



43
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES MURINOS DE LA CLASE IgG,
ESPECIFICOS PARA EL 2,4-DINITROFENOL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUÍMICA FARMACEUTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A :

CLAUDIA ANGELICA GARAY CANALES

MEXICO D. F.,

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1994



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.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:

PROF. RODOLFO PASTELIN PALACIOS.

VOCAL:

PROF. ENRIQUE ORTEGA SOTO.

SECRETARIO:

PROF. FERNANDO GARCIA TAMAYO.

1° SUPLENTE:

PROF. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDES.

2° SUPLENTE:

PROF. ROXANA PELAYO CAMACHO.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

**DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INVESTIGADOR TITULAR, DEPTO INMUNOLOGIA**

SUSTENTANTE:

CLAUDIA ANGELICA GARAY CANALES.

Esta tesis se realizó bajo la supervisión del Dr. Enrique Ortega Soto, en el Departamento de Inmunología, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Gracias al apoyo otorgado por los Proyectos de CONACYT 1072-N9201, y a los proyectos de la DGAPA IN205792 E IN204293.

A mis padres, por el apoyo y ejemplo que siempre he recibido de ellos,
con todo mi amor, respeto y admiración....

A mis hermanos, Eri, Ale y Toño, por todos estos años de risas,
juegos, pleitos y mucho amor

A Beto, con mucho amor, por su paciencia y comprensión, aún en
contra de su voluntad, por su amistad y su amor de cada día y por los
maravillosos momentos que hemos pasado juntos

A Yofita con cariño

A Enrique, sobretodo por ser no solo un asesor sino más bien un gran amigo, por sus enseñanzas, su paciencia infinita y tantas otras cosas...

A mis amiguísimos de la honorable Facultad de Química, Luz, Adriana, Moni, Paty, Ernesto, Julio por todas esas horas que pasamos juntos tratando de sobrevivir en la escuela y por compartir conmigo los mejores momentos de la carrera.

A todos mis amigos del Instituto, a Martha, Isabel, Gino, Carla, Paty, Minerva, a los vecinitos, Vero, Alf, Vicky, Norma, Normita, Bertha, y a los otros vecinitos Julio, Meche, Gladis, Maricela, Ale, Nacho.....

A las secres, Isabel, Amada, Violeta.....

INDICE

	Pag.
LISTA DE ABREVIATURAS	III
INTRODUCCION	
1. Biología del Macrófago:	
1.1 El sistema fagocítico mononuclear.	2
1.2. Origen y cinética.	3
1.3. Funciones.	7
2. Receptores para inmunoglobulinas.	20
2.1. Nomenclatura.	21
2.2. Receptores Fc para inmunoglobulinas G (Fc γ R).	23
2.3. Relación estructura-función de los Fc γ R.	28
2.4. Mecanismos de acción de los Fc γ R.	31
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y METODOS	
2.1. Producción de anticuerpos monoclonales	36
2.2. Producción de anticuerpos policlonales	49
2.3. Purificación de anticuerpos monoclonales	51
2.4. Caracterización de anticuerpos monoclonales	55

RESULTADOS

3.1. Producción de anticuerpos monoclonales	60
3.2. Purificación de anticuerpos monoclonales	64
3.3. Caracterización de anticuerpos monoclonales	66

DISCUSION	85
-----------	----

CONCLUSIONES	92
--------------	----

BIBLIOGRAFIA	93
--------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

Acmo	Anticuerpo Monoclonal.
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.
AMP	Adenosil Mono Fosfato
BSA	Albúmina Sérica Bovina.
C	Complemento
CR	Receptor para Complemento.
CSF	Factor Estimulador de Colonias.
DAB	Diaminobencidina.
DGVB ²⁺	Amortiguador de Dextrosa, Gelatina y Veronal.
D-MEM	Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium.
DMSO	Dimetil Sulfoxido.
DNBS	Acido Dinitrobenzen Sulfónico.
DNP	2,4-Dinitrofenol.
DO	Densidad Optica.
EC	Extracelular.
ELISA	Enzime Linked Immunosorbant Assay.
Fc ϵ R	Receptor Fc para Inmunoglobulina ϵ .
Fc γ R	Receptor Fc para Inmunoglobulina γ .
G	Granulocito.
GM	Granulocito - Macrófago.
GPI	Glicosil Fosfatidil Inositol.
GRc	Glóbulos Rojos de Carnero.
H	Histamina.
HAT	Hipoxantina, Aminopterina, Timidina.
Hb	Hemoglobina.
hIgG	Inmunoglobulina G, humana.
HSA	Albúmina Sérica Humana.
HT	Hipoxantina, Timidina.

5HT	5-Hidroxitriptamina.
IC	Intracelular.
ICAM	Molécula de Adhesión Intercelular.
IFN	Interferon.
IL	Interleucina.
LT	Leucotrieno.
LIF	Factor Inhibidor de Migración de leucocitos.
LPS	Lipopolisacáridos.
M	Macrófago.
MAF	Factor Activador de Macrófagos.
MFF	Factor de Fusión de Macrófagos.
MIF	Factor inhibidor de Macrófagos.
MPS	Sistema Fagocítico Mononuclear.
NK	Células Natural Killer.
mIgG	Inmunoglobulina G, murina.
OVA	Ovoalbúmina.
PBS	Solución Balanceada de Fosfatos.
PEG	Polietilenglicol
PG	Prostaglandina.
PKC	Proteína Cinasa C.
RES	Sistema Retículo Endotelial.
RPM	Revoluciones por Minuto.
SFB	Suero Fetal Bovino.
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio.
TGF	Factor de crecimiento con actividad transformante.
TNBS	Acido Trinitrobencen Sulfónico.
TNF	Factor de Necrosis Tumoral.
TM	Transmembranal.

CAPITULO I

INTRODUCCION

La función principal del sistema inmunológico es defender a los animales de la invasión por organismos infecciosos y del efecto patogénico de sus productos tóxicos. Este sistema ha desarrollado un poderoso rango de mecanismos para localizar células extrañas, virus, o macromoléculas; para neutralizarlos y finalmente eliminarlos del cuerpo. Esta vigilancia es efectuada por proteínas y células que circulan a través del organismo. Existen muchos mecanismos diferentes que constituyen esta vigilancia y pueden dividirse en 2 categorías: inmunidad adaptiva y no adaptiva.

La inmunidad no adaptiva incluye respuestas tales como fagocitosis por macrófagos, secreción de lisozima por células lagrimales y lisis celular por células NK (natural killer) entre otras. Este tipo de respuestas no son iniciadas por receptores que reconozcan específicamente la estructura de las moléculas extrañas, ni son moduladas por repetidas exposiciones a la misma partícula extraña. En contraste, la inmunidad adaptiva es dirigida contra moléculas específicas y es aumentada por reexposiciones; esta inmunidad es mediada por linfocitos, los cuales poseen receptores superficiales (receptores de antígeno) o secretan proteínas (anticuerpos) que se unen específicamente a las partículas extrañas [1].

El sistema inmunológico está constituido por linfocitos, macrófagos y otras células relacionadas, incluyendo células dendríticas de bazo, células epidermales de Langerhans y células epiteliales especializadas tales como aquellas encontradas en el timo, médula ósea y otros órganos linfoides. Estas células se encuentran organizadas en tejidos incluyendo el bazo, nódulos linfoides, timo, médula ósea y placas de Peyer en el intestino. Una fracción importante de linfocitos y de macrófagos constituye una reserva circulante de células encontradas en sangre y linfa [2].

1. BIOLOGIA DEL MACROFAGO.

1.1. EL SISTEMA FAGOCITICO MONONUCLEAR:

El sistema fagocítico mononuclear comprende monoblastos y promonocitos de médula ósea, monocitos de sangre periférica y macrófagos tisulares. Los macrófagos, principales células efectoras de este sistema, están ampliamente distribuidos en todo el organismo, mostrando una gran heterogeneidad tanto estructural como funcional. Son encontrados en órganos linfoides, hígado, pulmones, tracto gastrointestinal, sistema nervioso central, cavidades serosas, huesos y piel. Estas células participan en un amplio rango de procesos tanto fisiológicos como patológicos [3].

El término "macrófago" fue utilizado por primera vez hace más de 100 años por Elie Metchnikoff en Messina, para describir grandes células mononucleares fagocíticas que observó en tejidos [4]. En 1924, Aschoff asignó estas células al sistema reticuloendotelial (RES), un amplio sistema de células que incluye células reticulares, células endoteliales, fibroblastos, histiocitos y monocitos [5]. Sin embargo, el RES incluía células que no pertenecen al linaje de los macrófagos, por lo que no constituía un sistema verdadero. En 1969 se acordó reemplazar este término por el nombre de sistema fagocítico mononuclear (MPS), basado en que los macrófagos comparten importantes características funcionales *in vivo* y son derivados de monocitos [6], mientras que las células endoteliales y fibroblastos no comparten tales características. Filogenéticamente, los fagocitos mononucleares son un tipo primitivo de células, encontrándose células relacionadas a ellas en formas tempranas de vida. Ontogenéticamente, los macrófagos se originan durante la etapa fetal en el saco vitelino [7], pero en el adulto tienen su origen en la médula ósea [8].

1.2. ORIGEN Y CINETICA:

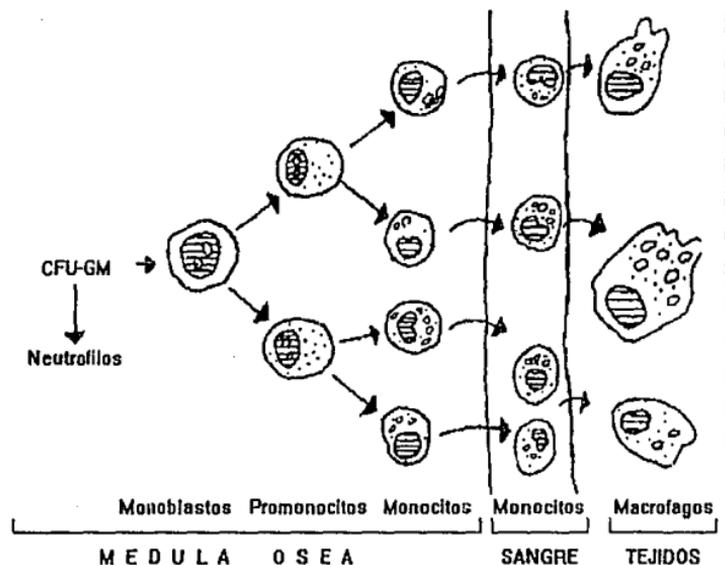


Fig. 1. Origen y diferenciación de los macrófagos.

Los macrófagos se originan en la médula ósea (Fig. 1). En el humano la médula ósea contiene tanto macrófagos residentes como sus precursores: monocitos, promonocitos y monoblastos. Tanto monocitos como neutrófilos se originan de una célula progenitora común en la médula ósea [9], conocida como unidad formadora de colonias granulocito-macrófago (CFU-GM). Estas células pueden dar origen a colonias de monocitos y neutrófilos en cultivos de médula ósea. La diferenciación de la célula progenitora hacia monocito o neutrófilo parece ocurrir en una etapa anterior al estado de promonocito o promielocito y es gobernada por diversas citocinas. Sin embargo, la línea celular HL-60 (promielocítica) se diferencia a monocito y macrófago en presencia de algunos ésteres de forbol y se diferencia a neutrófilo en presencia de DMSO (dimetil

sulfóxido). Esto sugiere que las células pueden hasta cierto punto revertir su proceso de diferenciación en etapas más tardías [10].

Los monoblastos son las células más inmaduras del sistema fagocítico mononuclear. Esta inmadurez se refleja en su morfología y ultraestructura. Los monoblastos contienen lisozima y esterasa no específica aunque en cantidades relativamente pequeñas. Todos los monoblastos tienen receptores para IgG y son capaces de fagocitar eritrocitos opsonizados con IgG, pero no con C3b, y raramente ingieren bacterias opsonizadas [11]. La división del monoblasto da origen a 2 promonocitos; éstos contienen lisozima, esterasa no específica y además gránulos positivos de peroxidasa. La mayoría de los promonocitos tienen receptores para Fc γ y C3b, fagocitan eficientemente eritrocitos opsonizados con IgG y bacterias opsonizadas, pero la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con C3b es relativamente pobre [11, 12], (Fig 2). A diferencia de los monoblastos, los promonocitos tienen una gran capacidad pinocítica. Se cree que la división de los promonocitos da origen a dos monocitos.

Los monocitos recién formados posiblemente permanecen en la médula ósea menos de 24 horas antes de pasar a la sangre periférica, donde se distribuyen entre reservas circulantes y marginales [13, 14]. En humanos adultos normales, los monocitos de sangre periférica representan entre el 1 y el 6% del total de células blancas y raramente exceden el 10%. La migración de monocitos de sangre periférica a tejidos extravasculares para convertirse en macrófagos involucra adherencia al endotelio, migración entre células endoteliales y paso a través de estructuras subendoteliales. Citocinas tales como la interleucina-1 (IL-1) y el interferón gama (IFN- γ) incrementan la expresión de ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1, CD54) por células endoteliales y pueden por tanto, facilitar la marginación y migración de monocitos a los sitios de inflamación [15]. La migración de monocitos a los distintos órganos ocurre aparentemente al azar, y es proporcional al tamaño del órgano. Una vez que los monocitos han llegado a un órgano, se diferencian a macrófagos adquiriendo características peculiares según el órgano en el que se alojen (Tabla I) [16]. Los monocitos que han dejado la circulación no regresan a ella, permaneciendo en los tejidos como macrófagos durante varios meses. Mas del 95% de los macrófagos en tejidos derivan de

monocitos, y el 5% restante deriva de la división local de fagocitos mononucleares. La población de macrófagos alojados en tejidos está en un proceso dinámico de renovación por un influjo constante de monocitos.

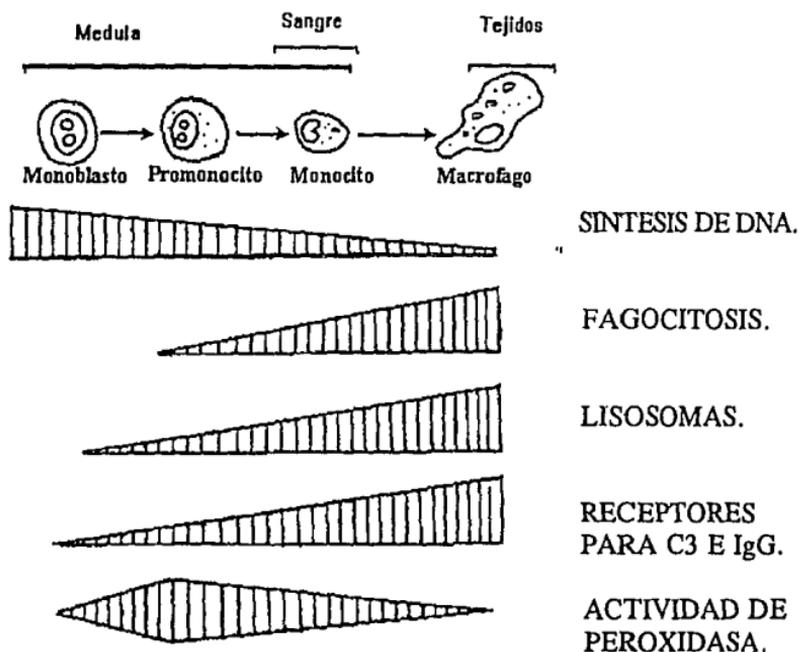


Fig. 2. Características de las células del MPS, mostrando el desarrollo de la actividad fagocítica, lisosomas, receptores para IgG y C3h, y la actividad de peroxidasa.

Tabla I Distribución de las células del sistema fagocítico-mononuclear.

Médula ósea

Monoblastos
Promonocitos
Monocitos
Macrófagos

Sangre periférica

Monocitos

Tejidos

Hígado - células Kupffer
Pulmones - macrófagos alveolares
Tejido conectivo - histiocitos
Bazo - macrófagos de pulpa roja
Nódulos linfáticos
Timo
Huesos - osteoclastos
Sinovium - células tipo A
Mucosa asociada a tejido linfoide
Tracto gastrointestinal
Tracto genitourinario
Organos endócrinos
Sistema nervioso central - microglia
Piel - histiocitos y células de Langerhans

Cavidades Serosas

Macrófagos de la pleura
Macrófagos peritoneales

Tejidos Inflamatorios

Células epiteliales
Macrófagos de exudados
Células gigantes multinucleadas

El destino final de los macrófagos tisulares es incierto. El número de macrófagos que mueren es considerable, ya que la producción total de monocitos en el ratón es aproximadamente de 1.5×10^6 células en 24 hrs, y todas esas células eventualmente se convertirán en macrófagos tisulares [8]. La cinética de producción y maduración de los fagocitos mononucleares cambia durante los procesos inflamatorios. Durante una reacción inflamatoria el número de monocitos circulantes se incrementa debido a un aumento en la producción en la médula ósea [17]. Sin embargo, el tiempo que permanecen en circulación es más corto que en condiciones normales, debido a un elevado influjo de monocitos de la circulación a los exudados inflamatorios. Excepto por la pequeña cantidad que proviene de la producción local, la mayor parte del aumento en el número de macrófagos en un proceso inflamatorio, proviene del influjo de monocitos [18].

1.3. FUNCIONES :

Las funciones de los macrófagos son múltiples. Estas células se encuentran continuamente verificando el ambiente y respondiendo a diversos estímulos.

El macrófago expresa en su membrana diversos receptores que le permiten interactuar con un amplio rango de hormonas, proteínas endógenas y exógenas, polisacáridos y lípidos. En la Tabla II se muestra una lista parcial de algunos receptores expresados en macrófagos.

Los macrófagos poseen receptores para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G (Fc γ R) y para componentes del sistema del complemento (C) [19-21]. La función de éstos es promover la internalización de partículas y/o moléculas cubiertas con anticuerpos y/o componentes del complemento. Ambos receptores pueden actuar sinérgicamente para incrementar, varios cientos de veces, la cantidad de partículas opsonizadas que son internalizadas. Los receptores Fc γ R y CR3 son, por tanto moléculas de superficie claves para la eliminación de microorganismos y complejos inmunes solubles.

Tabla II. Receptores de superficie expresados en la membrana plasmática de Macrófagos y Monocitos.

Receptores Fc para inmunoglobulinas:

Fc γ RI
Fc γ RII
Fc γ RIII
FceRII

Receptores para complemento:

CR1
CR3
CR4
Receptor de C5a

Receptores para citocinas:

Receptor de interferón α y β
Receptor de interferón γ
Receptor de IL-1, IL-2, IL-3, IL-4
Receptor de M-CSF, M-CSF1, GM-CSF,
Receptor de TNF α
Receptor de TGF β
Receptor de MIF, MAF, LIF, CF, MFF

Receptores para péptidos y pequeñas moléculas:

Receptor de H $_1$, H $_2$, 5HT
Receptor de 1,2,5-dihidroxi vitamina D3
Receptor de arg-vasopresina

Receptores de hormonas:

Receptor de Insulina
Receptor de Glucocorticosteroides
Receptor de Angiotensina

Receptores de Lípidos y Lipoproteínas

- Receptor de Lipoproteínas aniónicas de baja densidad
- Receptor de PGE₂, LTB₄, LTC₄, LTD₄, PAG
- Receptor de Apolipoproteínas B y E

Receptores para coagulantes y anticoagulantes:

- Receptor de Fibrinógeno/fibrina
- Receptor de factor de coagulación VII
- Receptor de α 1-Antitrombina
- Receptor de Heparina

Receptores para proteínas desnaturalizadas

- Receptor de fibronectina
- Receptor de manosa-fructosa

Otros receptores:

- Receptor de transferrina y lactoferrina
- Receptor del complejo proteinasa - α ₂-Macroglobulina
- Receptor de agonistas colinérgicos
- Receptor de agonistas α 1-adrenérgicos
- Receptor de agonistas β 2-adrenérgicos

CSF: factor estimulador de colonias, GM: granulocito-macrófago, PG: prostaglandina, LT: leucotrieno, C: complemento, MIF: factor inhibidor de macrófagos, MAF: factor activador de macrófagos, LIF: factor inhibidor de la migración de leucocitos, MFF: factor de fusión de macrófagos, H: histamina, 5HT: 5-hidroxitriptamina, TNF: factor de necrosis tumoral, TGF: factor de crecimiento con actividad transformante.

Los receptores Fc γ R y CR3 pueden también mediar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En la ADCC una célula blanco cubierta con anticuerpos es eliminada después de unirse al macrófago a través de los receptores Fc γ R/CR3 [22-23].

1.3.1. ENDOCITOSIS:

En los macrófagos a través de los Fc γ R se medían procesos de endocitosis, que consiste en la internalización del receptor unido a complejos inmunes de IgG. La endocitosis se puede efectuar por dos procesos distintos: la pinocitosis y la fagocitosis [24]. Ambos procesos pueden distinguirse por el tamaño de la partícula que va a ser endocitada, la temperatura a la cual el proceso es interrumpido, y la participación del citoesqueleto en la formación de filamentos de actina. La pinocitosis involucra la unión de pequeños complejos inmunes ($< 1\mu\text{m}$), el progreso casi normal del proceso es interrumpido a temperaturas cercanas a los 17°C donde se detiene la fusión endosoma-lisosoma. Por otra parte la fagocitosis es la internalización de partículas grandes cubiertas por anticuerpos ($> 1\mu\text{m}$) por un proceso que involucra al citoesqueleto, es interrumpido por la citocalasina D y es detenido a bajas temperaturas (4°C).

PINOCITOSIS:

Es generalmente aceptado que la familia de receptores Fc γ R tiene entre sus funciones principales la eliminación de pequeños complejos inmunes por el proceso de pinocitosis. La pinocitosis comprende la unión de complejos antígeno-anticuerpo a los Fc γ R seguida de englobamiento de las pequeñas partículas por vesículas y la formación de endosomas. Estas etapas han sido formalmente demostradas por microscopía electrónica [25]. Aunque todavía no se sabe con certeza si todas las clases de Fc γ R son capaces de mediar pinocitosis, se ha demostrado que el receptor de baja afinidad Fc γ R en macrófagos murinos puede mediar la internalización de pequeños complejos. El receptor unido al complejo antígeno-anticuerpo se dirige hacia el lisosoma, donde ambos son degradados [26]. Nuevos receptores son sintetizados y dirigidos hacia la membrana plasmática, reemplazando a aquellos que se perdieron [27].

FAGOCITOSIS:

La fagocitosis llevada a cabo por los fagocitos mononucleares y neutrófilos, juega un papel muy importante en la defensa contra la invasión por microorganismos. Los neutrófilos son en general más eficientes que los macrófagos en fagocitosis, excepto cuando la partícula es más grande

que la célula [28]. Los macrófagos son la principal defensa en contra de la invasión por una amplia variedad de microorganismos, incluyendo bacterias, virus, hongos y protozoarios.

Los macrófagos son atraídos hacia el microbio invasor por moléculas quimiotácticas que emanan de ellos mismos. El macrófago establece contacto con el microorganismo opsonizado a través del receptor 3 para complemento (CR3) o a través del receptor para la porción Fc de inmunoglobulinas. Después de la unión con el ligando apropiado, empieza el proceso de englobamiento e internalización y entonces ocurre la destrucción de la partícula [29]. La interacción fagocito-microorganismo también puede ocurrir en ausencia de opsonización si el microorganismo posee estructuras en su superficie que puedan ser reconocidas directamente por el macrófago; un ejemplo es la interacción del receptor de manosa-fructosa del macrófago con residuos de carbohidratos [30].

El movimiento pseudopoidal durante la fagocitosis, se lleva a cabo solo en una región localizada de la membrana y del citoplasma periférico [31]. El movimiento de los gránulos es prominente en la base de formación de la vacuola fagocítica, lo que facilita la exocitosis del contenido de los gránulos en la vacuola fagosomal [32]. El citoesqueleto pseudopoidal de actina juega un papel muy importante en la fagocitosis [33].

