM-CSF** - Factor estimulador de colonias Granulocito Macrófago
- Hb** - Hemoglobina
- IFN α , β , γ** - Interferón Alfa, Beta, Gama
- IgA, D, E, G, M** - Inmunoglobulina A, D, E, G, M

IL - Interleucina

IL-1r - Receptor para la IL-1

LPS - Lipopolisacárido

MHC - Complejo principal de histocompatibilidad

M-CSF - Factor estimulador de colonias de macrófagos

moAc - Anticuerpo monoclonal

MTC - Citotoxicidad tumoral mediada por macrófagos

NK - Células asesinas naturales

NO - Oxido nítrico

PBS - Solución de fosfatos salina

P-DGF - Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PEG₂ - Prostaglandina 2

SFB - Suero fetal bovino

TCR - Receptor de células T

TGFβ - Factor de crecimiento tumoral β

TNBS - Acido trinitro-benzen-sulfónico

TNP - Trinitrofenol

TNFα - Factor de necrosis tumoral

INDICE

Agradecimientos	
Resumen	1
Introducción	3
Objetivos	32
Material y Métodos	33
Resultados	49
Discución	74
Conclusiones	80
Bibliograffa	81
Lista de abreviaturas	89
Indice	91