En macrófagos, la fagocitosis mediada por receptores para inmunoglobulina G, es acompañado por la liberación de grandes cantidades de metabolitos del oxígeno y del ácido araquidónico [34,35]. En contraste, la agregación de receptor CR3 para complemento no induce la liberación de estos metabolitos por los fagocitos mononucleares [36,37]. Los macrófagos poseen también receptores para C5a. La ocupación de estos receptores induce la secreción de IL-1 e inicia el fenómeno quimiotáctico [38]. La ingestión de partículas por fagocitos mononucleares puede ocurrir en un amplio rango de pH y es acompañada por un aumento en la oxidación de glucosa, similar al que ocurre durante la fagocitosis por neutrófilos [39].

Aunque existen varios microorganismos que son fagocitados y destruidos fácilmente por los macrófagos, también existen ciertos patógenos que parasitan al macrófago y se replican dentro de él. Entre los microorganismos capaces de multiplicarse dentro de macrófagos podemos

citar los siguientes: *Listeria*, *Salmonella*, *Brucella*, *Mycobacteria*, *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Leishmania*, *Toxoplasma*, *Trypanosoma* y *Legionella pneumophila*. Sin embargo, si los macrófagos son activados por la acción de determinadas citocinas pueden adquirir la capacidad de destruir a éstos microorganismos [29].

1.3.2. Secreción:

Los macrófagos son células de un gran potencial secretor (Tabla III). Cada vez es más aparente que los fagocitos mononucleares, además de sus propiedades fagocíticas e inmunomodulatorias, tienen una extensa capacidad secretora que incluye no solo enzimas, sino muchas otras sustancias biológicas activas. Se han reportado más de 100 productos que son secretados por los fagocitos mononucleares, con masas moleculares que van desde 32 Da (anión super óxido) hasta 440 kDa (fibronectina), y su actividad biológica va desde inducción de crecimiento celular a muerte celular. Como se mencionó es grande la cantidad de moléculas secretadas, que van desde pequeños lípidos derivados del araquidonato (prostaglandina E₂, tromboxanos y leucotrienos) a moléculas promotoras del crecimiento, proteínas del complemento y enzimas [40-42].

La secreción incluye la liberación de constituyentes de la célula al medio externo, así como también descarga de este material a la vacuola fagocítica. Estos dos procesos están relacionados y cabe hacer notar los siguientes puntos: a) un solo producto de los macrófagos puede tener diversas actividades, b) una sola actividad puede reflejar la acción de muchos productos del macrófago, y c) muy pocos, sino es que ningún producto es secretado por macrófagos no estimulados.

Las diferentes moléculas secretadas por el macrófago tienen un profundo efecto, particularmente en cuanto a anatomía y fisiología de un determinado tejido, haciendo al macrófago una célula importante en la homeostasis del tejido. La mayoría de moléculas secretadas por el macrófago son liberadas a consecuencia de su estímulo y activación. El estímulo activador incluye productos primarios de origen bacteriano y citocinas. Las cantidades de moléculas secretadas varían entre macrófagos de diferentes tejidos, dependiendo en gran medida de su estado de diferenciación.

A continuación se describen brevemente algunos de los productos que los macrófagos secretan:

Los macrófagos son la principal fuente de intermediarios del ácido araquidónico y su liberación constituye un importante aspecto de su función. Por ejemplo, prostaglandinas de la serie E puede tener un papel autoregulatorio por limitar ciertos aspectos de citólisis de tumores por macrófagos, éstos últimos secretan relativamente grandes cantidades de prostaglandinas, pero las cantidades pueden variar entre las poblaciones de macrófagos [43-45]. Macrófagos peritoneales estimulados por varios agonistas (tales como zimosan, endotoxinas y microorganismos) producen grandes cantidades de prostaglandina E_2 e I_2 , tromboxano A_2 , prostaciclina y leucotrieno C_4 . En contraste, los monocitos producen primariamente tromboxanos y relativamente pequeñas cantidades de prostaglandinas E_2 e I_2 y leucotrieno C_4 [45]. Las enzimas responsables del metabolismo del ácido araquidónico son blancos para la regulación de este metabolismo. En exudados peritoneales inducidos por infecciones, el perfil de secreción de prostaglandinas es dominado por la secreción de los monocitos, los cuales constituyen la célula principal del exudado. Las prostaglandinas tienen efecto no sólo en la permeabilidad vascular sino también sobre los mismos macrófagos. La prostaglandina E_2 , por ejemplo, inhibe la activación del macrófago inducida por el $IFN-\gamma$ [44].

Entre las moléculas con actividades biológicas claves liberadas por los macrófagos se encuentran las citocinas. Las citocinas secretadas por los macrófagos pueden ser clasificadas en tres diferentes categorías: En la primera se consideran aquellas citocinas que promueven o median respuestas de una reacción inflamatoria, respondiendo tal como lo hacen los linfocitos. Entre estas citocinas se encuentran la $IL-1$, $TNF-\alpha$, $IL-6$, y varias proteínas quimiotácticas tales como $IL-8$ e $IL-12$. Después de la internalización de un amplio rango de bacterias y virus, los macrófagos que se encuentran en tejido, responden rápidamente liberando estas citocinas. De esta manera los macrófagos participan en la respuesta temprana de forma local y sistémica.

En la segunda categoría se incluyen aquellas citocinas que inhiben la respuesta de linfocitos y la inflamación en general. Estas citocinas son, $IL-10$, y $TGF-\beta$. Estas citocinas tienden a ser liberadas en forma tardía después de la estimulación y sirven para regular la estimulación, apagando

la respuesta. Finalmente, los macrófagos liberan citocinas que promueven la reparación tisular y la homeostasis, después o durante la inflamación. Aquí se incluyen el factor de crecimiento de plaquetas y el factor de crecimiento de fibroblastos, ambos inducen crecimiento de fibroblastos y nueva formación vascular. Todas estas citocinas son secretadas después de la internalización de productos microbianos o partículas opsonizadas por C3 e IgG. El IFN- γ promueve su síntesis y liberación [45].

Los macrófagos secretan numerosos componentes del sistema del complemento, incluyendo miembros de las vías tanto clásica como alternativa. Estas incluyen C1, C4, C2, C3, C5, factor B, factor D, properdina, inactivador C3b y β -IH. También secretan fragmentos activos generados por proteasas de macrófagos, tales como C3a, C3b, C5a y Bb.

Los macrófagos liberan asimismo, una gran cantidad de enzimas, algunas de las cuales actúan sobre proteínas de tejido conectivo: estas enzimas incluyen colagenasas, elastasas y activadores de plasminógeno. Una de las principales proteínas secretadas por el macrófago es la apolipoproteína E, una proteína de 33,000 daltones que es un constituyente de las lipoproteínas del plasma. Esta proteína funciona en el transporte de lípidos y también tiene un papel inhibitor en algunas reacciones inmunológicas *in vitro*.

También involucradas en los procesos de defensa del hospedero se encuentran la lisozima, e Interferón α y β . Finalmente, los macrófagos liberan metabolitos intermediarios reactivos de oxígeno [46], así como también óxido nítrico [47]. Ambos compuestos son cruciales para la eliminación de microorganismos patógenos intracelulares. Ambos grupos de compuestos son liberados en dos pasos consecutivos, el primero con la interacción del IFN- γ ; y el segundo, con las interacciones con TNF- α o IL-1, o con microorganismos y sus productos (LPS).

TABLA III. Resumen de los principales productos liberados por los macrófagos.

Enzimas que afectan el tejido conectivo y proteínas del suero:

- Elastasa
- Activador de plasminógeno
- Colagenasa
- Enzimas lisosomales
- Enzima convertidora de Angiotensina
- Precoagulante de tejido
- Arginasa

Proteínas involucradas en la defensa e inflamación:

- Proteínas del Complemento
 - C2, C3, C4, C5
 - Factor B y D
 - Factor H e I
- Lisozima
- Hidrolasa ácida lisosomal
- Interferón α y β
- Fibronectina
- Deoxiribonucleasa
- Glicosidasa
- Sulfatasa

Factores reguladores de crecimiento:

- G-CSF
- GM-CSF
- M-CSF

Citocinas que promueven la inflamación aguda y regulan la respuesta de linfocitos:

- IL-1, IL-6, IL-8, IL-12
- TNF- α , TNF- β

Citocinas inhibitoras:

IL-10

TGF- β 1,-2,-3

Receptor antagonista de IL-1

Factores que promueven reparación tisular:

Factor de crecimiento de plaquetas

Factor de crecimiento de fibroblastos

Otros:

Apolipoproteína E

Derivados del ácido araquidónico

Factor activador de plaquetas

Metabolitos del oxígeno

Timidina

Oxido nítrico

1.3.3. Mecanismos microbicidas:

La producción y liberación intracelular de metabolitos oxigenados de alta reactividad es el principal mecanismo microbicida empleado por monocitos y macrófagos, siendo la capacidad microbicida del monocito inferior a la del macrófago. Además de los sistemas citotóxicos dependientes de oxígeno, los fagocitos poseen otros mecanismos microbicidas independientes de oxígeno. Se ha demostrado que una amplia variedad de proteínas asociadas a los gránulos en macrófagos poseen actividad antimicrobiana. Estas incluyen elastasas, colagenasas, lipasas, deoxiribonucleasas, polisacaridasas, sulfatasas, fosfatasas y las defensinas. Las últimas son un grupo de pequeñas proteínas catiónicas que tienen distintas propiedades antimicrobianas y han sido aisladas de macrófagos alveolares de conejo y de neutrófilos de sangre periférica en humanos. En cuanto al mecanismo de acción de estas enzimas se sabe que una vez que se ha detectado a la partícula o microorganismo extraño, estos son internalizados y es entonces cuando los lisosomas primarios se fusionan con la vacuola fagocítica (fagosomas) conteniendo el material fagocítico, para formar el lisosoma secundario o fagolisosoma. Cuando ocurre la

formación del lisosoma secundario por la acción de las enzimas producidas por el macrófago es efectuada la degradación del material ingerido [48].

Se ha estudiado extensivamente la adquisición de propiedades que facultan a los macrófagos para destruir selectivamente células tumorales o parásitos en ausencia de anticuerpos. A pesar de que los macrófagos residente en tejido son relativamente resistentes a la inducción de tales actividades citotóxicas, monocitos mononucleares inmaduros tomados de sitios de inflamación, responden fácilmente a señales inductoras y son, por tanto llamados "macrófagos responsivos". El tratamiento de estos macrófagos con IFN- γ , inducen un estado llamado "primed" (estimulado). Estos macrófagos "estímulados" aunque no son citolíticos por si mismos, rápidamente se convierten si son activados con trazas de productos provenientes de bacterias tales como LPS (lipopolisacáridos). Estos macrófagos citolíticos son conocidos como macrófagos "completamente activados". En la Fig. 3 se muestra el paso de los macrófagos por los diferentes estados de activación, así como una tabla con las principales características de cada estado.



	MACROFAGOS RESPONSIVOS	MACROFAGOS ESTIMULADOS	MACROFAGOS COMPLETAMENTE ACTIVADOS
Ia	-	++++	++
TFR	++++	-	-
LFA-1	-	++++	++++
Secreción de CP y TNF α	-	-	++++
Secreción de ROI	-	+++	++++
Unión a células tumorales	-	++++	++++
Quimiotaxis y Fagocitosis elevada	+	+	+
Proliferación	Si	No	No
		Microbicida	Microbicida
		Presenta antígeno	Mata células tumorales

Fig. 3. Modelo básico de la activación del macrófago para adquirir la capacidad citotóxica-microbicida. Aquí se muestran macrófagos responsivos, estimulados y activados con las principales señales que desencadena su diferenciación. También se muestran algunos marcadores selectivos de cada etapa, así como ciertas funciones que son activadas o desactivadas en cada una de las tres etapas.

1.3.4. Funciones en reacciones inmunológicas y en inflamación:

Los macrófagos juegan un papel primordial en tres facetas de la respuesta inmune: como células presentadoras de antígeno en la inducción de una respuesta; como células efectoras; y como productores de una amplia variedad de moléculas con actividad inmunomoduladora.

1.- Los macrófagos participan como células presentadoras de antígeno (APC) en la inducción de reacciones inmunológicas. Son particularmente importantes en la respuesta a microbios por su capacidad de internalizar rápidamente virus y bacterias. Cabe hacer notar que la expresión de moléculas del MHC clase II es positivamente regulada en macrófagos una vez que la reacción inmunológica está en proceso. Los macrófagos tienen influencia sobre la reactividad de células T, no sólo por el procesamiento y presentación de antígenos, sino también por la expresión de moléculas reguladoras. Tres grupos de moléculas han sido identificadas en macrófagos, que tienen importancia en promover la comunicación con linfocitos y otras células. Moléculas de adhesión incluyendo ICAM, la cual sirve como correceptor de la molécula LFA-1, quizá la molécula de adhesión más importante de los linfocitos. El segundo grupo de moléculas son aquellas que sirven como coestimuladores para la respuesta de células T, después de la unión del receptor de antígeno con el complejo de péptido-MHC. Por último, los macrófagos representan la principal fuente de citocinas, secretadas en respuesta a varios estímulos, particularmente microorganismos. Como se mencionó anteriormente, los macrófagos son la principal fuente de IL-1, IL-6 y TNF, cada una de las cuales tienen profundos y diversos efectos.

2.- Los macrófagos participan como la principal célula efectora en la resistencia contra agentes infecciosos y tumores, así como también en varios estados del proceso de inflamación. Los macrófagos son el principal componente de las reacciones de sensibilidad retardada y son una de las células principales en la eliminación de bacterias patogénicas intracelulares.

3.- Finalmente, los macrófagos participan en la modulación de la respuesta celular para así reparar el daño provocado por la inflamación. Por ejemplo, los macrófagos liberan dos citocinas inhibitorias, la IL-10 y el TGF- β . La IL-10 inhibe la expresión de TNF y también inhibe la función de presentación de antígeno por el macrófago [49]. Los macrófagos también liberan citocinas que promueven la reparación del tejido conectivo y la formación de nuevos vasos sanguíneos: estas citocinas incluyen al factor de

crecimiento de plaquetas, factor de crecimiento de fibroblastos e IL-1.

2. RECEPTORES PARA INMUNOGLOBULINAS:

La interacción de complejos antígeno-anticuerpo con distintas células del sistema inmune resulta en una amplia variedad de respuestas, que incluyen tanto funciones efectoras tales como citotoxicidad dependiente de anticuerpos, degranulación de células cebadas y fagocitosis, así como producción de señales que regulan la proliferación de linfocitos y la secreción de anticuerpos y citocinas [50]. Todas estas funciones son iniciadas a través de la unión del dominio Fc de los anticuerpos o de complejos inmunes a receptores específicos en la superficie de las células especializadas (receptores Fc, Fc γ R) [51]. Actualmente está bien establecido que la diversidad de respuestas celulares iniciadas por anticuerpos y complejos inmunes tiene paralelo en una amplia heterogeneidad estructural de los receptores Fc. En los últimos años se ha tenido un progreso considerable definiendo esta heterogeneidad gracias a la clonación molecular de los receptores para inmunoglobulinas G y E (Fc γ R, Fc ϵ R). Estos estudios han mostrado que los receptores Fc son altamente homólogos en sus dominios de unión con las inmunoglobulinas, pero difieren en los dominios transmembranales e intracelulares, los cuales presumiblemente intervienen en las señales de transducción intracelulares. El análisis estructural de los Fc γ R y de los Fc ϵ R también ha revelado que existe al menos una subunidad común entre algunos de estos receptores [52,53].

Tres clases de receptores para la región Fc de IgG han sido identificados tanto en ratón como en humano. El Fc γ R_I se une a IgG monomérica con alta afinidad ($K_a = 10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1}$), mientras que Fc γ R_{II} y Fc γ R_{III} solo se une a complejos inmunes que contienen IgG [54]. El análisis de cDNAs y genes que codifican para los distintos Fc γ R han revelado que todos ellos derivan de un gen ancestral común y todos son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Están compuestos por una porción extracelular (EC), compuesta de dos o tres dominios semejantes a dominios de inmunoglobulinas, un solo segmento transmembranal (TM) y una porción intracelular (IC) de longitud variable. Mientras que existe una alta homología entre los dominios extracelulares de los distintos receptores, las regiones transmembranales y citoplasmáticas son divergentes.

2.1. NOMENCLATURA:

La complejidad de los receptores para inmunoglobulinas requieren de una nomenclatura consistente para facilitar la discusión de estas moléculas. Por esto aquí se presenta la nomenclatura actualmente utilizada.

Los FcRs están definidos por su afinidad por isotipos de inmunoglobulinas. Los receptores para el Fc de IgG son referidos como Fc γ R, para IgE como Fc ϵ R, para IgA como Fc α R, etc. Receptores estructuralmente distintos son distinguidos por un número romano, basado en su precedente histórico. Actualmente se reconocen tres grupos de Fc γ R, designados como Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. Receptores relacionados estructuralmente pero codificados por diferentes genes en un mismo grupo son denotados por A, B, C, etc; cuando los alelos son conocidos son designados por un subíndice como A_{IR}. Transcritos distintos generados de un mismo gen por cortes y empalmes alternativos son designados como a1, a2, b1, b2, etc. La subunidad proteica es indicada por una letra griega, tal como: Fc γ RIIIA α , Fc γ RIIIA γ . Finalmente, la especie se indica por mu (murino), hu (humano), etc., antecediendo al nombre del receptor: muFc γ RII.

En la Tabla IV se muestran algunas características de los distintos Fc γ R, donde también se indican los nombres anteriores de los receptores. En la Figura 4 se muestra una representación esquemática de los receptores Fc γ :

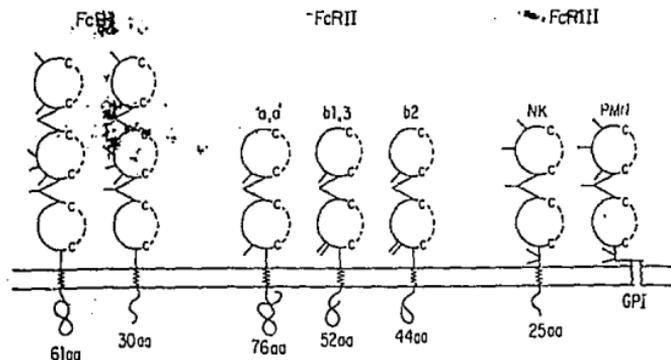


Fig. 4. Representación esquemática de proteínas codificadas por el locus Fc γ R. Las proteínas predecidas a partir de las secuencias de cDNA son presentados como glicoproteínas integrales de membrana. Todas estas proteínas son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas.

CARACTERÍSTICAS								
Grupo	Especificidad							
	Genes	Transcritos	hIgG	mIgG	Masa molecular (kDa)	Topología	Afinidad por IgG	Ka
1. FcγRI humano	1-2(1) ^d	2	h 1=3>4>>2	m	72	TM	Alta	10 ⁶ - 10 ⁹
ratón	?	?	2a=3>>1,3		67	?	Alta	10 ⁷ - 10 ⁸
			h 3>1>4>>2	m 2a,2b>>1,3				
2. FcγRII humano	1(1) ^d	2			40	TM		
IIa	1(1) ^d	≥1	h 1=3>>2,4		40	TM	Baja	< 10 ⁷
IIa'	1(1) ^d	b1,b2,b3	m 1,2b>>2a,3		40	TM		
IIb	1(1) ^d	81, 82			40-60	TM	Baja	9 x 10 ⁶
ratón			h 3>1>4>>2	m 2b>2a>1>3				
3. FcγRIII humano	1(1) ^d	1			50-80	PI	Baja	< 10 ⁷
III-1	1(1) ^d	1	h 1,3>>2,4			TM		
III-2	1(1) ^d	1	m 3>2a>2b>1		40-60	TM	Baja	10 ⁶
ratón α			h 3>1>4>>2	m				
			2b>2a>1>3					

TABLA IV. Resumen del locus de los FcγR: genes, transcritos, y proteínas predecidas.

2.2. RECEPTORES Fc PARA INMUNOGLOBULINAS G (Fc γ R):

Los receptores Fc γ reconocen el dominio Fc de las inmunoglobulinas G. Estos receptores están involucrados en un gran número de funciones celulares que incluyen fagocitosis, producción del anión superóxido, liberación de varias citocinas y citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC). Estudios basados en la clonación molecular de cDNAs, de los receptores Fc γ tanto en humano como en ratón muestran que todos estos receptores son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas; y pueden ser clasificados en tres grupos (Tabla V).

Los receptores Fc γ son glicoproteínas integrales de membrana (con excepción del Fc γ RIII expresado en neutrófilos), poseen dominios extracelulares relacionados al grupo C2 (dominios relacionados a inmunoglobulinas) [55], y un dominio intracitoplasmático de longitud variable. A continuación se da una descripción de cada grupo de Fc γ R, basada en estudios de clonación y en la Tabla V se muestra la distribución de los receptores Fc γ en las principales células hematopoyéticas.

2.2.1. Fc γ RI:

La propiedad más distintiva del Fc γ RI es su relativa alta afinidad por el ligando (Ka de 10^8 a 10^9 M⁻¹ en el humano [56] y de 10^7 a 10^8 en el ratón [57]); es el único de los Fc γ R cuya afinidad por el ligando monomérico puede ser medida directamente. El Fc γ RI se une a IgG2a murina, mientras que los receptores Fc γ RII y III son capaces de unir solamente agregados del anticuerpo IgG2a [58]. Fc γ RI también es capaz de unir IgG3 murina, pero no es capaz de unir IgG1, en contraste a los receptores Fc γ RII y III. El receptor Fc γ se encuentra expresado en monocitos, macrófagos y en neutrófilos tratados con IFN- γ [59]. En el humano, se han identificado tres genes para el Fc γ RI [60]. Monocitos humanos que no han sido estimulados, expresan aproximadamente de 10,000 a 40,000 moléculas de receptor en su superficie [59,61,62], esta expresión es aumentada por varios agentes incluyendo al IFN- γ [59], glucocorticoides [63] y componentes del complemento C5a [64]. Neutrófilos aislados de pacientes con infecciones bacterianas agudas, expresan grandes cantidades de Fc γ RI, pero no expresan en su superficie Fc γ RII o Fc γ RIII [65].

En geles de SDS, el Fc γ RI migra con un peso molecular de 72 kD [66].

Usando eritrocitos opsonizados con el anticuerpo monoclonal 32.2 que reconoce Fc γ RI, se ha demostrado que este receptor es capaz de mediar fagocitosis [67]. Otras funciones asignadas a este receptor Fc incluye la producción de anión superóxido [68] y de TNF- α [69] así como también ADCC por monocitos [70,71].

En contraste a los dos dominios extracelulares presentes en todos los Fc γ R de baja afinidad (Fig. 3 y Tabla V), el Fc γ R tiene tres dominios extracelulares. La presencia de este tercer dominio puede estar relacionada con la mayor afinidad del Fc γ R por IgG.

Tres diferentes transcritos han sido clonados para huFc γ RI, dos de ellos presentan polimorfismo y el tercero mostró diversidad en el dominio intracitoplasmático. Sin embargo, estudios de Southern blot y clonación genómica son consistentes con la existencia de un solo gen humano para Fc γ RI. Recientemente han sido identificadas clonas de cDNA para el muFc γ R. La secuencia de aminoácidos predecida revela similaridad del 65 al 75% al receptor humano en los tres dominios extracelulares y en el dominio transmembranal. Sin embargo, el dominio citoplasmático es 22 aminoácidos más largo y es solo 25% idéntico al huFc γ RI.

2.2.2. Fc γ RII:

El Fc γ RII está ampliamente expresado tanto en monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, plaquetas y células B [72] (Tabla V). En el humano, se han podido identificar, tres genes distintos (llamados IIA, IIB y IIC) que codifican al menos seis diferentes transcritos [73]. La expresión en la superficie de este receptor varía desde aproximadamente 30,000 receptores en neutrófilos humanos [61] hasta aproximadamente 260,000 receptores en macrófagos alveolares humanos [74].

A diferencia del Fc γ RI, la afinidad del Fc γ RII por el ligando es tan baja que la unión del ligando monomérico no puede ser medida directamente o se encuentra en el borde de la detectabilidad: la constante de afinidad (K_a) es menor a $10^7 M^{-1}$. Sin embargo, la presencia y función del Fc γ RII es fácilmente demostrable por la unión de complejos inmunes preformados.

En contraste con el Fc γ RI, el Fc γ RII tanto humano como murino une preferentemente (pero no exclusivamente) IgG1 e IgG2b murina [75]. En geles

de SDS los receptores Fc γ RII de humano y de ratón migran teniendo un peso molecular aproximado de 40 - 50 respectivamente [76,77].

Entre los anticuerpos monoclonales que se unen y reconocen el sitio de unión al ligando del Fc γ RII se incluyen los anticuerpos ampliamente usados como el IV.3, el cual reconoce todas las isoformas del Fc γ RII humano [76] y el 2.4G2, un anticuerpo monoclonal de rata que interacciona con el ligando uniéndose con los dominios tanto del Fc γ RII y Fc γ RIII de ratón [77].

Existen muchos datos sobre la estructura, expresión y distribución de los genes y transcritos del Fc γ RII. Se han descrito clonas moleculares tanto en el ratón [78-80] como en el humano [81-85], revelando un complicado patrón de relaciones evolutivas. La molécula prototipo de este grupo es el gen para el Fc γ RII murino y su transcrito. Se han aislado y caracterizado dos distintos cDNA, denominándose b1 y b2. Las proteínas correspondientes difieren por una inserción en el aminoácido 47 en el dominio citoplasmático (b1). La forma b1 es preferentemente expresada en linfocitos y la forma b2 en macrófagos.

En contraste con el sistema murino, el Fc γ RII en humano es un complejo locus genético [86], codificado por un mínimo de tres genes, los cuales dan origen a seis diferentes transcritos [84]. Estos genes y sus transcritos están evolutivamente relacionados con el gen murino, con algunas interesantes diferencias: tres distintos transcritos son derivados del gen IIB por corte y empalme alternativo de exones citoplasmáticos. Además de éstos transcritos, otros tres transcritos han sido identificados en el grupo de moléculas del Fc γ RII [84,85]. Estos transcritos, conocidos como IIA y IIC son derivados de dos genes distintos. Existe una extensa homología en la secuencia entre IIB y éstas moléculas del Fc γ RII en sus dominios extracelulares, transmembranales y en sus secuencias 3' no traducidas. Las moléculas del huFc γ RIIB son preferentemente expresadas en linfocitos, mientras que IIA y IIC se encuentran preferentemente expresadas en neutrófilos; los monocitos expresan ambas clases. Esta selectividad en la expresión de moléculas tan semejantes en los dominios extracelular y transmembranal, pero unidos a distintos dominios citoplasmáticos, es algo común entre los Fc γ Rs.

El Fc γ RII media fagocitosis de partículas opsonizadas con IgG por neutrófilos humanos y células mononucleares [67]. Estudios con células COS y fibroblastos transfectados con cDNA del Fc γ RIIA y con macrófagos sugieren que esta isoforma del receptor es la única capaz de mediar fagocitosis. El Fc γ RII también es capaz de mediar ADCC y secreción tanto del anión superóxido como también la secreción del TNF- α [69,87,88].

Tipo celular	Grupo I		Grupo II				Grupo III		
	Humano	Ratón	Humano			Ratón	Humano		Ratón
			IIa	IIa'	IIb		III-1	III-2	
Macrófago	+	+	+	+	+	+	-	+	+,i
Monocito	+,i ^b	?	+	+	+	+	-	-	-
Neutrófilo	+,i	?	+	+	-	+	+	-	+
NK	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Cel. B	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Cel. T	-	-	-	-	-	+	-	+	-

TABLA V: Expresión de los receptores Fc en células hematopoyéticas.

2.2.3. Fc γ RIII.

Los Fc γ RIII murino y humano son actualmente reconocidos como moléculas homólogas en virtud de su similitud en secuencia, organización genómica, distribución celular y función. El Fc γ RIII murino fue identificado en una línea celular de macrófagos murinos y fue clasificado como una molécula del Fc γ RII porque reacciona con el anticuerpo monoclonal 2.4G2 [89]. Solo se ha podido identificar un transcrito de 1.6 kb para el Fc γ RIII murino. Este receptor murino muestra una secuencia conservada del 95% en su dominio extracelular comparada con el Fc γ RII [89]. La eficiencia de la expresión del Fc γ RIII murino fue solo del 1 al 2 % comparada con la expresión obtenida con el Fc γ RII transfectado en células COS o células L. Esta baja expresión aumenta de 50 a 100 veces cuando se coexpresa una segunda molécula, la cadena γ del Fc ϵ RI [90,91]. Se ha demostrado que la expresión en superficie de la forma transmembranal del Fc γ RIII es dependiente de la coexpresión ya sea de la subunidad γ del receptor de alta afinidad para el receptor de IgE, o de la subunidad ζ del receptor para antígeno de células T (complejo CD3) [92-95], ambos tienen residuos cargados dentro de sus dominios transmembranales. Se ha demostrado que la contraparte murina de la subunidad γ coinmunoprecipitada con el Fc γ RIII juega un papel esencial en desencadenar las señales de transducción por el Fc γ RIII. Los transcritos de la cadena γ son encontrados en células NK y macrófagos que no expresan Fc ϵ RI, pero sí Fc γ RIII, sugiriendo un papel fisiológico para esta molécula en la expresión, función, o ambas del Fc γ RIII murino. El huFc γ RIII (designado como CD16) existe en dos distintas formas. La forma encontrada en neutrófilos, IIIB [96], se encuentra anclada a la parte externa de la membrana plasmática por un motivo de glicosil-fosfatidilinositol (GPI), mientras que la forma del receptor expresado en células NK, macrófagos y monocitos cultivados, IIIA es una proteína transmembranal convencional con un dominio citoplasmático característico. Como su contraparte murina, la expresión eficiente de IIIA requiere coexpresión de la cadena γ del Fc ϵ RI o de alguna proteína homóloga como la cadena ζ del complejo CD3/TCR [91,97]. No existe requerimiento similar para la molécula IIIB unida a GPI.

El receptor Fc γ RIII es expresado en macrófagos (pero no en monocitos) [98],

neutrófilos [99], eosinófilos [99], células NK [100] y un subgrupo de linfocitos T periféricos [99]. Una característica única del Fc γ RIII es su expresión como una proteína transmembranal en macrófagos y en células NK. Otra característica estructural poco usual de la forma transmembranal de este receptor es la presencia de un aminoácido cargado (el ácido aspártico) dentro de su dominio transmembranal.

Aproximadamente 120,000 copias del Fc γ RIII son expresadas en la superficie de neutrófilos humanos [99]. El Fc γ RIII de neutrófilos humanos se encuentra altamente glicosilado y además migra como una banda ancha en geles de SDS a aproximadamente 50 - 80 kDa [99], mientras que las isoformas expresadas en macrófagos humanos migran como una banda mucho más delgada correspondiente a un peso molecular de 53 kDa [98]. Tanto las isoformas transmembranales como como las formas unidas a GPI del Fc γ RIII son reconocidas por el anticuerpo monoclonal 3G8, mientras que su contraparte murina es reconocida por el anticuerpo monoclonal 2.4G2. El Fc γ RIII es capaz de reconocer IgG2a e IgG3 murina, así como IgG1. En contraste con el Fc γ RII, no reconoce a la IgG2b murina, ni a la IgG2 e IgG4 humanas [58]. La expresión del Fc γ RIII en macrófagos es modulada por IFN- γ , en este caso su expresión es paralela a la adquisición de una alta capacidad fagocítica.

A pesar de que el Fc γ RIII en macrófagos humanos media fagocitosis [67], su papel funcional en neutrófilos que expresan la isoforma unida a GPI todavía no es clara. El entrecruzamiento del Fc γ RIII aumenta la concentración de calcio intracelular [101] y también el contenido de F-actina en neutrófilos humanos [102], mostrando que el Fc γ RIII en estas células es de hecho capaz de mediar transducción de señales intracelulares.

Otras funciones del Fc γ RIII incluyen la ADCC de células tumorales por células NK y neutrófilos [100]. También es el encargado de la eliminación de complejos inmunes presentes en la sangre [103].

2.3. RELACION ESTRUCTURA-FUNCION DE LOS Fc γ R:

La asignación de funciones específicas a las diversas formas moleculares de los Fc γ R es de gran interés aunque actualmente solo se tienen correlaciones preliminares, basadas en la expresión celular restringida que presentan algunas de estas moléculas. Por otro lado, el análisis de la función de estas moléculas cuando son expresadas en células heterólogas (COS, CHO, células L) deja algunas dudas acerca de sus diferentes propiedades biológicas, puesto que se trata de un contexto artificial. Para

asignar funciones reales a estructuras específicas se requerirá de la reintroducción de las formas tanto nativas como mutadas de estas moléculas en las células capaces de mediar respuestas a través de los Fc γ R. Actualmente varios grupos están estudiando esta relación y las primeras observaciones sugieren que los Fc γ R tienen actividades biológicas que se sobrelapan, es decir, que receptores de distintos grupos puede mediar las mismas funciones efectoras. Algo que parece estar bien establecido para los distintos Fc γ R es que es necesario el entrecruzamiento de los receptores para desencadenar estas funciones.

2.3.1. Grupo I:

Se ha demostrado que el Fc γ RI es capaz de mediar funciones efectoras tales como la fagocitosis y la ADCC en macrófagos y otras células relacionadas. La alta afinidad de este receptor por IgG sugiere que pudiera estar ocupado por inmunoglobulinas en células periféricas. Sin embargo, grandes complejos inmunes podrían potencialmente desplazar a la IgG monomérica del Fc γ RI para generar el entrecruzamiento de receptores y la posterior transducción de señales. Además, la inducibilidad del Fc γ RI por IFN- γ permitiría la modulación hacia un blanco específico, tal vez desencadenando las funciones biológicas asociadas con este receptor.

2.3.2. Grupo II:

Tanto en ratón como en humano, el Fc γ RII es el más ampliamente distribuido, siendo encontrado en la mayoría de las células hematopoyéticas. La selectividad de corte y empalme alternativo del gen murino β , con β 2 exclusivamente expresado en células mieloides y β 1 expresado en linfocitos y células mieloides tempranas, sugiere papeles funcionales distintos para cada uno de los dominios citoplasmáticos de esta molécula. Estudios en fibroblastos transfectados [104] han demostrado que estas moléculas son procesadas de manera diferente, con β 2 mediando la internalización de ligando y enviándolo al lisosoma, mientras que β 1 no es capaz de realizar esta función. El significado de estas observaciones en la función de los macrófagos todavía no es muy clara.

Estudios con células CHO transfectadas con Fc γ RIIb murino (tanto β 1 como β 2) han sugerido que para ligandos particulares cubiertos con IgG, este Fc γ R puede aumentar la internalización. El parásito protozoario *Toxoplasma gondii* normalmente infecta células de mamíferos, mientras que los parásitos inactivados por calor son

incapaces de provocar una infección. El recubrimiento de estos parásitos inactivados con IgG resulta en un aumento de la internalización de los Fc γ R transfectados y fue dependiente de que se conservara intacta la cola citoplasmática. Otros complejos inmunes tales como eritrocitos opsonizados con IgG se unen eficientemente pero no son internalizados por estas transfectantes, en contraste con lo que se observa en macrófagos. Entonces, la unión del parásito a otra molécula de superficie parece tener el papel de facilitar la entrada mediada por los Fc γ R a estas células.

IIA y IIC son los únicos transcritos de Fc γ RII expresados en neutrófilos humanos, con una notable ausencia de la expresión de IIB [84]. IIA no es expresada en ninguna línea celular de linfocitos T o B examinada a la fecha. Estos datos sugieren que IIA y IIC, los cuales codifican para proteínas casi idénticas (>95% idénticas) están restringidas a células efectoras como monocitos, macrófagos y neutrófilos (aunque no a células NK) y son capaces de mediar respuestas efectoras iniciadas por el Fc γ RII como fagocitosis y ADCC. IIB está más ampliamente distribuido y es el único Fc γ RII expresado en linfocitos. Parece ser que IIA y IIC median las mismas funciones efectoras, mientras que IIB está más relacionado a propiedades de linfocitos.

2.3.3. Grupo III:

Las moléculas de los Fc γ RIII α y Fc γ RIII-2 ofrecen la única clara asociación de la relación estructura-función mediada por el Fc γ R. Las células NK son las únicas células efectoras que expresan un solo tipo de molécula de Fc γ R, III α en células murinas [105] y su homólogo III-2 en células humanas [96]. En las células NK la conservación de la secuencia de aminoácidos en los dominios transmembranal y citoplasmático de estos receptores indican que estos dominios son esenciales para funciones tales como ADCC. En el caso del macrófago, el cual expresa los tres grupos de moléculas de Fc γ R, regula la expresión de III α y de III-2 para que así la célula activada dirija preferentemente complejos inmunes al receptor de baja afinidad y entonces se lleve a cabo la función de ADCC.

Las moléculas del Fc γ RIII se asocian con cadenas γ y ζ . Combinaciones diferentes de homo y heterodímeros de las cadenas γ y ζ han sido observadas en células NK humanas [106], ofreciendo la posibilidad de diferentes procesos de transducción de señales a través de estos receptores, como ha sido sugerido para e TCR/CD3 [107].

2.4. MECANISMOS DE ACCION DE LOS Fc γ R:

Las interacciones secuenciales entre los ligandos sobre una partícula y los receptores en un fagocito son condiciones necesarias para la internalización de partículas, pero no son suficientes. Fagocitos cuyo metabolismo ha sido inhibido con deoxiglucosa o fluoruro, o aquellos cuya capacidad para ensamblar filamentos de actina ha sido disminuída por tratamiento con citocalasina, son incapaces de ingerir partículas, aún cuando éstas se encuentren cubiertas con ligandos promotores de fagocitosis tales como IgG. Esto sugiere que el entrecruzamiento de receptores activa señales de transducción que promueven cambios metabólicos y rearrreglos en el citoesqueleto. Aunque se ha avanzado en cuanto a la caracterización molecular de receptores de membrana que median fagocitosis, hay poca información en cuanto a las señales intracelulares generadas por estos receptores para regular las actividades del citoesqueleto. A continuación se describen algunas avances para dilucidar estas señales.

2.4.1 Cambios en el potencial de membrana y flujo de cationes divalentes:

Se ha podido detectar la activación de un canal de cationes en macrófagos tras la ingestión de perlas opsonizadas con IgG [108]. La elevación inmediata de calcio intracelular depende de la movilización de calcio de las reservas intracelulares, pero el mantenimiento de altos niveles de calcio requiere del influjo de calcio extracelular. Como el Fc γ RII y el Fc γ RIII tienen un pequeño dominio intracelular no parece ser posible que una sola molécula de receptor forme un canal iónico, por lo que se piensa que la agregación de receptores por oligómeros de IgG permite activar mecanismos para formar canales iónicos en la membrana del macrófago.

2.4.2. Elevación de calcio citosólico:

El entrecruzamiento de receptores Fc en leucocitos provoca la liberación de calcio de las reservas intracelulares e influjo de calcio a través de la membrana plasmática [109-111]. En neutrófilos humanos, el incremento de calcio libre es más grande en el citoplasma que alrededor del fagosoma [112]. Esto sugiere que los receptores Fc median el aumento de calcio intracelular y esto provoca el inicio de la fagocitosis. Varios estudios que se han realizado demuestran que el transporte de calcio inducido por el entrecruzamiento de receptores Fc es requerido para realizar actividades secretoras que acompañan a la fagocitosis, más sin embargo no son la fagocitosis por sí misma.

2.4.3. Fosforilación de proteínas:

El entrecruzamiento de receptores Fc lleva a un aumento en la fosforilación de numerosas proteínas celulares en macrófagos obtenidos de cavidad peritoneal de ratón [113]. Actualmente esta siendo estudiado ampliamente la identificación de varios tipos de cinasas activadas por la agregación de receptores.

Cinasas específicas para tirosina:

La fosforilación en tirosina de varias proteínas es iniciada por el entrecruzamiento de los receptores Fc en neutrófilos [114], plaquetas [115] y células NK [116,117]. Se ha observado que la fosforilación en tirosina es esencial para la fagocitosis mediada por el receptor Fc en macrófagos [118]. Se ha demostrado que proteínas fosforiladas en tirosina colocalizan con filamentos de actina recién formados, directamente formando parte de los fagosomas en el citoplasma de macrófagos que ingirieron eritrocitos opsonizados con IgG. Por otro lado, algunos inhibidores de tirosin cinasas tales como genisteina y herbimicin A bloquean la aparición de proteínas fosforiladas en tirosina y de actina-F en estos sitios e inhiben la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG [118]. Como ninguno de los receptores Fc tienen secuencias similares a ningún receptor con actividad de tirosin cinasa conocido, parece ser factible que la transducción de señales ocurre vía la activación indirecta de una cinasa que no forma parte del receptor, análogo a la transducción de señales vía p56^{lck} y p59^{lyn} por el receptor de antígeno de células T en linfocitos [119]. De hecho, en macrófagos, el Fc γ RIII se encuentra físicamente asociado con la subunidad γ del receptor de alta afinidad para IgE [120], otro receptor cuyos procesos de transducción de señales son dependientes de tirosin cinasas [121-123]. Además, macrófagos peritoneales reclutados por inflamación con tioglicolato, los cuales fagocitan eritrocitos opsonizados con IgG de forma dependiente de fosforilación en tirosina [118], expresan Fc γ RIII y la subunidad γ en abundancia [124]. El entrecruzamiento del Fc γ RI o Fc γ RII también induce la fosforilación en tirosina. Por tanto, parece que la tirosin cinasa juega un papel esencial en la transducción de señales de todos los receptores Fc γ R. El mecanismo exacto de cómo ocurre este proceso todavía es desconocido, pero la capacidad de anticuerpo monoclonal 32.2, el cual no se une al sitio de reconocimiento del ligando de Fc γ RI, para desencadenar la fosforilación en tirosina y la fagocitosis [57,125] sugiere que la agregación de este receptor es suficiente para activar las tirosin cinasas, tal vez por promover la asociación de tirosin cinasas miembros de la familia Src con su sustrato. Estos sustratos podrían incluir al mismo receptor Fc, a la subunidad γ

(como ocurre después del entrecruzamiento del receptor para IgE en células cebadas) o proteínas que contienen dominios SH2, tales como fosfolipasa C. De hecho, e Fc γ RII humano es un sustrato de Src, y el entrecruzamiento de Fc γ RI en células TPH-1 llevan a un incremento en la fosforilación en tirosina de PLC [125].

Proteína cinasa C:

El hecho de que ésteres de forbol inducen el ensamblaje de filamentos de actina en leucocitos polimorfonucleares y dramáticos cambios en la morfología de macrófagos peritoneales sugieren que la proteína cinasa C puede estar involucrada en la polimerización de actina durante la fagocitosis. De hecho, se ha encontrado que la fagocitosis mediada por receptores Fc en macrófagos murinos es acompañada por un aumento en la fosforilación de varias proteínas y en la actividad de la proteína cinasa C [126].

Proteína cinasa dependiente de AMP cíclico:

En neutrófilos humanos y en macrófagos murinos P388D1, la estimulación de receptores Fc causa un aumento en la concentración de AMP-cíclico, de manera análoga a la estimulación de la actividad de PKC durante la estimulación en monocitos humanos [127] y macrófagos murinos. Sorprendentemente, el papel de AMP cíclico en fagocitosis nunca ha sido probado directamente; aunque varios estudios usando inhibidores del AMP cíclico parecen indicar que el papel de éste no es esencial para la fagocitosis mediada por receptores Fc γ .

Caseína cinasa II:

Varios estudios indican que la caseína cinasa II se encuentra físicamente asociada con un receptor Fc en macrófagos murinos [128] sugiriendo que esta cinasa pueda estar involucrada en la transducción de señales por el Fc γ RI.

Actividad de Fosfolipasas:

La fagocitosis de levaduras opsonizadas con IgG o bien, con moléculas de complemento, es capaz de activar algunas fosfolipasas tales como las fosfolipasa C y fosfolipasa A₂, entre otras. Estas fosfolipasas activadas producen una gran variedad de moléculas biológicamente activas, entre las cuales encontramos: fosfolípidos de inositol, diacilglicéridos, ácido fosfatídico, ácido araquidónico y sus metabolitos, etc [129,130].

2.4.4. RECICLAJE DE RECEPTORES:

En la ausencia de ligando, los Fc γ R son capaces de reciclarse constitutivamente entre la membrana citoplasmática y un compartimento de endosoma citoplasmático como en el caso de la mayoría de otros receptores [131,132]. Estudios con el Fc γ RI humano, anteriores a la disponibilidad de anticuerpos monoclonales en contra de Fc γ RI indican que este receptor se mantiene en la membrana plasmática, incapaz de reciclar de la membrana a los compartimentos citoplasmáticos [133]. Por otra parte, el Fc γ R_{II} de macrófagos murinos, fue estudiado con fragmentos Fab del anticuerpo monoclonal 2.4G2. Estos receptores parecen reciclarse de la membrana citoplasmática a los endosomas citoplasmáticos y rápidamente regresan a la superficie celular. Aproximadamente 20% de la reserva total de receptores se encuentran citoplasmáticamente en cualquier momento. Estudios preliminares parecen indicar que el Fc γ R_{II} de humanos en células U937 también se recicla continuamente. Actualmente no existen datos disponibles en cuanto al reciclaje de los receptores Fc γ R_{III} en humanos ni para ninguno de los receptores murinos.

OBJETIVOS

El objetivo global de este trabajo es producir anticuerpos monoclonales de la clase IgG que nos permitan estudiar las interacciones con los receptores para inmunoglobulinas en macrófagos murinos. De este objetivo general se desprenden los siguientes objetivos particulares:

1.- Producir anticuerpos monoclonales de la clase IgG específicos contra el hapteno 2,4-dinitrofenol.

2.- Caracterizar los anticuerpos monoclonales en cuanto al isotipo al que pertenecen, la afinidad por el antígeno y su unión a diferentes antígenos.

3.- Demostrar que estos anticuerpos sirven como ligandos homogéneos para los receptores Fc para inmunoglobulinas G (Fc γ R), para mediar funciones como fagocitosis, formación rosetas, etc.

4.- Estandarizar en el laboratorio la técnica de producción de anticuerpos monoclonales.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1 PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES:

2.1.1. PREPARACION DEL INMUNOGENO 2,4-DINITROFENIL-OVOALBUMINA:

La ovoalbúmina dinitrofenilada (OVA-DNP₂₆) se preparó según la técnica descrita por Eisen [134]. La técnica consiste en hacer reaccionar el ácido 2,4-dinitrobencensulfónico (DNBS) con los grupos amino libres de la proteína, en un medio alcalino. La dinitrofenilación ocurre casi exclusivamente en los grupos ε-amino de los residuos de lisina de las proteínas. La reacción incluye la liberación de sulfonato y la sustitución por los grupos amino de la lisina (Fig. 5). El grado de sustitución (α = número de residuos DNP por molécula de proteína) depende de las concentraciones relativas de DNBS y proteína en el medio de reacción [135].

Para preparar ovoalbúmina dinitrofenilada se disolvieron 0.5 g de ovoalbúmina (Sigma Co.) y 0.75 g de DNBS (Eastman Kodak Co.) en 50 ml de solución de K₂CO₃ al 10%. Se dejó reaccionar durante 24 horas a temperatura ambiente, con agitación constante y cubierto de la luz. Se dializó exhaustivamente contra PBS para eliminar el ácido sulfónico y el DNBS que no reaccionó. Se comprobó que no quedara DNBS en la solución, midiendo la densidad óptica a 363 nm del amortiguador de diálisis.

Para estimar el grado de dinitrofenilación de la proteína, se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry [136] y la concentración de DNP espectrofotométricamente a 363 nm (coeficiente de extinción molar = 17,530) [137].

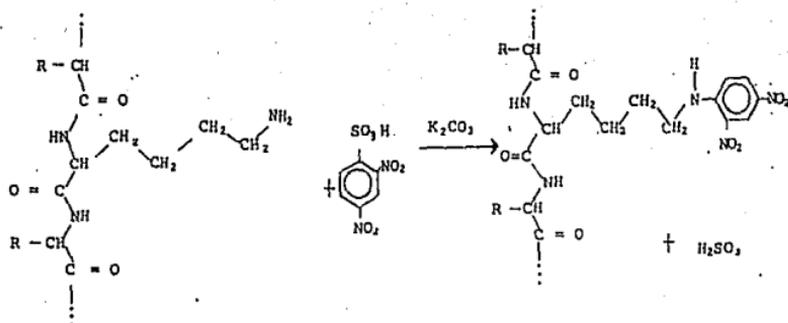


Fig. 5. Reacción de dinitrofenilación de proteínas. El ácido 2,4-dinitrobencensulfónico reacciona con el grupo ε-amino de los residuos de lisina de la proteína, liberándose ácido sulfónico.

2.1.2. SELECCION DEL ANIMAL DONADOR DE LINFOCITOS:

Se utilizaron ratones como donadores de linfocitos por ser animales pequeños, de fácil manejo, y sobre todo, porque las líneas de mielomas más comunmente utilizadas para obtener hibridomas productores de anticuerpos monoclonales, han sido obtenidas de ratones de la cepa Balb/c.

Se inmunizaron ratones hembras de la cepa Balb/c, cuyas edades al tiempo de la primera inmunización fluctuaban entre 6 y 8 semanas. Los animales se mantuvieron en el bioterio en condiciones controladas de temperatura, ciclos luz/obscuridad, y alimentación.

2.1.3. PROTOCOLO DE INMUNIZACION:

La inmunización del animal es un paso muy importante para aumentar la probabilidad de obtener hibridomas productores de anticuerpos con la especificidad deseada. Además, en casos en que se busque obtener anticuerpos monoclonales de un isotipo determinado, el esquema de inmunización debe también considerar este punto. En nuestro caso, para obtener anticuerpos de la clase IgG, buscamos inducir una respuesta secundaria.

Para las inmunizaciones se mezcló el antígeno (DNP-OVA₂₆) con Adyuvante de Freund (Gibco) en una proporción de 2 volúmenes de adyuvante por cada volumen de inmunógeno, mezclándose hasta obtener una emulsión de agua en aceite (como se obtiene el mejor efecto adyuvante) [138]. Para la primera inmunización se utilizó adyuvante completo, y para las subsiguientes se utilizó adyuvante incompleto. El antígeno se inoculó por vía subcutánea administrándose en dosis de 25 µg de DNP-OVA₂₆ en 100 µl de emulsión por ratón. Los animales recibieron de 8 a 12 inoculaciones a intervalos aproximados de 2 semanas entre cada una.

Los animales se dejaron descansar un mínimo de 4 semanas sin inmunizar. Los animales seleccionados como donadores de linfocitos para la fusión, fueron inmunizados 3 y 4 días antes de la fusión con inmunógeno soluble y sin emplear adyuvante, por vía intraperitoneal.

2.1.4. SELECCION DE LA LINEA CELULAR DE MIELOMA MURINO:

Se cuenta en el laboratorio con dos de las líneas celulares de mieloma más comúnmente usadas para obtener hibridomas productores de anticuerpos: NS-1 y SP2/0-Ag-14. Ambas han sido seleccionadas por su sensibilidad al medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina). Además ninguna de ellas secreta cadenas ligeras ni pesadas de inmunoglobulinas.

La línea celular SP2/0 mostró un crecimiento más vigoroso en nuestras condiciones de cultivo, por lo que fué la línea utilizada para las fusiones. Esta línea tumoral SP2/0-Ag-14 fue desarrollada

por M. Shulman, C. Wilde, y G. Köhler [139]. Es un hibridoma variante que ha sido utilizado con éxito en el proceso de fusión para obtener líneas celulares (hibridomas) productores de anticuerpos monoclonales de especificidad diversa [140]. No sintetizan cadenas de inmunoglobulina, es resistente a 20 $\mu\text{g/ml}$ de 8-Azoguanina, y muere en medio suplementado con HAT [141].

2.1.5. MEDIOS DE CULTIVO:

Se utilizó medio D-MEM (Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium with Earle's salts) (Gibco) [142] y fué preparado según las instrucciones del fabricante: Para 1 lt. de medio se disuelve el contenido de un sobre de medio en agua desionizada, agregando 3.7 g de NaHCO_3 . Se ajusta el pH a 7.1; se esteriliza por filtración y se guarda cubierto de la luz a temperatura ambiente como prueba de esterilidad. Este medio fué adicionado con distintos componentes según los distintos requerimientos:

A) Medio de cultivo D-MEM semicomplementado: el medio D-MEM estéril se complementa con L-glutamina (concentración final 2mM), Estreptomicina (0.01 mg/ml) y Penicilina-G (1,000 unidades/ml). El medio se adiciona también con aminoácidos no esenciales (concentración final 100 nM) y piruvato de sodio (0.1104 mg/ml).

B) Medio de Cultivo para células de mieloma: al medio de cultivo D-MEM semicomplementado se le agrega 10% de Suero de Caballo (Gibco), previamente deplementado (inactivado) por calentamiento a 56°C por 30 minutos.

C) Medio para Fusión: el medio D-MEM estéril se complementa con L-glutamina (concentración final 2mM), Estreptomicina (0.01 mg/ml) y Penicilina-G (1,000 unidades/ml). Este medio debe estar exento de suero.

D) PEG (Polietilenglicol): Se prepara una solución de PEG 1550 (Serva) al 41% (p/v) disolviendo a 56°C, 3.0 g de PEG en 4.2 ml de medio D-MEM sin suero (Medio para Fusión). Se esteriliza por filtración inmediatamente antes de realizar la fusión.

E) Solución concentrada 100X de Hipoxantina y Timidina (HT) (10 mM Hipoxantina, 1.6 mM Timidina). Se disuelven 136 mg de hipoxantina (Hidroxipurina) y 39 mg de timidina en 100 ml de agua destilada (70-80°C). Se esteriliza por filtración, y se guarda en alcuotas a -20°C.

F) Solución concentrada 100X de aminopterina (4×10^{-7} M). Se disuelven 1.8 mg de Aminopterina en 100 ml de agua destilada, agregando unas gotas de NaOH 1 M. Se esteriliza por filtración y se guarda en alcuotas a -20 °C y protegido de la luz, ya que la aminopterina es sensible a la luz.

G) Medio de selección completo HAT: al medio de cultivo D-MEM semicomplementado se le agrega 20% de Suero de Caballo (Gibco) inactivado, 1 ml de la Solución 100X de HT y 1 ml de la Solución 100X de Aminopterina, por cada 100 ml de medio.

H) Medio completo HT: al medio de cultivo D-MEM semicomplementado se le agrega 20% de Suero de Caballo, 1 ml de la solución 100X de HT por cada 100 ml de medio.

I) Medio de cultivo para hibridomas: al medio de cultivo D-MEM semicomplementado se le agrega 10% de suero de caballo.

2.1.6. PROTOCOLO DE FUSION CON PEG:

El protocolo de fusión usado ha sido adaptado, con mínimas modificaciones, del protocolo original descrito por Galfrè y Milstein [143,144]. Un diagrama condensado de la producción de anticuerpos monoclonales se muestra en la Fig. 6:

PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

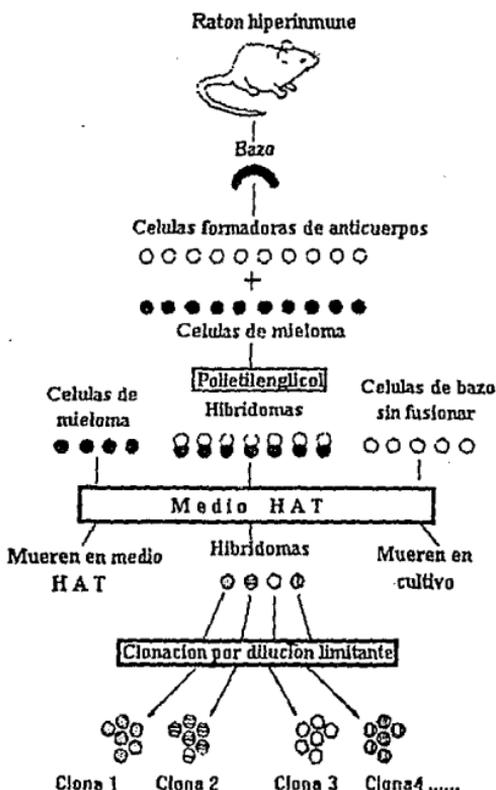


Fig. 6. Producción de anticuerpos monoclonales. Células de bazo fueron fusionadas con células de mieloma SP2/O usando polietilenglicol. Se obtiene una célula binucleada que después de la siguiente división, el núcleo se fusiona y se obtiene una célula híbrida o hibridoma, la cual crece en medio HAT. Las células no fusionadas de mieloma mueren en medio HAT, y las células de bazo que no se fusionaron solo sobreviven algunos días en cultivo. Se prueba la producción de anticuerpos de los hibridomas y se clonan aquellos que producen el anticuerpo deseado por dilución limitante.

A) Preparación de las células para la fusión:

1) Células de Mieloma. Se toman células de mieloma SP2/0 de cultivo en fase logarítmica de crecimiento, y se lavan dos veces por centrifugación con medio D-MEM sin suero (Medio para Fusión). Se ajusta la concentración de células a $2-2.5 \times 10^7$ células/ml.

2) Células de Bazo:

a) Reinmunizar un ratón hiperinmune 3 y 4 días antes de la fusión por vía intraperitoneal, sin adyuvante.

b) Calentar medios y PEG a 37°C en baño de agua.

c) Sacrificar al ratón por dislocación cervical. Sumergirlo en una solución de etanol al 70%.

d) Cortar la piel superficial sobre el abdomen para descubrir la pared abdominal. Bañar la pared abdominal con alcohol al 70%.

e) Hacer una incisión en la pared abdominal y extraer el bazo. Transferir el bazo a una caja petri con 7 ml de medio para fusión a 37°C . Retirar el tejido conectivo y adiposo, y transferir el bazo a una nueva caja petri con 7 ml de medio para fusión.

f) Romper cuidadosamente el bazo con pinzas estériles y disgregarlo hasta obtener una suspensión de células individuales.

g) Resuspender las células en un volumen de 12 ml y transferir la suspensión a un tubo de plástico estéril con fondo en "V", dejarlo en posición vertical en hielo por 10 minutos, para que los trozos grandes de tejido sedimenten.

h) Decantar la suspensión de células aisladas a un tubo nuevo, centrifugar 10 minutos a 1500 RPM, eliminar el sobrenadante y lavar las células nuevamente, resuspenderlas en 10 ml de medio para fusión.

B) Procedimiento de Fusión Celular:

a) Mezclar los linfocitos del bazo con las células de mieloma, en una proporción de 5 células de bazo por célula de mieloma. Lavar con medio para fusión, centrifugar y remover todo el sobrenadante decantándolo cuidadosamente. Resuspender las células suavemente.

b) Agregar 2.0 ml de la solución de PEG al 41% (37°C), gota a gota, con agitación suave y constante por espacio de un minuto. Resuspender por pipeteo suave sin destruir los pequeños agregados,

durante un minuto. Dejar incubar las células en reposo un minuto más a 37°C.

d) Agregar medio de fusión, para diluir el PEG, lentamente y con agitación constante y suave. Agregar 5 ml durante los primeros 5 minutos, después 10 ml durante los siguientes 5 minutos y finalmente agregar 15 ml durante los últimos 5 minutos.

e) Centrifugar 5 minutos a 1000 RPM; eliminar el sobrenadante y resuspender las células muy suavemente en 45 ml de medio de selección completo HAT (a 37°C).

f) Observar una gota de la suspensión de células mezclada con una gota de solución de azul tripano para determinar al microscopio la concentración de células viables.

g) Distribuir la suspensión de células en pozos interiores de microplacas de cultivo de 96 pozos (aproximadamente 0.1 ml de suspensión celular por pozo). En los pozos exteriores de la placa agregar 0.15 ml de medio estéril (sin células).

h) Incubar las placas con las células fusionadas a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

C) Mantenimiento de los hibridomas después de la fusión.

a) Tres a cuatro días después de la fusión, agregar a cada pozo 0.1 ml de medio de selección completo HAT, calentado a 37°C; incubar nuevamente.

b) De 6 a 8 días después, retirar la mitad del medio, reemplazándolo con medio de selección HAT.

c) Observar al microscopio periódicamente el crecimiento de los hibridomas. Aproximadamente de 10 a 14 días después de la fusión se pueden detectar clonas visibles y el medio toma una tonalidad amarilla, entonces el medio es colectado para determinar la presencia de anticuerpos de la especificidad deseada.

d) Transferir las clonas cuyos sobrenadantes resulten positivos en las pruebas para detectar el anticuerpo de interés, a superficies de cultivo mayores según su crecimiento, continuar la expansión de los cultivos de hibridomas positivos, repitiendo la determinación de su actividad. Probar su especificidad y su isotipo. Congelar las clonas positivas en nitrógeno líquido tan pronto como sea posible.

e) Clonar los hibridomas positivos.

2.1.7. PRUEBA(S) PARA DETECTAR ANTICUERPOS MONOCLONALES:

En el laboratorio se estandarizó un método para la detección de anticuerpos específicos para el hapteno 2,4-dinitrofenol (α -DNP), mediante una prueba de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay). En este método, grupos de DNP se pegan a pozos de una placa de plástico, se adiciona el sobrenadante que presumiblemente contiene los anticuerpos y la unión de los anticuerpos se detecta con un conjugado α -anticuerpos de ratón acoplado a Fosfatasa Alcalina.

El protocolo para detectar los anticuerpos α -DNP (ELISA α -DNP) se describe a continuación:

a) En placas de fondo plano para ELISA (Costar, high binding), agregar 200 μ l/pozo de BSA (albúmina sérica bovina) al 1% en buffer Tris-HCl 0.125 M, pH=9.5.

b) Incubar 2 hrs a 37°C.

c) Lavar 2 veces con PBS (100 μ l/pozo) y una vez con buffer de boratos 0.2 M, NaCl 0.15 M, pH=8.5 (100 μ l/pozo).

d) Agregar TNBS 1 mM en buffer de boratos (100 μ l/pozo).

e) Incubar 90 minutos a 37°C.

f) Lavar 3 veces con PBS (100 μ l/pozo).

g) Bloquear con BSA al 1% en PBS (200 μ l/pozo).

h) Incubar a 4°C toda la noche.

i) Retirar la solución de BSA y adicionar el anticuerpo primario: sobrenadante de hibridomas en cultivo, o diluciones de suero, ascitis, etc., así como controles positivos y negativos. Los controles utilizados fueron: 1) control positivo: IgE α -DNP (anticuerpo monoclonal murino), 2) control negativo: H10 (anticuerpo monoclonal murino de la clase IgG2b que no reconoce al DNP). Los anticuerpos se agregan diluidos en BSA al 0.5% en PBS.

j) Incubar de 2-3 hrs a 37°C.

k) Lavar 3 veces con PBS (100 μ l/pozo).

l) Agregar el conjugado α -Ig de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (Zymed) en dilución 1:750 en PBS con BSA al 1%.

m) Incubar 2 hrs a 37°C.

- n) Lavar 3 veces con PBS (100 μ l/pozo).
- o) Agregar 100 μ l de sustrato, p-nitrofenil fosfato disódico (Sigma) 1 mg/ml en buffer de dietanolamina al 10% pH=9.8.
- p) Incubar a temperatura ambiente hasta observar la aparición de un color amarillo.
- q) Parar la reacción agregando 50 μ l/pozo de NaOH 2 N.
- r) Leer absorbancias a 405 nm en un lector de ELISA.

Otra prueba que se utilizó para la selección de los hibridomas fué la determinación del isotipo de los anticuerpos producidos mediante una prueba de ELISA (ELISA α -ISOTIPO) de acuerdo al siguiente protocolo:

- a) En placas de 96 pozos para ELISA colocar 100 μ l de diluciones de anticuerpo α -isotipo de IgG de ratón producido en cabra: α -IgG1, α -IgG2a, α -IgG2b, α -IgG3, α -IgM, y α -IgA en dilución 1:1000 en PBS.
- b) Incubar de 1 a 1.5 hrs a 37°C.
- c) Lavar 3 veces con PBS.
- d) Bloquear con BSA al 1% en PBS (200 μ l/pozo).
- e) Incubar toda la noche a 4°C,
- f) Retirar la solución de BSA y agregar el sobrenadante del cultivo de los hibridomas (100 μ l/pozo); o anticuerpos control (IgE α -DNP y H10) en diluciones de 1:1000 en PBS con BSA al 1%.
- g) Incubar de 2-3 hrs a 37°C.
- h) Lavar 3 veces con PBS.
- i) Adicionar el conjugado α -Ig de ratón acoplado a β -galactosidasa, diluido 1:500 en PBS con BSA al 1%, 10mM de $MgCl_2$ y 1 mM de 2-mercaptoetanol (100 μ l/pozo).
- j) Incubar 90 minutos a 37°C.
- k) Lavar 3 veces con PBS.
- l) Agregar el sustrato: orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido, 3 mM en PBS con 10 mM de $MgCl_2$ y 0.1 M de 2-mercaptoetanol (100 μ l/pozo).
- m) Incubar a temperatura ambiente hasta observar un color amarillo.
- n) Parar la reacción con Na_2CO_3 1 M (50 μ l/pozo),

o) Leer las absorbancias a 405 nm en un lector de ELISA.

Para conseguir una mayor especificidad en cuanto a la determinación del isotipo para asegurar que los anticuerpos detectados fuesen específicos para DNP, se utilizó un ELISA más completo (ELISA α -DNP, α -isotipo):

a) Seguir el protocolo del ELISA α -DNP hasta el inciso k, con la única modificación de que cada sobrenadante a probar (inciso i), se coloca en 6 pozos.

b) Agregar a cada uno de los seis pozos de cada sobrenadante, uno de los seis diferentes anticuerpos anti-isotipo de IgG de ratón (producidos en cabra): α -IgG1, α -IgG2a, α -IgG2b, α -IgG3, α -IgM y α -IgA diluido 1:1000 en PBS con 1% de BSA (100 μ l/pozo).

c) Incubar 90 minutos a 37°C.

d) Lavar 3 veces con PBS.

e) Agregar 50 μ l/pozo de conjugado α -Ig de cabra acoplado a peroxidasa diluido 1:1000 en PBS con 1% de BSA.

f) Incubar 90 minutos a 37°C.

g) Lavar 3 veces con PBS.

h) Agregar 50 μ l/pozo de sustrato: 4 mg de o-fenilendiamina dicloruro en 5 ml de buffer de Citrato-Fosfato (ácido cítrico 0.1 M y Na_2HPO_4 anhidro 0.2 M), 5 ml de H_2O destilada, y 12 μ l de H_2O_2 .

i) Incubar a temperatura ambiente hasta desarrollo de color café.

j) Parar la reacción con 50 μ l/pozo de H_2SO_4 4 N.

k) Leer absorbancias 490 nm en un lector de ELISA.

2.1.8. CLONACION DE LAS CELULAS DE HIBRIDOMA:

Una vez detectados anticuerpos con las características y especificidad buscadas en los sobrenadantes de los hibridomas, es necesaria la clonación de los hibridomas obtenidos, tanto para asegurar la monoclonalidad de los anticuerpos como para eliminar las células no productoras de anticuerpos y evitar que éstas dominen el cultivo.

Para clonar los hibridomas obtenidos se utilizó el método de clonación por dilución limitante, el cual consiste en diluir las células de hibridoma para depositar 1 célula/pozo, las cuales al multiplicarse

darán origen a subclonas. Para asegurar que crezcan clonas individuales se prueban 4 concentraciones diferentes de células: 0.3, 1, 3 y 9 células/pozo. Las células se depositan en placas de 96 pozos en las cuales previamente se han colocado 100,000 células de bazo de ratones normales de la misma cepa que los ratones hiperinmunizados para la fusión y que sirven para "alimentar" a las subclonas durante las primeras etapas de su crecimiento. Estas células "alimentadoras" mejorarán notablemente la eficiencia de la clonación. Las placas se incuban en atmósfera con 5% de CO₂ y humedad controlada a 37°C.

Aproximadamente de 7 a 10 días después de la clonación cuando se puede observar al microscopio las subclonas en crecimiento se les hace una prueba para detectar anticuerpos α -DNP (ELISA α -DNP) con el sobrenadante de cada pozo en el que se observe crecimiento de las subclonas.

En base a los resultados de todas las pruebas de selección (ELISA α -DNP, ELISA α -ISOTIPO y ELISA α -DNP, α -ISOTIPO) y tomando en cuenta su crecimiento, se decide cual de las subclonas obtenidas se continuará creciendo y expandiendo en cultivo.

2.1.9. CULTIVO DE HIBRIDOMAS A GRAN ESCALA:

Una vez que las subclonas positivas han sido identificadas, deben expandirse para congelar células y para la producción de anticuerpo monoclonal. El cambio de cultivos pequeños a cultivos más grande debe ser gradual para conservar el crecimiento exponencial.

Es importante tomar en cuenta que el peligro del sobrecrecimiento de células no-productoras de anticuerpos siempre se encuentra latente por lo que es importante tener una reserva de células congeladas.

2.1.10. CRIOPRESERVACION DE HIBRIDOMAS EN NITROGENO LIQUIDO:

Los hibridomas pueden ser congelados en nitrógeno líquido y guardados por varios años con una buena recuperación. El

procedimiento para congelar células de hibridoma en nitrógeno líquido es el siguiente: Las células de un cultivo de hibridomas en fase exponencial se centrifugan a temperatura ambiente, se retira el sobrenadante que presumiblemente contiene los anticuerpos y se congela a -20°C . Las células se resuspenden suavemente y se agrega el medio para congelar (90% de SFB-ML, suero fetal bovino-Microlab y 10% de DMSO -Dimetil sulfóxido, Merck). Colocar en un criotubo, dejar de una a dos horas en el congelador a -20°C , y después en ultracongelador a -70°C por algunos días. Finalmente, los criotubos se colocan en un tanque de nitrógeno líquido.

Para recuperar las células congeladas: Descongelar los viales extraídos del tanque de nitrógeno líquido rápidamente en baño maría a 37°C , lavar con etanol al 70% los viales. Centrifugar las células inmediatamente con medio de cultivo para hibridomas a 37°C , retirar el sobrenadante y resuspender las células, transferir a botella de cultivo. Incubar a 37°C con 5% de CO_2 y humedad controlada.

2.1.11. CULTIVO DE CELULAS DE HIBRIDOMA EN ANIMALES:

El problema del cultivar los hibridomas *in vitro* es obtener una baja concentración de anticuerpos/ml. Para obtener una mayor cantidad de anticuerpos monoclonales, es necesario que los hibridomas sean crecidos en animales. El método más empleado consiste en crecer los hibridomas en la cavidad peritoneal de animales histocompatibles, y recuperar los anticuerpos a partir del líquido de ascitis.

La producción de los anticuerpos monoclonales en líquido de ascitis, se efectuó de la siguiente manera: Se inoculan ratones histocompatibles con 2,6,10,14-tetrametil pentadecano, compuesto parecido estructural y funcionalmente al Pristan (2,6,10,14-tetrametil ácido decanoico), siete días después de esta inoculación, se inyectan de $5-10 \times 10^6$ células/animal en PBS por vía intraperitoneal. Observar el crecimiento en cavidad peritoneal de los ratones hasta distinguir aumento, entonces se recoge el líquido de

ascitis, se deja a 4°C toda la noche, y posteriormente se centrifuga, y se recolecta el líquido de ascitis, guardarlo a -20°C.

NOTA: las células pueden congelarse si el líquido de ascitis es recolectado en condiciones de esterilidad, se centrifuga inmediatamente y se siguen los pasos para congelar células de hibridoma descritos anteriormente.

2.2 PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES:

Cabe hacer notar que para estandarizar el ELISA α -DNP, primero fue necesario producir anticuerpos policlonales; con este propósito se inmunizaron varios conejos con DNP-OVA₂₆, preparado como se mencionó anteriormente. Los conejos se inmunizaron con una dosis de 1 mg/animal, mezclado con adyuvante de Freund. Las inoculaciones fueran hechas a intervalos de 45 días para las primeras cuatro inmunizaciones. Diez días después de la cuarta inoculación, los conejos se sangraron por la vena central de la oreja. El suero se separa y se congela a -20°C. Los conejos se vuelven a inocular 15 días después del sangrado y el ciclo se repite.

Para comprobar que el suero producido contenía anticuerpos α -DNP, se realizó una hemaglutinación directa utilizando eritrocitos de carnero (GRc) sensibilizados con TNBS en buffer de boratos:

- a) Extraer sangre de borrego mezclándose inmediatamente con solución de Alsevers, dejar en el refrigerador durante 4 días.
- b) Lavar los eritrocitos 3 veces con DGVB²⁺.
- c) Agregar a 4 ml de eritrocitos de carnero lavados, 25 mg de TNBS en 7 ml de buffer de boratos 0.2 M, NaCl 0.15 M, pH=8.5.
- d) Dejar en agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente, cubierto de la luz.

- e) Lavar 3 veces con DGVB²⁺.
- f) Resuspender los eritrocitos al 2% en DGVB²⁺.
- g) En una placa de 96 pozos con fondo en "V", agregar 25 μ l de DGVB²⁺.
- h) Hacer diluciones seriadas del suero de los conejos inmunizados.
- i) Agregar 25 μ l de la suspensión de los GRc.
- j) Incubar 2 hrs a temperatura ambiente.
- k) Considerar positivos cuando se observe la malla de eritrocitos en todo el fondo del pozo, y negativos cuando se observe un botón en el centro del fondo del pozo.

2.3. PURIFICACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES:

La purificación de anticuerpos es necesaria para realizar un gran número de técnicas inmunológicas. Las concentraciones típicas de anticuerpos presentes en el líquido de ascitis de un ratón varían de 2-20 mg/ml, lo cual es una fracción significativa de todas las proteínas presentes. En contraste, los niveles de anticuerpo del sobrenadante de los cultivos de los hibridomas está en el orden de 5-50 $\mu\text{g/ml}$. Es por esto que la purificación de anticuerpos se realiza a partir del líquido de ascitis de ratones inoculados con células de hibridoma. Para purificar estos anticuerpos monoclonales se utilizó la cromatografía de afinidad que es el método de purificación de anticuerpos más frecuentemente utilizado.

2.3.1 PURIFICACION A TRAVES DE COLUMNAS DE AFINIDAD PARA EL DNP:

Los anticuerpos α -DNP se separaron del líquido de ascitis por cromatografía de afinidad, usando columnas de DNP-lisina o BSA-DNP inmovilizadas en perlas de sefarosa activada [145]:

A) Activación de columna de Sefarosa con bromuro de cianógeno:

1.- Tomar aproximadamente 100 ml de Sefarosa CL-4B y colocarla en un filtro buchner, hacer varios lavados con agua destilada fría,

2.- Pasar lentamente 200 ml de amortiguador de carbonatos 1 M, pH=11,

3.- Resuspender la Sefarosa en 100 ml de solución de NaHCO_3 1 M pH=11. Enfriar la suspensión en baño de hielo ($4-5^\circ\text{C}$) por algunos minutos.

4.- Pesar 1 g de Bromuro de Cianógeno (CNBr) y disolverlo en 1 ml de acetonitrilo.

5.- Agregar la solución de bromuro de cianógeno a la Sefarosa. Agitar de 10-15 minutos, monitoreando el pH y

mantiéndolo entre 10.5 y 11, si es necesario añadir NaOH 1 N.

6.- Lavar la Sefarosa con agua destilada fría, teniendo en el matraz colector, 100 ml de una solución de Sulfato Ferroso (FeSO_4) 100 mM. Esta solución es para inactivar al bromuro de cianógeno, esto debe hacerse eficientemente ya que éste es altamente tóxico,

7.- Dejar "secar" la Sefarosa activada, e inmediatamente lavar con 250 ml de HCl 1 mM para estabilizar la sefarosa activada.

NOTA: La sefarosa activada deberá ser utilizada inmediatamente después de ser estabilizada.

B) Preparación de la columna de DNP-Lisina acoplada a Sefarosa:

1.- Disolver 10 mg de DNP-Lisina en 10 ml de una solución de NaHCO_3 , 0.1 M, pH=8.3. Agregar esta solución al matraz donde se encuentra la sefarosa activada (inciso A), y dejar en agitación durante 2 hrs a temperatura ambiente.

2.- Una vez que terminó la reacción, inactivar los grupos activos de la sefarosa para evitar un posterior pegado inespecífico. Para inactivarla agregar 1 lt de buffer de dietanolamina 1 M a pH=8 (con HCl) por 2 horas a temperatura ambiente.

3.- Lavar con 500 ml de una solución de NaCl 0.5 M y acetato de sodio 0.1 M, pH=4, y después con 500 ml de una solución 0.5 M de NaCl y 0.1 M de bicarbonato de sodio, pH=8.3.

4.- Resuspender en PBS con 0.02% de azida de sodio. Guardar en refrigeración.

C) Preparación de la columna de DNP-BSA acoplada a Sefarosa:

1.- Disolver 10 mg de BSA en 10 ml de una solución de NaHCO_3 0.1 M, pH=8.3. Adicionar la BSA disuelta al buchner donde se encuentra la sefarosa activada (inciso A), agitar 2 hrs a temperatura ambiente, y toda la noche a 4°C

2.- Lavar con agua destilada fría varias veces,

3.- Disolver 3.4 mg de DNBS (1 mM) en 10 ml de buffer de boratos 0.2 M y NaCl 0.15 M, pH=8.5 y agregar esta solución a la sefarosa e incubar 5 minutos con agitación constante.

4.- Después de terminada la reacción, inactivar la columna de Sefarosa, para evitar un posterior pegado inespecífico, usando 1 lt

de buffer de dietanolamina 1 M a pH 8 (con HCl) por 2 horas a temperatura ambiente.

5.- Lavar con 500 ml de una solución de NaCl 0.5 M y acetato de sodio 0.1 M, pH=4 y después con 500 ml de una solución 0.5 M de NaCl y 0.1 M de NaHCO₃, pH=8.3.

D) Preparación de la columna de DNP-Lisina acoplada a Affigel:

1.- Lavar las perlas de Affigel 10 varias veces con agua destilada.

2.- Agregar al gel 20 ml de solución de 100 mg de DNP-Lisina disuelta en PBS a pH 8 - 8.5.

3.- Dejar en agitación de 2 a 3 hrs. a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Filtrar el affigel en un buchner y lavar varias veces con PBS hasta que el filtrado salga transparente.

4.- Dejar "secar" el affigel, agregar PBS y conservar en refrigeración.

E) Preparación de columna de DOWEX (de intercambio iónico):

1.- Pesar 200 g de DOWEX 1x8 e hidratarlos con agua destilada, lavar varias veces con agua destilada fría.

2.- Agregar 1 lt de una solución de NaOH 1 N durante 45 minutos, con agitación ocasional.

3.- Lavar varias veces con agua destilada fría hasta restablecer un pH neutro.

4.- Agregar 1 lt de una solución de HCl 1 N durante 45 minutos, con agitación ocasional.

5.- Lavar nuevamente con agua destilada fría hasta restablecer un pH neutro.

6.- Finalmente lavar varias veces con PBS, dejar "secar" el DOWEX y resuspender en PBS, conservar en refrigeración.

F) Adsorción y elución de los anticuerpos a las columnas:

Las muestras utilizadas para purificar anticuerpos fueron: a) ascitis, obtenido de cavidad peritoneal de ratones inoculados con el hibridoma, (de 3-5 ml de ascitis/3 ml de gel), b) sobrenadante de hibridomas en cultivo (de 150 - 200 ml/3 ml de gel). Antes de

pasar las muestras por las columnas, se centrifugaron durante 30 minutos a 2,000 RPM, después otros 30 minutos a 10,000 RPM para eliminar cualquier material insoluble y evitar que quede atrapado en la columna.

Se mezclaron las muestras con la resina y se dejaron en agitación constante de 3 a 4 horas a temperatura ambiente y después toda la noche a 4°C.

Se transfiere la resina a una columna y se lava exhaustivamente con PBS hasta obtener en el eluido absorbancias a 280 nm menores a 0.05 D.O.

Se acomoda la columna que contiene la resina con los anticuerpos adsorbidos de manera que el eluido caiga directamente sobre una columna de DOWEX ya lavada como se muestra en la Figura 7.

Los anticuerpos se eluyen con una solución de DNP 0.1 M en PBS. Se recogen fracciones de 1.5 ml y se determina su absorbancia a 280 nm. Se dejan de coleccionar fracciones cuando las lecturas estén por debajo de 0.5 D.O.

La resina puede ser reutilizada para purificar el mismo hibridoma, simplemente lavando exhaustivamente con PBS y conservando la resina en refrigeración agregando algún antibacteriano.



Fig. 7. Diagrama de purificación de anticuerpos monoclonales. Por medio de columnas con perlas acopladas a DNP, se separan los anticuerpos específicos. Después se eluye con DNP, que es atrapado por la columna de Dowex, de intercambio iónico.

2.4. CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES:

La caracterización de los anticuerpos monoclonales se realizó en base al reconocimiento específico de su antígeno, al isotipo de los anticuerpos y a su capacidad para interactuar con macrófagos murinos, específicamente a través de su receptor para inmunoglobulinas de la clase IgG (Fc γ R).

Para caracterizar los anticuerpos monoclonales se realizaron las siguientes pruebas:

- 1) Ensayo de ELISA anti-DNP.
- 2) Ensayo de ELISA anti-DNP anti-isotipo.
- 3) Afinidad por el antígeno.
- 4) Adherencia de los anticuerpos a distintas líneas de macrófagos murinos.
- 5) Hemaglutinación de glóbulos rojos de carnero sensibilizados con DNP.
- 6) Formación de rosetas Ea, con eritrocitos opsonizados.
- 7) Fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados con DNP por macrófagos murinos.

2.3.1. Ensayo de ELISA anti-DNP:

Esta técnica fue descrita previamente en "producción de anticuerpos monoclonales" sección 2.1.7.

2.3.2. Ensayo de ELISA anti-DNP anti-isotipo:

Esta técnica fue descrita previamente en "producción de anticuerpos monoclonales" sección 2.1.7.

2.3.3. Afinidad por el antígeno:

Para medir la afinidad de los anticuerpos por el antígeno se utilizó la técnica de apagamiento de la fluorescencia. Esta técnica se basa en la propiedad que presentan algunos anticuerpos de disminuir la fluorescencia que emiten al ser excitados cuando es ocupado su sitio activo, esta disminución en la fluorescencia

proviene del triptofano que se encuentra en el sitio activo del anticuerpo. Para realizar ésta técnica solo se necesita ajustar la concentración de anticuerpos a 0.4 de D.O., se adiciona a una velocidad constante el antígeno DNP-Lisina en una concentración de 10^{-4} M y se van colectando los valores de fluorescencia usando una λ de excitación de 280 nm y una λ emisión de 345 nm. Los valores de fluorescencia obtenidos son transferidos a la computadora donde se procesan los datos usando un programa de computación del Instituto Weizmann de Ciencia de Israel y así se calcula la afinidad de los anticuerpos.

2.3.4. Unión de los anticuerpos monoclonales a receptores Fc γ de macrófagos murinos:

Con el fin de estudiar la unión de los distintos anticuerpos monoclonales a los receptores Fc γ de macrófagos se realizaron dos ensayos distintos:

1) ELISA α -DNP CON MACROFAGOS P388:

En este ensayo se utilizaron macrófagos de la línea celular P388.

a) Colocar 75,000 células/pozo, en microplacas con 96 pozos, dejar que las células se adhieran a la placa 2 hrs a 37°C.

b) Fijar con 100 μ l de una solución de paraformaldehído al 3% durante 90 minutos.

c) Bloquear con BSA al 1% en PBS.

d) Formar previamente complejos antígeno-anticuerpo, incubando 100 μ g del anticuerpo monoclonal con 100 μ g de cada uno de los conjugados de DNP con el acarreador ya sea BSA o HSA.

e) Incubar durante una hora a 37°C, transferir esta mezcla a la placa con las células e incubar durante 2 hrs a 37°C.

f) Lavar con PBS y agregar el conjugado α -Ig de ratón acoplado a fosfatasa alcalina diluido 1:750 en PBS con BSA al 1%,

g) Incubar durante 2 hrs y lavar con PBS.

h) Revelar con el p-nitrofenilfosfato, y medir la absorbancia a

280 nm después de parar la reacción con 50 μ l de NaOH 2N.

2) INMUNOFUORESCENCIA:

Para realizar este ensayo se utilizaron nuevamente células en cultivo de la línea de macrófagos murinos P388:

a) Colocar 200,000 células/200 μ l de medio de cultivo sobre un portaobjetos y dejar que las células se adhieran al vidrio durante 90 min. a 37°C.

b) Lavar con PBS y agregar 200 μ l de la solución de anticuerpos o complejos antígeno-anticuerpo sobre las células en diferentes portaobjetos con el sig. orden: 1° anticuerpo solo, 2° anticuerpo + HSA-DNP₃₇, 3° anticuerpo + HSA-DNP₂₂.

c) Incubar 90 min. a 4°C, y lavar con PBS.

d) Agregar el conjugado α -ratón acoplado a FITC diluido 1:50 en PBS, incubar 90 min. a 4°C.

e) Lavar con PBS y eliminar el exceso de éste último.

f) Colocar una gota de glicerol y un cubreobjeto sobre cada muestra. Observar al microscopio.

2.3.5. Hemaglutinación de glóbulos rojos de carnero sensibilizados con DNP:

Esta técnica fue descrita previamente en "producción de anticuerpos monoclonales" sección 2.2.

2.3.6. Formación de rosetas Ea:

Para realizar el ensayo de formación de rosetas se utilizaron macrófagos murinos de la línea celular P388:

a) Preparar una placa de 96 pozos con 50,000 células/pozo en 200 μ l de medio RPMI 1640 complementado con 10% de suero fetal bovino.

b) Hacer hemaglutinación de los anticuerpos a probar.

c) Opsonizar los eritrocitos sensibilizados con una concentración de anticuerpos subaglutinante.

d) Incubar los eritrocitos durante 30 minutos a temperatura

ambiente con agitación.

e) Lavar 3 veces con DGVB²⁺.

f) Preparar una suspensión de eritrocitos opsonizados al 1% en medio RPMI 1640.

g) Agregar a cada pozo con células, 30 μ l de la suspensión de eritrocitos opsonizados y centrifugar las placas.

h) Incubar las células 90 minutos a 4°C.

j) Resuspender las células y transferir 50 μ l a un portaobjetos,

k) Observar al microscopio y sacar el porcentaje de macrófagos que formaron las rosetas.

2.3.7. Fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados por macrófagos murinos:

Existen diversos métodos para la cuantificación de la fagocitosis que incluyen: el examen microscópico de las monocapas o de células en suspensión, la evaluación radiométrica del aumento de células marcadas [146], la medición espectroscópica de la hemoglobina en lisados de células [147].

El método empleado para la cuantificación de la fagocitosis fue el desarrollado por T. J. Jungi [148]. En éste método se explota la actividad de pseudoperoxidasa de la hemoglobina que cataliza la conversión de la 3,3-diaminobencidina en un compuesto colorido en presencia de H₂O₂, el cual se mide espectrofotométricamente. Este ensayo tiene varias ventajas como son: se trata de un microensayo que se realiza en placas de 96 pozos con una mínima cantidad de reactivos y de muestra por lo que permite analizar paralelamente un gran número de muestras.

Este ensayo se realizó como a continuación se describe:

a) En placa de cultivo de 96 pozos, agregar 75,000 células/pozo con 150 μ l de medio RPMI 1640 complementado con 10% de suero fetal bovino.

b) Incubar las células toda la noche a 37°C con 5% de CO₂ para permitir la adherencia de las macrófagos.

c) Sensibilizar y opsonizar los eritrocitos de carnero, tal como se describe en la sección anterior, preparar una suspensión de

eritrocitos al 1%.

d) Agregar a la placa con células 30 μ l/pozo de la suspensión de eritrocitos.

e) Incubar durante 90 minutos a 37°C con 5% de CO₂.

f) Lavar la placa sumergiendola en agua destilada por aproximadamente 20 segundos con agitación suave, posteriormente hacer dos lavados similares con PBS,

g) Retirar el sobrenadante de la placa y lisar los macrófagos con SDS al 0.3% en PBS (100 μ l/pozo),

h) Agregar 200 μ l/pozo de el sustrato, disolviendo 2 mg de DAB (3,3-diaminobencidina), 20 μ l de H₂O₂ en 5 ml de PBS.

i) Incubar a temperatura ambiente hasta que la reacción desarrolle un color café, leer en lector de ELISA a 490 nm.

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1 PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES:

3.1.1. OBTENCION DE DIFERENTES COMPLEJOS DE DNP-PROTEINA:

Se prepararon antígenos acoplado el hapteno DNP a diferentes proteínas acarreadoras según la técnica descrita por Eisen [205], tal como se describe en Materiales y Métodos. Como proteínas acarreadoras se utilizaron HSA (albúmina sérica humana), BSA (albúmina sérica bovina) y OVA (ovoalbúmina). Con cada proteína se prepararon complejos con distintos grados de dinitrofenilación (moléculas de DNP/molécula de proteína), (Tabla VI).

Tabla VI. Grado de dinitrofenilación de distintos conjugados DNP-proteína

Proteína acarreadora	Grado de dinitrofenilación		
	B S A	BSA-DNP35	BSA-DNP24
H S A	HSA-DNP37	HSA-DNP26	HSA-DNP22
O V A	OVA-DNP26		

El complejo OVA-DNP26 fue utilizado como inmunógeno para los ratones con los que se realizaron las fusiones y para los conejos de los que se obtuvieron anticuerpos policlonales. Los demás complejos fueron utilizados en los ensayos de adherencia a las células, inmunofluorescencia y afinidad por el antígeno descritos en la sección de "Caracterización de anticuerpos monoclonales".

3.1.2. FUSIONES:

Se inmunizaron 3 grupos de 6 ratones Balb/c, cada animal se inmunizó de 8 a 12 veces con el antígeno OVA-DNP26. Después de la fusión las células fueron cultivadas a una concentración de aproximadamente 3×10^6 células/ml (300,000 células/pozo). Se realizaron un total de 13 fusiones individuales. En las nueve primeras no hubo crecimiento de clonas o los cultivos presentaron contaminación antes de llegar al proceso de selección. En las cuatro restantes se observó el crecimiento de clonas aproximadamente 10 días después de la fusión, y se realizó la selección en base a un ensayo de ELISA. En la Tabla VII se resumen los resultados y observaciones de cada fusión.

3.1.3 CLONACION:

El proceso de clonación es vital para asegurar que los anticuerpos obtenidos provengan de una sola clona, y evitar que clonas no productoras o productoras de anticuerpos diferentes, rebasen el crecimiento de la clona de nuestro interés.

Una vez que se detectaron los hibridomas secretores de anticuerpos IgG específicos para DNP, se seleccionaron para su clonación aquellos que mostraron producir una mayor cantidad de anticuerpos.

De la fusión número 12 se obtuvieron 47 clonas positivas anti-DNP, 35 de las cuales producían anticuerpos de la clase IgM. De las 12 clonas productoras de anticuerpos de la clase IgG se seleccionaron para clonar 7 diferentes hibridomas: 1B4 (IgG2a), 1B8 (IgG3), 1B10 (IgG2a), 2C3 (IgG2a), 2E2 (IgG2a), 3B9 (IgG2b), y 4D2 (IgG1).

TABLA VII. Resumen de fusiones realizadas:

Fusión	Clonas positivas	Observaciones
No. 1	0	Contaminación de células fusionadas
No. 2	0	Contaminación de células fusionadas
No. 3	0	Contaminación de células fusionadas
No. 4	0	Uso de PEG 3350 (SIGMA) al 50%, no se observó crecimiento celular
No. 5	0	Uso de PEG 3350 (SIGMA) al 45%, no se observó crecimiento celular
No. 6	0	Uso de PEG 3350 (SIGMA) AL 41%, no se observó crecimiento celular
No. 7	0	Uso de PEG 3350 (SIGMA) al 41%, no se observó crecimiento celular
No. 8	0	Uso de PEG 1550 (SERVA) al 50%, no se observó crecimiento celular
No. 9	0	Uso de PEG 1550 (SERVA) al 41%, no se observó crecimiento celular
No. 10	2	Uso de PEG 1550 (SERVA) al 41%, si hubo crecimiento celular. Las clonas positivas fueron productoras de anticuerpos IgM
No. 11	8	Uso de PEG 1550 (SERVA) 41%, durante la selección/expansión las clonas positivas se murieron por cambio de lote de suero
No. 12	47 α -DNP 12 IgG	Después del proceso de selección y clonación se obtuvieron tres clonas productoras de anticuerpos IgG2a
No. 13	68 α -DNP 40 IgG	Se lograron establecer 6 Clonas: 3 Clonas IgG1, 1 IgG2a, Y 2 IgG2b.

De la fusión número 13 se obtuvieron 68 clonas positivas anti-DNP, de las cuales 40 eran productoras de anticuerpos de clase IgG y 28 IgM. Dada la imposibilidad práctica de expandir y clonar 40 clonas diferentes, se hizo la clonación de solamente 10 hibridomas: 2C5 (IgG1), 2C8 (IgG1), 2D9 (IgG1), 3B5 (IgG2b), 3D7 (IgG1), 3G10 (IgG2a), 4C7 (IgG2a), 4E3 (IgG2a), 4F8 (IgG2b), y 4F10 (IgG2a).

Las subclonas obtenidas fueron sometidas nuevamente a varios ensayos de ELISA α -DNP y a ensayos de ELISA α -isotipo para seleccionar aquellas que mostraban una mayor producción de anticuerpos. En el caso de los hibridomas productores de anticuerpos IgG2a, fue necesaria una segunda clonación.

De los hibridomas arriba mencionados, se eligieron para su caracterización completa los siguientes: 1B10, 2C3 y 3G10 productores de anticuerpos de la subclase IgG2a; 3B5 y 4F8 que producen anticuerpos de la subclase IgG2b; y 2C5, 2C8 y 3E9 hibridomas productores de anticuerpos de la subclase IgG1. Estas clonas fueron expandidas en líquido de ascitis para purificar los anticuerpos monoclonales. Las clonas y subclonas restantes se congelaron en nitrógeno líquido.

3.2. PURIFICACION DE ANTICUERPOS.

Los hibridomas seleccionados fueron crecidos en la cavidad peritoneal de ratones de la cepa BALB/c. En todos los casos se observó una producción abundante de líquido de ascitis, llegándose a obtener un volumen de 7-10 ml por ratón. Sin embargo, no en todos los casos el líquido de ascitis contenía anticuerpos en concentración suficiente para su purificación. Las causas de esto se desconocen, y en estos casos se optó por repetir el proceso de clonación de esos hibridomas, para obtener una subclona que secretase mayor cantidad de anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales pertenecientes a la subclases IgG1 e IgG2b se purificaron a partir del líquido de ascitis utilizando

columnas de DNP unido a BSA previamente inmobilizado en perlas de Sepharosa 4B. Todos estos hibridomas mostraron producir cantidades de anticuerpos monoclonales en el orden de 0.5 a 1 mg de anticuerpo por ml de ascitis. Los resultados de una purificación representativa se muestran en la Tabla VIII.

Sin embargo, la purificación de los anticuerpos monoclonales de la clase IgG2a presentó mayores problemas, ya que al utilizar la misma resina (DNP-BSA-Sepharosa) no se obtuvieron concentraciones de anticuerpos adecuadas para continuar con su posterior caracterización. Por tal motivo se investigó si el uso de columnas preparadas de manera diferente podrían brindar mejor resultado. Se emplearon cuatro distintas columnas para cromatografía de afinidad:

- a) DNP-lisina unido a Sepharosa 4B,
- b) DNP-lisina unido a AffiGel 10,
- c) DNP-BSA unido a Sepharosa 4B, y
- d) TNBS unido a BSA-Sepharosa 4B.

Se modificó además el protocolo de la purificación, alargando los tiempos de incubación, la utilización de sobrenadantes de cultivo en lugar de líquido de ascitis, elución con distintos agentes, etc. Con ninguna de estas modificaciones se logró purificar una mayor cantidad de estos anticuerpos. En vista de lo anterior la caracterización de estos anticuerpos se llevó a cabo utilizando sobrenadante de cultivos, los cuales mostraron tener actividad anti-DNP en ensayos de ELISA hemaglutinación de GRc sensibilizados y también mostraron ser capaces de mediar fagocitosis a través de los receptores Fc, como se demuestra más adelante.

A continuación se muestran resultados representativos de una purificación de anticuerpos utilizando la columna de TNBS unido a BSA-Sepharosa 4B. Se utilizó para la purificación líquido de ascitis de la clona 3B5, productora de anticuerpos de la subclase IgG2b. Se partió de un volumen de 12 ml de ascitis incubándose en agitación y eluyéndose con la solución de DNP 0.1 M, se colectaron fracciones de 1.6 ml; se leyó la absorbancia obtenida a

280 nm y después cada fracción se sometió a un ensayo de ELISA anti-DNP para comprobar su actividad. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

TABLA VIII. Resultados representativos de una purificación de anticuerpos monoclonales.

FRACCION	ABSORBANCIA A 280 nm	RESULTADO DE ELISA A 405 nm
1	0.057	0.283
2	0.055	0.298
3	0.338	0.744
4	2.465	1.650
5	3.011	2.525
6	3.011	2.672
7	2.423	1.519
8	1.666	1.235
9	1.203	1.195
10	0.852	1.061
11	0.618	0.916
12	0.538	0.837
13	0.441	0.812
14	0.369	0.749
15	0.311	0.702
16	0.258	0.589
17	0.218	0.534

3.3. CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS.

3.3.1. DETERMINACION DE LAS CONSTANTES DE AFINIDAD.

La afinidad de los distintos anticuerpos monoclonales por el hapteno 2,4-dinitrofenil-l-lisina se determinó por el método de apagamiento de fluorescencia. Dado que estas determinaciones requieren del uso de anticuerpos puros, solo se realizaron con aquellos anticuerpos que se tenían en forma pura: 2C5, 2C8, 3B5, 4F8 y 3G10.

Las constantes de afinidad calculadas se muestran en la Tabla IX; en las Figuras 8 y 9 se ilustran las gráficas de apagamiento en función de la concentración de hapteno, isotermas de saturación y gráficas de Scatchard de las titulaciones de los anticuerpos 2C5 y 4F8.

Tabla IX. Determinación de la afinidad de anticuerpos monoclonales por el método de apagamiento de fluorescencia.

ANTICUERPO	ISOTIPO	AFINIDAD
2C5	IgG1	7.95×10^6
2C8	IgG1	2.76×10^5
3G10	IgG2a	6.04×10^5
3B5	IgG2b	7.49×10^5
4F8	IgG2b	7.38×10^6

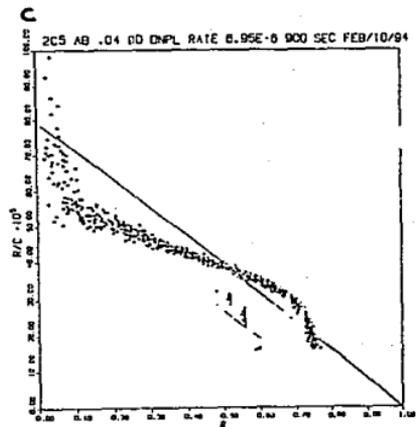
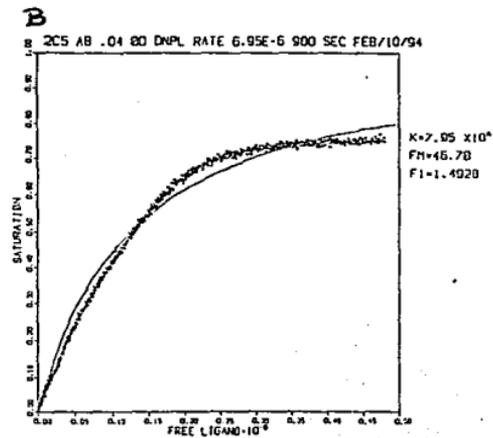
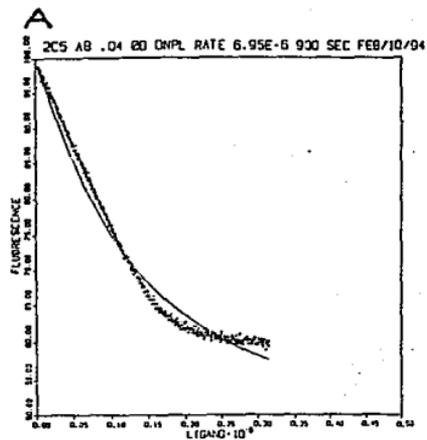


Fig.8. Determinación de la constante de afinidad del Acmo 2C5. A) Apagamiento de la fluorescencia en función de la concentración de DNP-lisina, B) Isoterma de saturación, C) Scatchard.

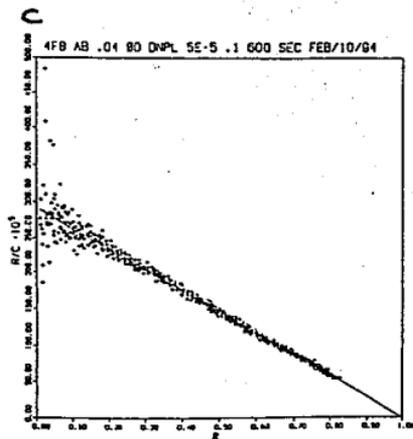
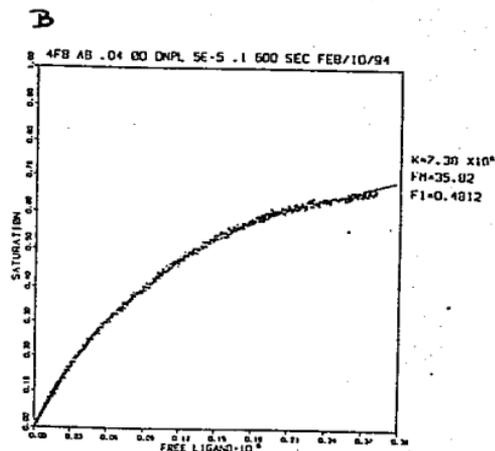
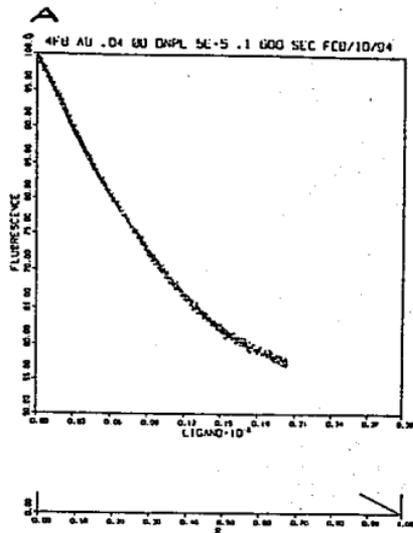


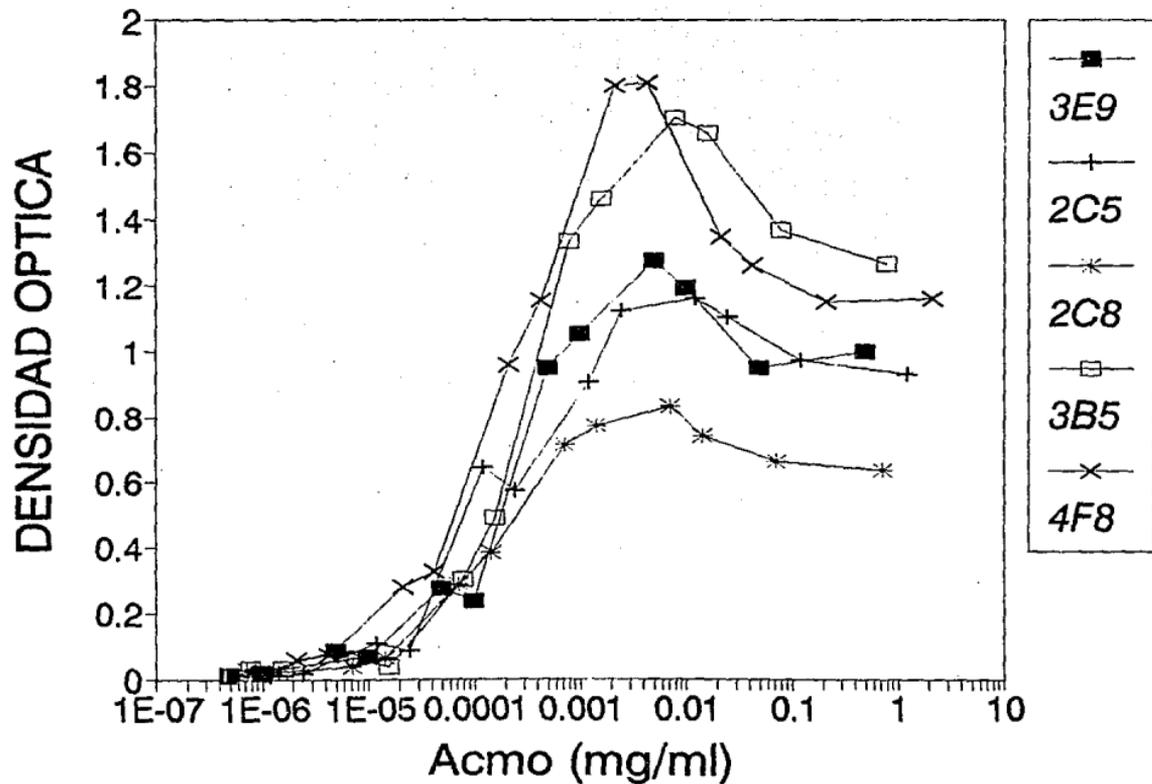
Fig. 9. Determinación de la constante de afinidad del Acmo 4F8. A) Apagamiento de la fluorescencia en función de la concentración de DNP-lisina. B) Isotherma de saturación. C) Scatchard.

3.3.2. ENSAYOS DE UNION A BSA-DNP₂₄ FIJADO A UNA FASE SOLIDA.

Para investigar la capacidad de los distintos anticuerpos para unirse a superficies cubiertas con el hapteno DNP, se utilizó un método de ELISA anti-DNP similar al usado en el proceso de selección de los hibridomas. Pozos de placas de ELISA se sensibilizaron con albúmina bovina dinitrofenilada. A los pozos así sensibilizados se agregaron distintas concentraciones de anticuerpo purificado, y la unión del anticuerpo se reveló utilizando un conjugado de anticuerpos anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 10. Las curvas de fijación de los anticuerpos 3B5 y 4F8 (IgG2b) alcanzan un valor máximo superior al alcanzado por los anticuerpos de la subclase IgG1: 2C5, 2C8 y 3E9, aunque las concentraciones de anticuerpos a las cuales se obtiene el 50% de unión son muy similares entre los 5 anticuerpos utilizados. Esto sugiere que la avidéz de los cinco anticuerpos por antígenos unidos a fase sólida es similar.

También se observa que las curvas de unión de cada uno de los anticuerpos muestran un máximo en el rango de concentraciones de 0.003 a 0.01 mg/ml, mientras que a concentraciones mayores la densidad óptica disminuye. Esto probablemente se deba a que a altas concentraciones de anticuerpo α -DNP podría haber impedimento estérico para la unión del segundo anticuerpo α -IgG.

Una vez determinadas las curvas de unión a antígenos adsorbidos a pozos de plástico, se estudió la capacidad del hapteno monovalente (DNP-lisina) o de antígenos polivalentes (BSA-DNP₂₄) para inhibir esta unión. Para esto se preincubó una concentración constante de anticuerpo purificado con distintas concentraciones de hapteno o antígeno, por 30 min a temperatura ambiente. Después de esta incubación, se agregó la mezcla de anticuerpo más inhibidor a los pozos sensibilizados y se continuó el ELISA. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figuras 11 y 12. Las concentraciones de hapteno y antígeno con las cuales se observa un 50% de inhibición para cada anticuerpo se muestran en la Tabla X.



70

Fig. 10. Curvas de union de los Acmo. a antigenos en fase solida. Placas de 96 pozos fueron sensibilizadas con BSA-DNP y se incubaron con diluciones seriales de los diferentes anticuerpos: 3E9 (IgG1), 2C5 (IgG1), 2C8 (IgG1), 3B5 (IgG2b), 4F8 (IgG2b). La union de los Acmo. fue revelada con un conjugado anti-IgG de raton acoplado a fosfatasa alcalina.

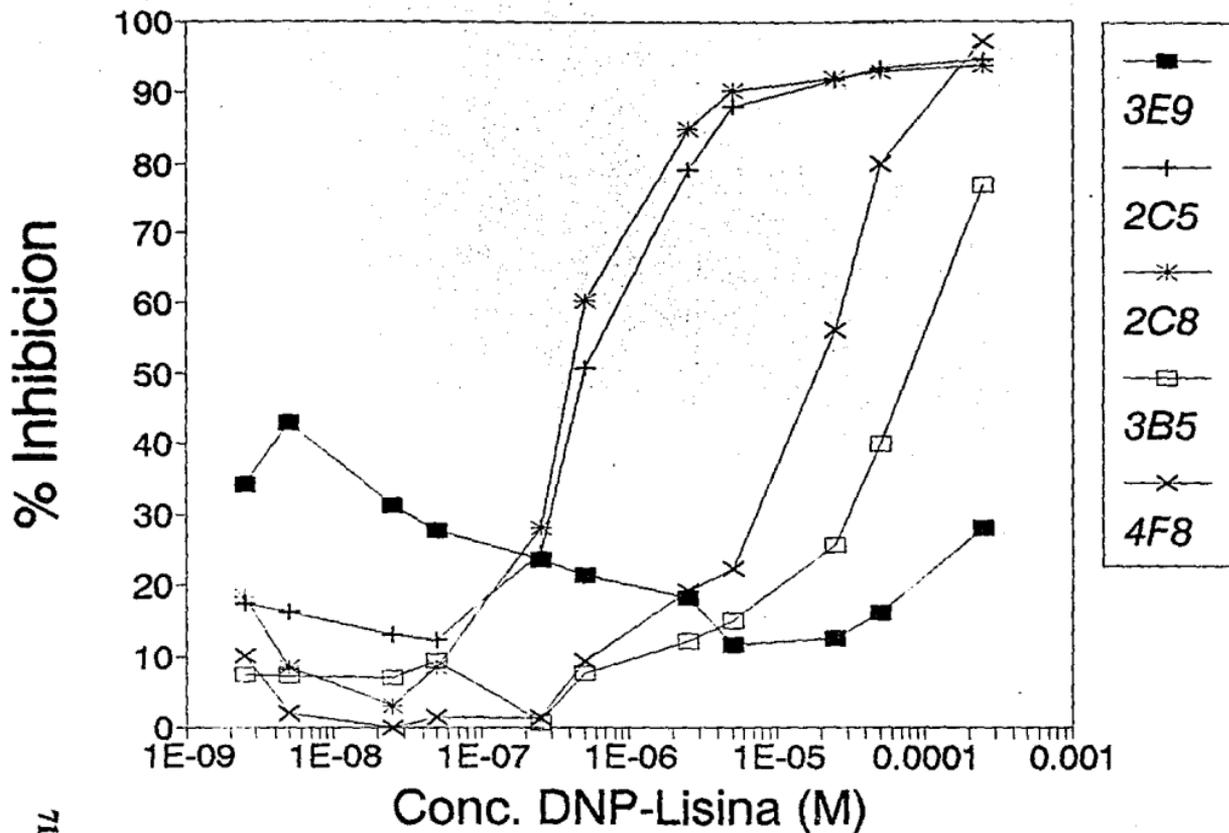


Fig. 11. Inhibición por el hapteno DNP-Lisina. Se incubaron los diferentes Acmo en concentraciones crecientes de DNP-Lisina, después se transfirieron a una placa sensibilizada y se determino la union de los Acmo. revelan- dose con un conjugado anti-Ig de raton acoplado a Fosfatasa Alcalina.

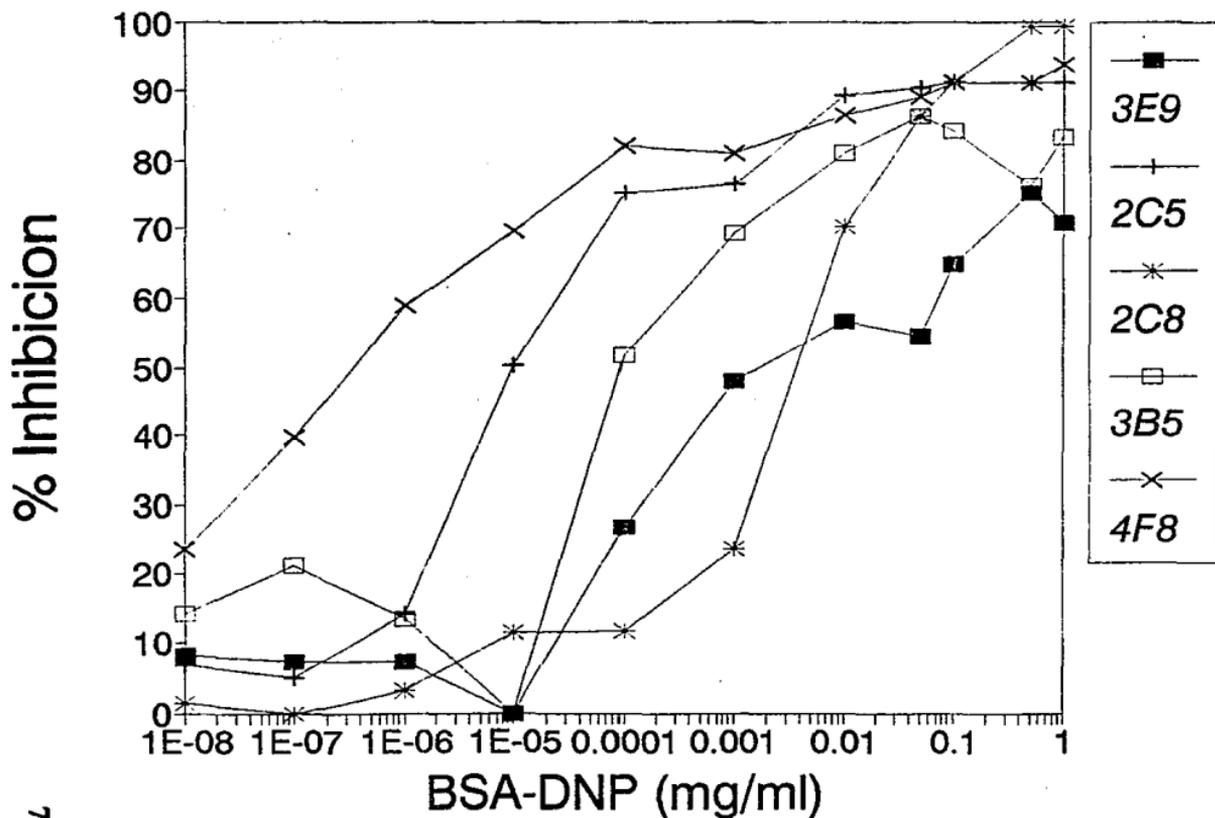


Fig. 12. Inhibición por antígeno polivalente BSA-DNP24. Se incubaron los diferentes anticuerpos a concentraciones crecientes de BSA-DNP24, después se transfirió la mezcla a una placa sensibilizada con DNP y se determinó la unión de los anticuerpos revelándose con un conjugado anti-Ig de ratón acoplado a Fosfatasa Alcalina.

Tabla X. Inhibición de la unión de los mAb por el hapteno DNP-lisina o por antígeno polivalente BSA-DNP₂₄.

Anticuerpo (mg/ml)	Concentración de DNP- lisina, 50% inhibición (mol/litro)	Concentración de BSA- DNP ₂₄ 50% de inhibición (mg/ml)
2C5 (4.9x10 ⁻⁴)	5.0x10 ⁻⁷	1.0x10 ⁻⁵
2C8 (1.2x10 ⁻⁴)	3.5x10 ⁻⁷	3.2x10 ⁻³
3E9 (7.2x10 ⁻⁴)	---	2.0x10 ⁻³
3B5 (7.8x10 ⁻⁴)	8.0x10 ⁻⁵	9.0x10 ⁻⁵
4F8 (2.1x10 ⁻⁴)	2.0x10 ⁻⁵	3.0x10 ⁻⁷

Es interesante notar que las concentraciones de hapteno o de antígeno polivalente necesarias para lograr un 50% de inhibición de la unión de cada anticuerpo, no siguen el mismo ordenamiento. Así por ejemplo, mientras que la inhibición de la unión del anticuerpo 4F8 se obtiene sólo a concentraciones relativamente altas de hapteno, la unión de este mismo anticuerpo es inhibida muy eficientemente por concentraciones bajas de antígeno multivalente. Esto sin duda refleja diferencias en el modo en que cada uno de los anticuerpos monoclonales interacciona con el hapteno, siendo posible que la afinidad de algunos anticuerpos por el hapteno esté influenciada en mayor o menor medida por el microambiente en el cual se encuentre el hapteno.

En base a estos resultados podemos conocer la avidéz relativa de los anticuerpos por los antígenos multivalentes empleados, que como lo demuestran los datos reportados en la Tabla X, no necesariamente reflejan la afinidad del anticuerpo por el hapteno monovalente.

Los resultados de la inhibición por antígeno multivalente (Figura 12) muestran una mejor correlación con los resultados del ELISA anti-DNP (Figura 10), ya que el anticuerpo 4F8 que muestra una mayor avidéz en los ensayos de inhibición, es el anticuerpo que presenta una reacción positiva a concentraciones más bajas, mientras que el anticuerpo 2C5 que muestra la avidéz más baja, es también el que presenta valores menores en el ELISA anti-DNP.

3.3.3. UNIÓN A RECEPTORES $Fc\gamma$ DE MACROFAGOS:

La unión de los distintos anticuerpos monoclonales a los receptores para IgG en células, se determinó por ELISA e Inmunofluorescencia. Para la técnica de ELISA, células de la línea P388 se adhirieron a las placas de ELISA, se agregó a las células complejos antígeno-anticuerpo formados con diferentes antígenos polivalentes. Los resultados obtenidos después de revelar el ELISA se muestran en la Tabla XI.

El ensayo de Inmunofluorescencia, se realizó en portaobjetos, usando el anticuerpo en forma monomérica, o bien en forma de complejos con los antígenos polivalente HSA-DNP₃₇ y HSA-DNP₂₂. La unión se reveló con un conjugado anti-inmunoglobulina de ratón-fluoresceína. Los resultados se muestran en la Tabla XII.

Tabla XI. Resultados de la unión de complejos inmunes a macrófagos murinos P388, determinados por el método de ELISA.

Ac mo	DNP ₃₅ ⁻ BSA	DNP ₂₄ ⁻ BSA	DNP ₁₉ ⁻ BSA	DNP ₃₇ ⁻ HSA	DNP ₂₆ ⁻ HSA	DNP ₂₂ ⁻ HSA
3E9	0.445	0.347	0.226	0.450	0.360	0.273
2C5	0.279	0.412	0.178	0.413	0.272	0.231
2C8	0.342	0.345	0.251	0.362	0.216	0.213
3B5	0.736	0.592	0.403	0.663	0.212	0.330
4F8	0.564	0.591	0.331	0.510	0.302	0.287
PBS	0.196	0.201	0.213	0.210	0.199	0.193

Tabla XII. Observaciones microscópicas de fluorescencia de unión de complejos inmunes a macrófagos P388.

Anticuerpo	Complejo Ab s/Ag	Complejo Ab- HSA-DNP ₃₇	Complejo Ab- HSA-DNP ₂₂
2C5	neg	++	++
2C8	neg	++	+
3G10	neg	+	neg
3B5	+	+++	++
4F8	neg	+++	++
IgG policlonal de conejo anti-DNP	neg	++	++
PBS	neg	neg	neg

3.3.4. FORMACION DE ROSETAS Ea POR MACROFAGOS MURINOS.

En estos ensayos se utilizaron macrófagos murinos de la línea P388 en suspensión, a los cuales se agregó la solución de eritrocitos de carnero opsonizada con cada uno de los anticuerpos monoclonales. Se observaron las muestras al microscopio para determinar el porcentaje de células que formaron rosetas. Se consideró para un resultado positivo, macrófagos con más de tres eritrocitos unidos por célula. En la Tabla XIII se muestran los porcentajes de rosetas obtenidos en un ensayo representativo, indicando entre paréntesis el promedio de eritrocitos por célula observados.

Tabla XIII. Formación de rosetas de macrófagos murinos con diferentes anticuerpos monoclonales.

Anticuerpo monoclonal	Subclase	Porcentaje de formación de rosetas
2C5	IgG1	50% (4 - 8)
2C8	IgG1	90% (> 10)
3E9	IgG1	56% (7 - 10)
3G10	IgG2a	58% (4 - 8)
3B5	IgG2b	90% (> 15)
4F8	IgG2b	70% (8 - 10)
IgG policlonal de conejo anti-DNP	---	50% (4 - 8)
PBS	---	15% (3 - 5)

3.3.5. MEDIACION DE FUNCIONES EFECTORAS.

Como se indicó en los objetivos, uno de los propósitos de obtener anticuerpos monoclonales específicos para el hapteno DNP, fué contar con reactivos que nos permitiesen examinar la influencia de algunas variables como afinidad, subclase del anticuerpo en la activación de funciones efectoras del macrófago a través de sus receptores para $Fc\gamma$. Por tanto, examinamos la capacidad de los distintos anticuerpos monoclonales producidos, para mediar la fagocitosis de GRc por macrófagos murinos.

Los ensayos para medir la fagocitosis se describieron en la sección 2.3.7. de Materiales y Métodos. A monocapas de macrófagos murinos (ya sean de líneas celulares o bien, obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones) se agregan los eritrocitos de carnero previamente opsonizados con anticuerpo. Después de incubar y lavar los eritrocitos se lisan los macrófagos y se mide en el sobrenadante la actividad de pseudo-peroxidasa de la hemoglobina contenida en los eritrocitos ingeridos.

Para examinar en el mismo experimento la fagocitosis de GRc opsonizados con distintas concentraciones de cada uno de los anticuerpos monoclonales, los ensayos se realizaron preincubando en placas de hemaglutinación, una cantidad fija de eritrocitos sensibilizados, con diluciones seriadas de cada anticuerpo (anticuerpo purificado o sobrenadante de cultivo). Las placas se agitaron y se dejó que los eritrocitos sedimentasen, para anotar la presencia o ausencia de hemaglutinación. Una vez anotado esto, los eritrocitos se resuspendieron por pipeteo suave y una alícuota de cada pozo se transfirió a placas con las monocapas de macrófagos de la línea celular P388 para realizar el ensayo de fagocitosis. Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 13, 14 y 15. En las Figuras 13 y 15 se muestran los resultados de fagocitosis de GRc opsonizados con los anticuerpos purificados de las subclases IgG1 e IgG2b respectivamente, mientras que la Figura 14 muestra los resultados obtenidos con GRc opsonizados con los

anticuerpos de la subclase IgG2a los cuales se utilizaron en forma de sobrenadante. En cada gráfica se muestra la fagocitosis obtenida cuando los GRc fueron opsonizados con anticuerpos policlonales de conejo (control positivo) y de GRc sin opsonizar (control negativo),

De estos resultados podemos obtener las siguientes conclusiones:

a) Hay una mayor fagocitosis de los GRc opsonizados con los anticuerpos monoclonales de la subclase IgG2b (3B5 y 4F8). Esta fagocitosis alcanza niveles similares a los observados cuando la opsonización se hace con anticuerpos policlonales.

b) Los anticuerpos monoclonales de las subclases IgG1 e IgG2a son también capaces de mediar la fagocitosis de GRc opsonizados, aunque los niveles alcanzados son más bajos que los observados con GRc opsonizados con anticuerpos policlonales. Esto es especialmente evidente en el caso de los anticuerpos IgG1, los cuales mostraron bajos niveles de fagocitosis no obstante que las concentraciones de los anticuerpos eran similares o superiores a las de los anticuerpos IgG2b.

c) Debido a que los anticuerpos de la subclase IgG2a no se emplearon en las mismas condiciones de pureza y concentración que aquellos de las subclases IgG2b e IgG1, no es posible aún hacer comparaciones válidas con respecto a su relativa eficacia en mediar fagocitosis. Sin embargo, los resultados obtenidos al opsonizar GRc con sobrenadantes de cultivo (Figura 14), muestran claramente que estos anticuerpos son capaces de mediar fagocitosis de una manera significativa.

También se probó la eficiencia de diferentes tipos de macrófagos murinos, para esto se realizó el mismo ensayo que se describió anteriormente pero utilizando macrófagos obtenidos de cavidad peritoneal de ratón a los que previamente se había provocado una inflamación (macrófagos inflamatorios) y macrófagos de 2 diferentes líneas celulares, P388 y J774. Se utilizó un anticuerpo de cada subclase: 2C8 (IgG1), 3G10-10 (IgG2a) y 3B5 (IgG2b); además como control positivo se utilizó suero policlonal de conejo anti-DNP y como control negativo, se incubaron los

eritrocitos con un anticuerpo no específico para DNP. En la Fig. 16, se muestra la fagocitosis realizada por macrófagos de la línea P388, en la Fig 17, la fagocitosis realizada por los macrófagos de la línea celular J774 y en la Fig. 18, la fagocitosis realizada por los macrófagos murinos inflamatorios. Cabe indicar que los macrófagos inflamatorios realizan la fagocitosis en un tiempo relativamente corto (30 min), los macrófagos de la línea celular J774, realizan la fagocitosis en tiempos ligeramente mayores, mientras que macrófagos de la línea celular P388 tardan aproximadamente 3 veces más en alcanzar los mismos niveles de fagocitosis que se alcanzaron con los otros tipos de macrófagos.

En cuanto a la eficiencia para mediar fagocitosis dependiendo del anticuerpo, se observa que, para los macrófagos de las líneas celulares, los anticuerpos más eficientes en mediar fagocitosis son los de subclase IgG2b (3B5), después los de IgG2a (3G10-10) y por último los anticuerpos de subclase IgG1 (2C8). Sorprendentemente, para los macrófagos inflamatorios el orden de eficiencia para la fagocitosis es el inverso.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

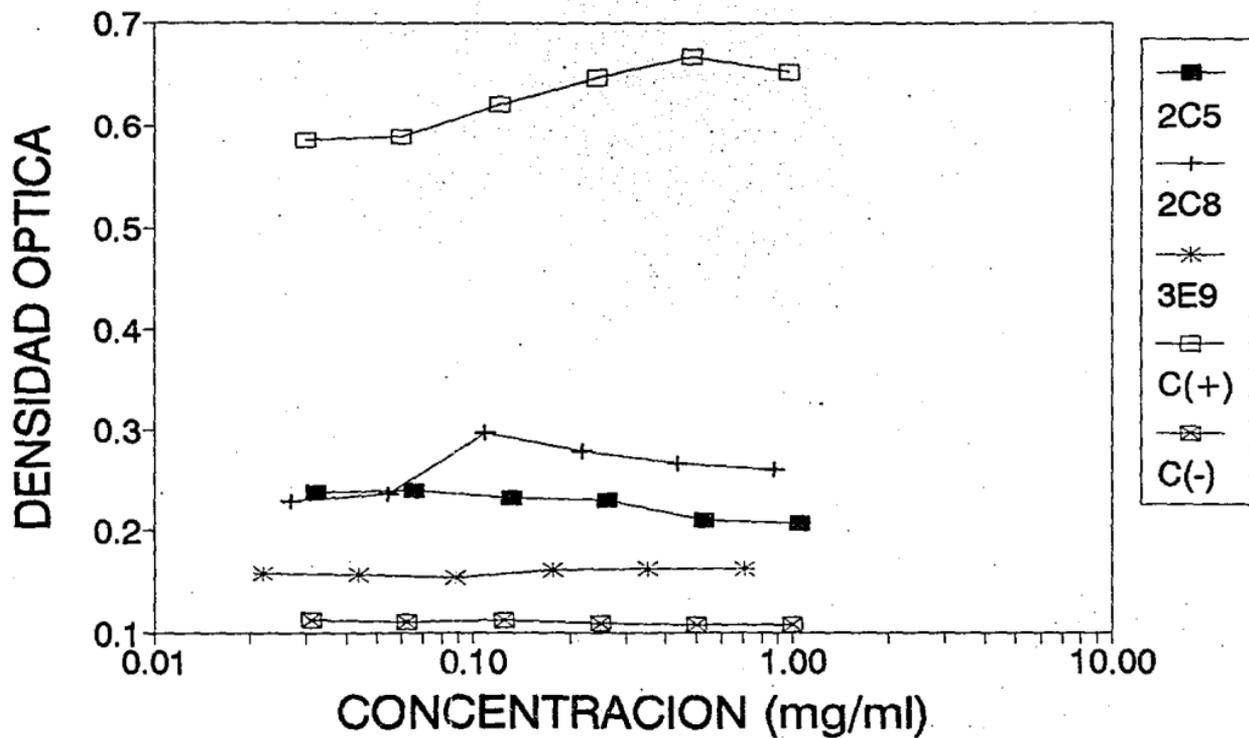


Fig. 13. Fagocitosis de eritrocitos de camero opsonizados con Acmo. (IgG1). Macrófagos de la línea celular P388 fueron incubados en placas de 96 pozos con eritrocitos de camero previamente opsonizados con: 2C5, 2C8, 3E9, Ig policonal de conejo anti-DNP (C+), H10 (Acmo de eg. diferente al DNP, C-). Se lavaron y lisaron los macrófagos y se determinó la actividad de pseudoperoxidasa de la hemoglobina con un método colorimétrico.

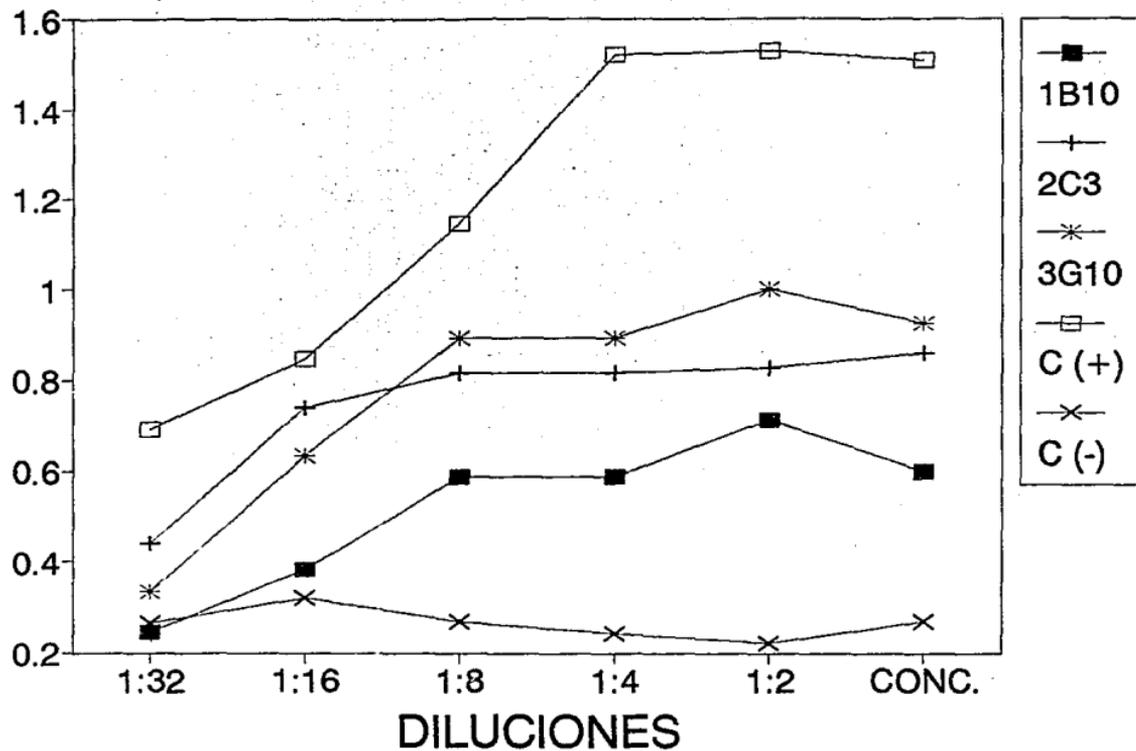


Fig. 14. Fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados con Acmo (IgG2a). Macrófagos P388 fueron incubados en placas de 96 pozos con eritrocitos de carnero opsonizados previamente con: 1B10, 2C3, 3G10, Ig policlonal de conejo anti-DNP (C+), H10 (Acmo de ag. diferente al DNP, C-). Se lavaron y lisaron los macrófagos, determinándose la actividad de pseudoperoxidasa de la hemoglobina por un método colorimétrico.

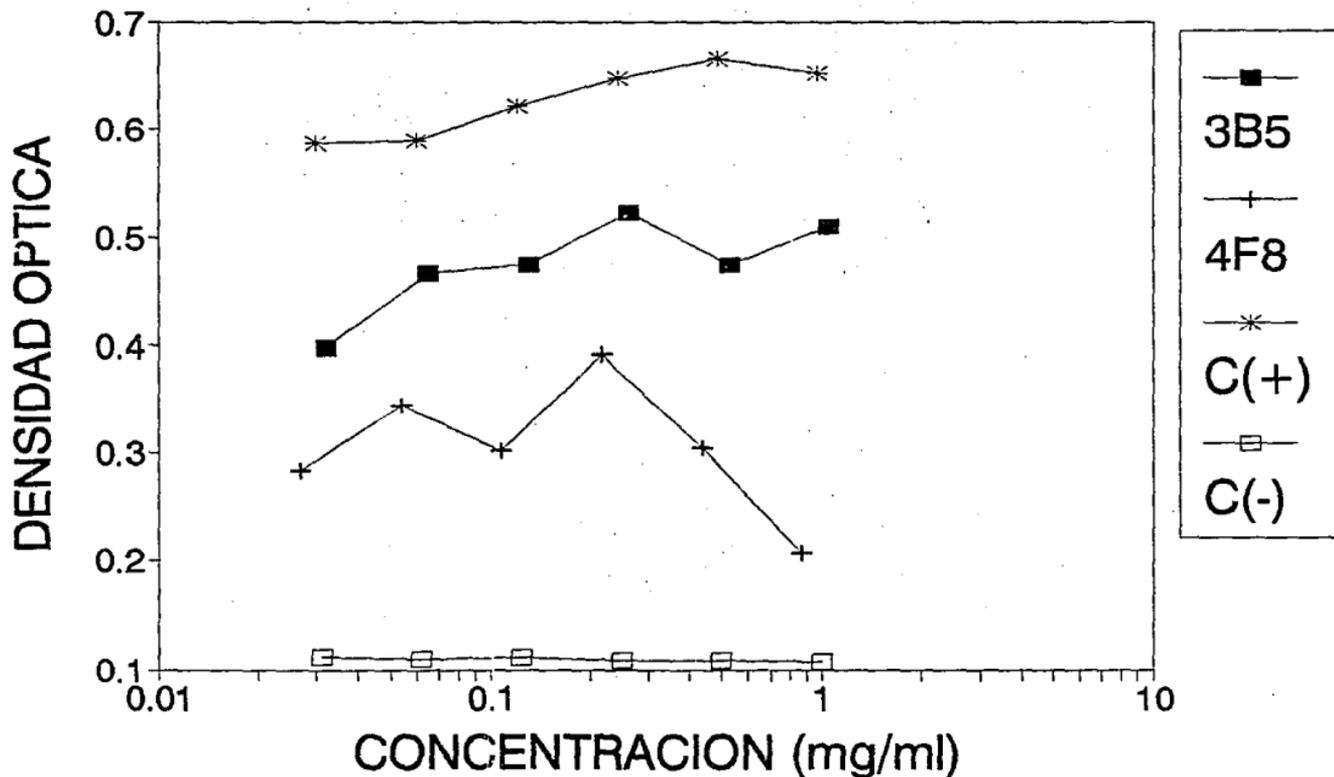
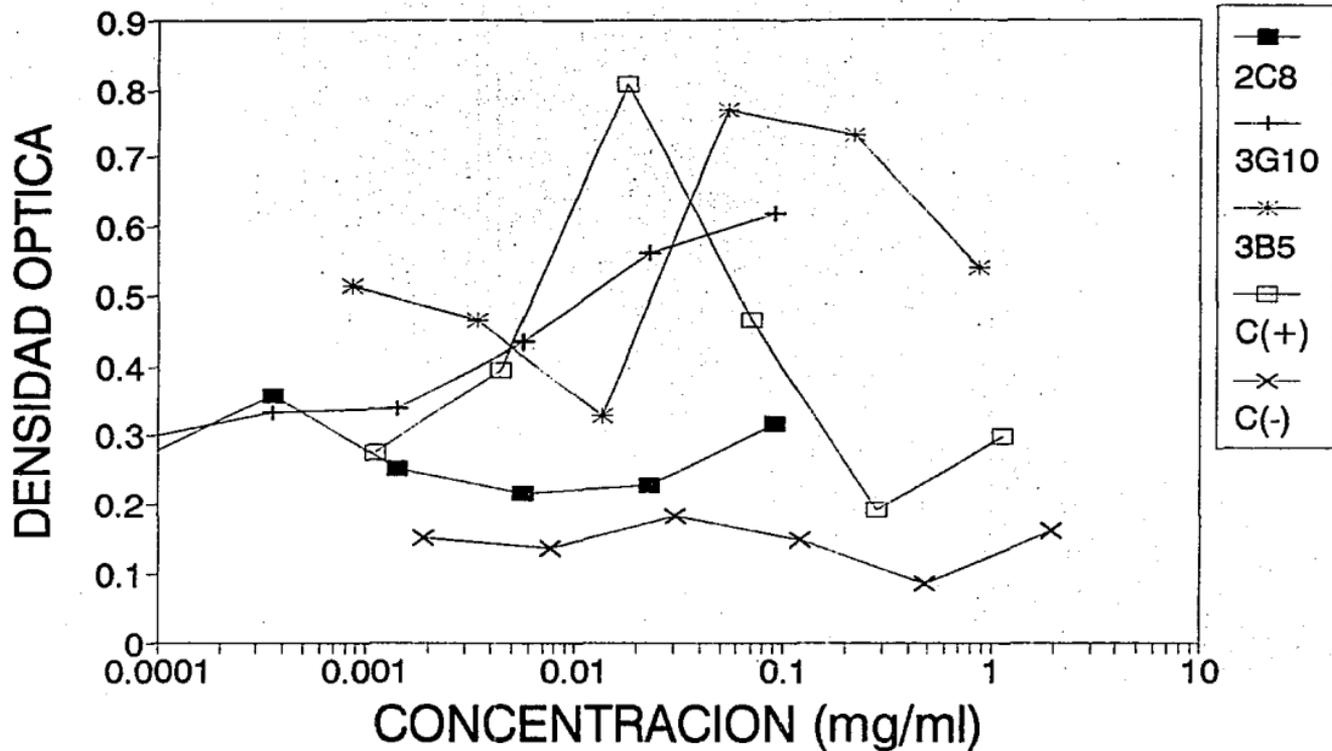


Fig.15. Fagocitosis de eritrocitos de camero opsonizados con Acmo (IgG2b). Macrófagos P388 fueron incubados en microplacas con eritrocitos de camero previamente opsonizados con: 3B5, 4F8, Ig policlonal de conejo anti-DNP (C+) H10 (Acmo de ag. diferente al DNP, C-). Se lavaron y lisaron los macrófagos, determinándose la actividad de pseudo-peroxidasa de la hemoglobina con un método colorimétrico.



88

Fig. 16. Fagocitosis efectuada por macrofagos P388. Macrofagos de la linea P388 fueron incubados en microplacas en presencia de eritrocitos de carnero opsonizados previamente con Acmo de los distintos isotipos: 2C8-IgG1, 3G10 IgG2a, 3B5-IgG2b. Se lavaron y lisaron los macrofagos determinandose la actividad de pseudoperoxidasa de la he - moglobina con un metodo colorimetrico.

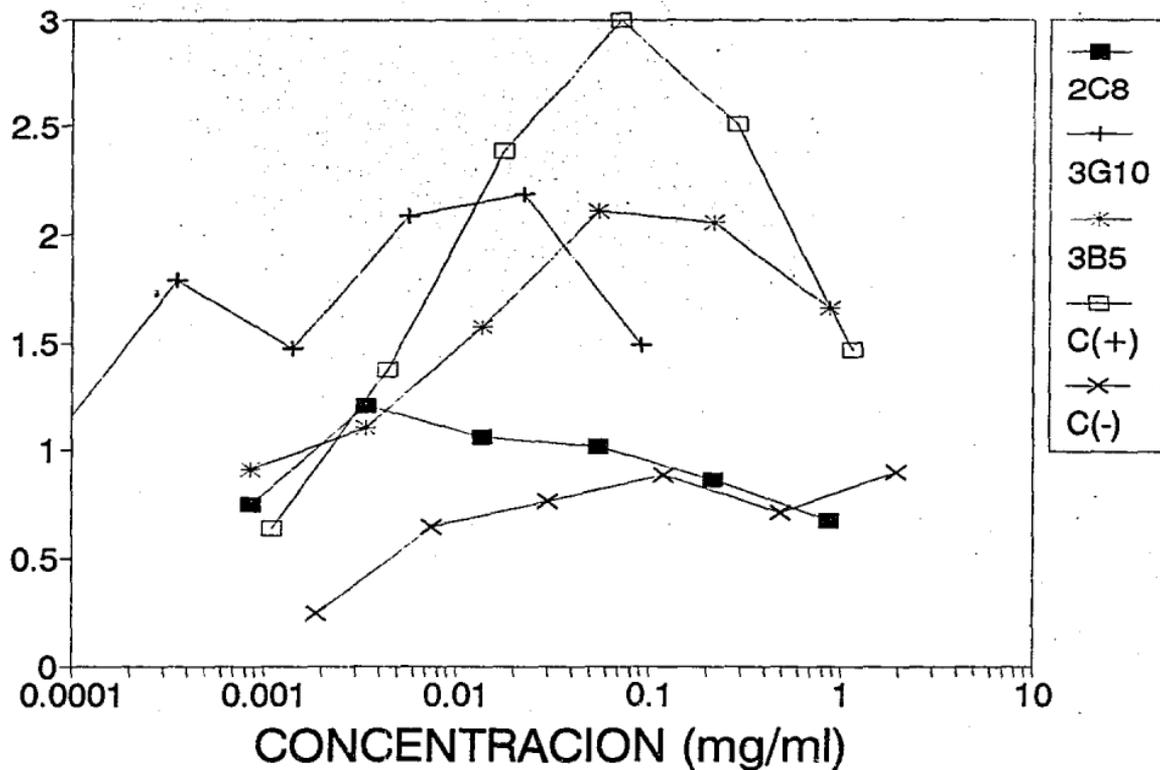
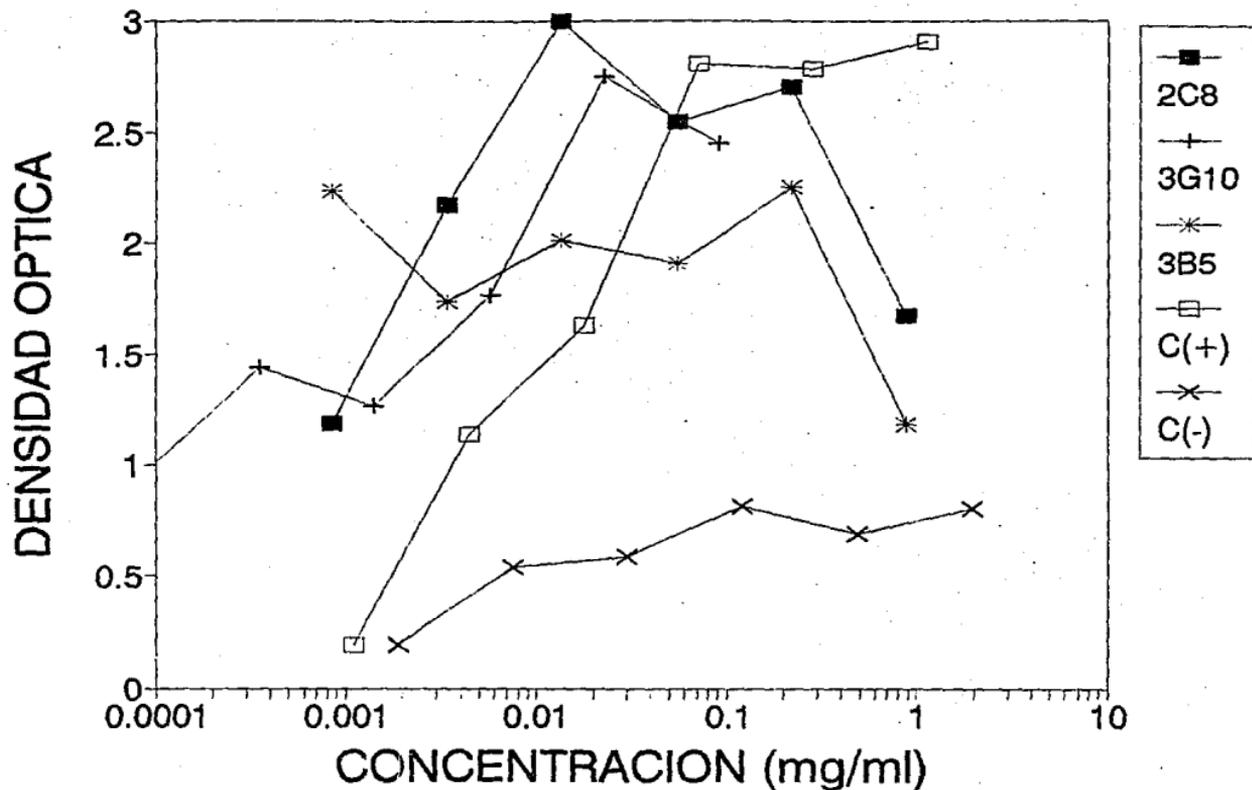


Fig. 17. Fagocitosis efectuada por macrofagos J774. Macrofagos murinos de la línea J774 fueron incubados en microplacas en presencia de eritrocitos de camero previamente opsonizados con Acmo de los distintos isotipos: 2C8-IgG1, 3G10-IgG2a, 3B5-IgG2b. Se lavaron y lisaron los macrofagos determinandose la actividad de pseudo-peroxidasa de la hemoglobina con un metodo colorimetrico.



58

Fig. 18. Fagocitosis efectuada por macrófagos inflamatorios. Macrófagos extraídos de cavidad peritoneal de ratones fueron incubados en microplacas en presencia de eritrocitos de carnero previamente opsonizados con Acmo de los distintos isotipos: 2C8-IgG1, 3G10-IgG2a, 3B5-IgG2b. Se lavaron y lisaron los macrófagos determinándose la actividad de pseudoperoxidasa de la hemoglobina con un método colorimétrico.

CAPITULO IV

DISCUSION

El estudio de la activación de funciones efectoras del macrófago a través de sus receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas ha tenido un gran desarrollo en los últimos años, lo que ha permitido obtener importantes avances en definir la estructura de los receptores al haberse clonado y analizado los genes que codifican a estos receptores. Sin embargo, falta aún mucho para definir y entender la secuencia de procesos bioquímicos intracelulares que se activan por el entrecruzamiento de los receptores y que desemboca en las funciones efectoras del macrófago. En los últimos años, el principal interés se ha concentrado en la participación de subunidades asociadas no covalentemente al receptor, así como en la fosforilación en tirosina de algunas proteínas inducida por el entrecruzamiento de los receptores, que parece ser uno de los primeros eventos de la activación de funciones efectoras.

Un aspecto importante para comprender la activación inducida por el entrecruzamiento de los receptores, es definir las propiedades estructurales y/o cinéticas que determinan que agregados de receptores puedan inducir activación, mientras que receptores no agregados no la induzcan. En otras palabras, definir como ocurre la agregación, cual es el tamaño mínimo de los agregados, cual es la distancia crítica entre receptor y receptor, etc.

Para el estudio riguroso de este proceso de agregación es necesario contar con reactivos homogéneos cuya unión y agregación de los receptores pueda analizarse cuantitativamente para correlacionar los

resultados de éste análisis con la activación de funciones efectoras.

El objetivo principal de esta tesis fue la obtención de anticuerpos monoclonales para usarlos como reactivos que cumplan con las características arriba mencionadas.

Se produjeron anticuerpos monoclonales murinos de la clase IgG específicos para el 2,4-dinitrofenol utilizando la técnica de hibridización de linfocitos desarrollada por Galfrè y Milstein [143,144] para así poder contar con una fuente prácticamente ilimitada de anticuerpos con distintas características en cuanto a subclase, afinidad, etc.

Después de realizar numerosas fusiones y de resolver los problemas técnicos que se presentaron (Tabla VII); se lograron obtener un total de 115 clonas positivas productoras de anticuerpos anti-DNP, de las cuales la mayoría (73 clonas) pertenecían a la clase IgM. De las restantes 42 clonas positivas anti-DNP pertenecientes a la clase IgG se seleccionaron aquellas que producían una mayor concentración de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo y que además eran capaces de mediar la formación de rosetas y la fagocitosis de eritrocitos de carnero sensibilizados con TNP de una manera eficiente. Dada la imposibilidad técnica de clonar todos los hibridomas obtenidos, solo algunos de estos hibridomas fueron clonados y cultivados *in vivo* en ratones para obtener cantidades suficientes de anticuerpos para su posterior caracterización y utilización.

Para la purificación de los distintos anticuerpos monoclonales, fué necesario el uso de diferentes columnas de afinidad. Después de comparar distintas columnas para purificar los anticuerpos se pudo observar que para la mayoría de los anticuerpos la columna de DNP - BSA fué la más satisfactoria en cuanto a que con esta se obtuvieron mayores concentraciones de anticuerpos purificados, mientras que con las columnas que se prepararon usando DNP-Lisina, el rendimiento de la purificación fue notablemente más bajo. Esto podría indicar que los anticuerpos monoclonales obtenidos presentan una mayor afinidad por DNP cuando éste se presenta dentro de un entorno o conformación proteica, en comparación a su afinidad por el hapteno simple.

Una vez que se establecieron la producción y purificación de los

anticuerpos producidos por las distintas clonas seleccionadas, se caracterizaron éstos anticuerpos tanto en su unión a antígeno, como también con respecto a su unión a macrófagos y activación de funciones efectoras.

Para obtener información sobre el primer punto, se utilizaron distintas estrategias: determinación de afinidad por DNP-Lisina, unión a antígenos multivalentes unidos a fase sólida, y ensayos de inhibición por hapteno monovalente o antígeno.

Las constantes de afinidad de los anticuerpos por el hapteno DNP-Lisina se determinaron por el método de apagamiento de la fluorescencia. Las constantes de afinidad calculadas están en el rango de 10^5 - 10^6 (Tabla IX). El orden de afinidad de los anticuerpos para DNP-Lisina fué: 2C5 > 4F8 >> 3B5 > 3G10 > 2C8.

En ensayos de unión a DNP - BSA fijado a una fase sólida, los anticuerpos de isotipo IgG2b alcanzaron un nivel máximo más alto que los anticuerpos del isotipo IgG1, aunque la concentración con la que se obtiene el 50% de unión entre los dos anticuerpos son similares. Esto sugiere que la avidez de todos los anticuerpos monoclonales estudiados por antígenos multivalentes unidos a fase sólida es similar, o bien que este ensayo no posee la suficiente sensibilidad para detectar las diferencias. En estos experimentos la unión del anticuerpo al hapteno va en aumento hasta alcanzar una concentración de máxima unión, después de la cual se observa una ligera disminución en el pegado del anticuerpo, aunque se aumente la concentración de anticuerpo. Esto probablemente se deba al impedimento estérico provocado por el mismo exceso de anticuerpo.

También se realizaron ensayos en los que se determinó la capacidad del hapteno monovalente o del antígeno polivalente para inhibir la unión de los anticuerpos monoclonales a antígenos adsorbidos en fase sólida. En estos ensayos, la relativa avidez/afinidad del anticuerpo por el inhibidor se refleja en la concentración de inhibidor necesaria para reducir al 50% la reacción de fijación. De este modo, cuanto menor sea la concentración de hapteno/antígeno que inhibe 50% la unión, mayor es la afinidad del anticuerpo por el inhibidor.

Los resultados muestran que la afinidad relativa por el hapteno monovalente seguiría el orden: $2C8 < 2C5 << 4F8 < 3B5$. Es interesante notar que con excepción del anticuerpo 2C8, este orden es similar al orden de la afinidad de los anticuerpos por el hapteno determinada por apagamiento de fluorescencia.

La avidez relativa por el antígeno polivalente seguiría el orden de: $4F8 < 2C5 < 3B5 < 3E9 < 2C8$. Las diferencias observadas en la afinidad de los anticuerpos por el hapteno y por el antígeno, sugiere que los diferentes anticuerpos interaccionan de distinta manera con el determinante antigénico dinitrofenil, de modo que el microentorno en que dicho determinante se encuentre, es importante en la afinidad de la interacción del determinante antigénico con el sitio activo.

Como ya se indicó, el objetivo primordial para la producción de éstos anticuerpos monoclonales, es el utilizarlos como ligandos de los receptores $Fc\gamma$ de macrófagos. Por tanto, era importante demostrar que eran capaces de unirse a los receptores de los macrófagos murinos que nos sirven de modelo experimental, y de mediar funciones efectoras.

Para determinar la unión de los diferentes anticuerpos a los receptores $Fc\gamma$, se hicieron dos tipos diferentes de experimentos: ELISA e inmunofluorescencia. La unión de los anticuerpos monoclonales a las células P388 usando complejos inmunes formados con antígenos polivalentes y determinados por ELISA, sigue en general el mismo orden para todos los diferentes complejos: $3B5 > 4F8 > 3E9 > 2C5 > 2C8$. Aunque aparentemente se observan diferencias en la unión de los anticuerpos a los macrófagos, es difícil dar una interpretación a estas diferencias, ya que cabe recordar que la afinidad de los anticuerpos por los antígenos polivalentes sigue más o menos el mismo orden, por lo que el efecto observado puede ser debido a que si un anticuerpo tiene mayor afinidad por el antígeno al entrar en contacto pueden producir complejos antígeno-anticuerpo más grandes, es decir, con mayor número de anticuerpos por molécula de antígeno polivalente. Ya que la unión de los anticuerpos es detectada con un conjugado anti-inmunoglobulina, el conjugado puede detectar anticuerpos que no esten directamente unidos al receptor sino que se encuentren unidos al

antígeno polivalente. Por inmunofluorescencia se observó que todos los anticuerpos eran capaces de unirse específicamente a macrófagos, como la determinación se hizo microscópica no permite obtener conclusiones cuantitativas. Sin embargo, y no obstante que con el tipo de ensayos realizados no es posible obtener conclusiones cuantitativas en cuanto a la unión de los distintos anticuerpos a la células, si es posible afirmar que los anticuerpos monoclonales producidos se unen específicamente a los macrófagos murinos de la línea celular P388.

Otro parámetro importante para la caracterización es determinar si son capaces de mediar activación de funciones efectoras, por lo que se investigó la fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados por cada uno de los anticuerpos. Los resultados muestran que los anticuerpos de la subclase IgG2b (3B5 y 4F8) fueron con los que se alcanzó una mayor cantidad de eritrocitos fagocitados, niveles casi semejantes a los obtenidos al usar anticuerpos policlonales de conejo [Fig 15]. Esto concuerda con la observación (Tabla XIII) de que éstos anticuerpos fueron los más efectivos para mediar la formación de rosetas. Los anticuerpos monoclonales de las subclases IgG1 e IgG2a también fueron capaces de mediar fagocitosis, aunque los niveles máximos no son tan altos como cuando se opsonizan los eritrocitos con IgG2b. En el caso de los anticuerpos de la subclase IgG1 los niveles alcanzados con cada uno de los tres anticuerpos usados fueron similares. En cuanto a los anticuerpos de la subclase IgG2a alcanzaron en general niveles semejantes de fagocitosis en varios experimentos que se realizaron (ejemplo representativo en la Fig 14). Sin embargo no se pudo controlar la concentración de anticuerpos en cada experimento ya que solo se contaba con anticuerpo presente en sobrenadante y no en forma de anticuerpo purificado. Sin embargo los niveles de fagocitosis alcanzados, demuestran que estos anticuerpos si son capaces de mediar la fagocitosis de una manera específica y eficiente.

También se hicieron ensayos de fagocitosis con el propósito de observar posibles diferencias en la eficiencia o capacidad de realizar fagocitosis utilizando diferentes tipos de macrófagos murinos. Estos resultados se pueden observar en las figuras 16, 17 y 18. Los

macrófagos que realizan la fagocitosis en un tiempo menor son los macrófagos murinos inflamatorios obtenidos de cavidad peritoneal. Esto probablemente refleja que estos macrófagos se encontraban en un nivel de activación diferente debido a que son obtenidos del exudado inflamatorio. En cuanto a los macrófagos murinos de líneas celulares se encontró que las células de la línea J774 mediaron la fagocitosis de manera eficiente en un tiempo relativamente corto, casi en los mismos tiempos en los que los macrófagos inflamatorios mediaron la fagocitosis. En cambio, los macrófagos murinos de la línea celular P388 aunque alcanzaron los mismos niveles de fagocitosis, la alcanzan en tiempos más largos.

En conclusión, podemos afirmar que se logró obtener un conjunto de anticuerpos monoclonales de la clase IgG, específicos para el grupo DNP. Estos anticuerpos parecen tener diferencias en cuanto a la afinidad por el antígeno, y es posible que la afinidad de cada uno de ellos sea modificada de distinta manera por el microambiente en el cual se encuentra el determinante antigénico dinitrofenil. Aunque la afinidad de todos estos anticuerpos por el hapteno es relativamente baja, es indudable que todos los anticuerpos son capaces de unirse a los receptores Fc γ de macrófagos murinos y de mediar fagocitosis a través de éstos receptores. Esto los hace adecuados para emprender la búsqueda de las relaciones cuantitativas entre la agregación de los receptores y la respuesta celular.

CONCLUSIONES

- 1) Se logró obtener un grupo de 7 anticuerpos monoclonales de distintas subclases de IgG, específicos para el 2,4-dinitrofenol.
- 2) En la caracterización de los anticuerpos en cuanto a su afinidad parece estar modificada por el microambiente en el que se lleva a cabo el reconocimiento del antígeno.
- 3) Se encontró que estos anticuerpos poseen una baja afinidad por el antígeno. Sin embargo, se demostró la unión de los anticuerpos a los receptores Fc γ de macrófagos murinos.
- 4) Se demostró la capacidad de estos anticuerpos de activar al menos una de las funciones efectoras como es la fagocitosis de una manera eficiente, en macrófagos murinos a través de sus receptores para inmunoglobulinas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Harlow E., Lane D. Antibodies, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory 1988.
- 2.- William P. Fundamental Immunology, 2º edición , NY, Raven Press, 2:3-17, 1989.
- 3.- Lewis C., McGee J. The Natural Immune System. The Macrophages. Oxford University Press, NY, 3-10, 1989.
- 4.- Karnovsky ML. Metchnikoff in Messina: a century of studies on phagocytosis. N. Engl. J. Med. 304:1178-1180, 1981.
- 5.- Aschoff L. Das reticuloendotheliale system. Ergeb Inn. Med. Kinderheilkd. 26:7-118, 1924.
- 6.- Furth R. van, Cohn ZA., Hirsch JG., Humphry JH. Spector, WG., Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells. Bull. WHO. 46:845 - 852, 1972.
- 7.- Moore., MAS. and Metcalf D. Ontogeny of the Haematopoietic system: Yolk sac origin of *in vivo* and *in vitro* colony forming cells in the developing mouse embryo. Br. J. Haematol. 18:279 - 296, 1970.
- 8.- Furth R van. Origin and turnover of monocytes and macrophages. Curr. Top. Pathol. 79:125 - 150, 1989.
- 9.- Metcalf D. Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies *in vitro*. J. Cell Physiol. 77:277 - 280, 1971.
- 10.- Koeffler HP., Golde DW. Human myeloid leukaemia cell lines: A review. Blood. 56:344 - 350, 1980.
- 11.- Furth R van., Diesselhoff-den D., MMC., Raeburn JA., van Zwet, Th L., Crofton R., and Blussé van Oud Alblas A. Characteristics, origin and kinetics of human and murine mononuclear phagocytes. In: Mononuclear phagocytes. Functional

aspects. Editorial R. van Furth, 1980.

12.- Furth R van, Diesselhoff-den Dulk MMC. The kinetics of promonocytes and monocytes in the bone marrow. *J. Exp. Med.* **132:813 - 828**, 1970.

13.- Meuret G., Hoffmann G. Monocyte kinetic studies in normal and disease states. *Br. J. Haematol.* **24:275 - 285**, 1973.

14.- Furth R van., Sluiter W. Distribution of blood monocytes between a marginating and a circulating pool. *J. Exp. Med.* **163:474 - 479**, 1986.

15.- Dustin ML., Rothlein R., Bhan AK., Dinarello CA., and Springer TA. Induction by IL-1 and interferon- γ : Tissue distribution, biochemistry and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* **137:245 - 254**, 1986.

16.- Furth R van and Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* **128:415 - 435**, 1968.

17.- Furth R van., Diesselhoff-den Dulk, MMC., and Mattie H. Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. *J. Exp. Med.* **138:1314 - 1330**, 1973.

18.- Furth R van. Phagocytic cells: development and distribution of mononuclear phagocytes in normal steady state and inflammation. In *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. Editorial JI. Gallin, IM Goldstein and R. Snyderman. Raven. 1988.

19.- Berken A., Benacerref B. Properties of antibodies cytophilic for macrophages. *J. Exp. Med.* **123:119 - 144**, 1966.

20.- Lay WH., Nussenzweig V. Receptors for complement on leucocytes. *J. Exp. Med.* **128:991 - 1009**, 1968.

21.- Unkeless JC., Scigliano E., Freedman VH. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Ann. Rev. Immunol.* **6:251 - 281**, 1988.

22.- Brown EJ. Complement receptors and phagocytosis. *Curr. Opin. Immunol.* **3:76 - 82**, 1991.

23.- Ezekowitz RAB. The mannose receptor and phagocytosis. In: van Furth R., ed. *Mononuclear phagocytes: biology of monocytes and macrophages*. Dordrecht:Kluwer, **208 - 213**, 1992.

24.- Silverstein SC., Greenberg S., Di Virgilio F. Steinberg TH.

- Phagocytosis. In W. E. Paul. *Fundamental Immunology*. Raven Press.
- 25.- Fewtrell C., Metzger H. Larger oligomers of rat IgE are more effective than dimers in stimulating rat basophilic leukemia cells. *J. Immunol.* **125:701 - 710**, 1980.
- 26.- Mellman I., Plutner H. Internalization and degradation of macrophage Fc receptors bound to polyvalent immune complexes. *J. Cell Biol.* **98:1170 - 1177**, 1984.
- 27.- Green SA., Plutner H., Mellman I. Biosynthesis and intracellular transport of the mouse macrophage Fc receptor. *J. Biol. Chem.* **260:9867 - 9874**, 1985.
- 28.- Cohn SA. The structure and function of monocytes and macrophages. *Adv. Immunol.* **9:163 - 214**, 1968.
- 29.- Nathan CF., Murray HW., Cohn SA. The macrophage as an effector cell. *N. Eng. J. Med.* **303:622 - 626**, 1980.
- 30.- Sung SS., Nelson RS., Silverstein SC. Yeast mannans inhibit binding and phagocytosis of zymosan by mouse peritoneal macrophages. *J. Cell. Biol.* **96:160 - 166**, 1983.
- 31.- Griffin FM Jr., Griffin JA., Silverstein SC. Studies on the mechanism of phagocytosis. II. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow derived lymphocytes. *J. Exp. Med.* **144:788 - 809**, 1976.
- 32.- Hirsch JG. Cinemicrophotographic observation on granule lysis in polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis. *J. Exp. Med.* **116:827 - 833**, 1962.
- 33.- Stossel TP. The mechanical responses of white blood cells. In *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. Raven, 1988.
- 34.- Klebanoff SJ. Phagocytic cells: products of oxygen metabolism. In *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. Raven, 1988.
- 35.- Rouzer CA., Scott WA., Kempe J., Cohn ZA. Prostaglandin synthesis by macrophages requires a specific receptor-ligand interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77:4279 - 4282**, 1980.
- 36.- Aderem AA., Wright SD., Silverstein SC., Cohn ZA. Ligated complement receptors do not activate the arachidonic acid cascade in resident peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* **161:617 - 622**,

1985.

37.- Wright SD., Silverstein SC. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human monocytes. *J. Exp. Med.* **158:2016 - 2023**, 1983.

38.- Goodman MG., Chenoweth DE., Weigle WO. Induction of interleukin1 secretion and enhancement of humoral immunity by binding of human C5a to macrophage surface C5a receptors. *J. Exp. Med.* **156:912 - 917**, 1982.

39.- Cline MJ., Lehrer RI., Territo MC., Golde DW. Monocytes and Macrophages: Functions and diseases. *Ann. Intern. Med.* **88:78 - 88**, 1978.

40.- Unanue ER. The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation, part two: symbiotic relationship between lymphocytes and macrophages. *Adv. Immunol.* **31:1 - 29**, 1981.

41.- Takemura R., Werb Z. Secretory products of macrophages and their physiological function. *Am. J. Physiol.* **246:C1 - C9**, 1984.

42.- Auger MJ., Ross JA. The biology of the macrophage. In Lewis CE., McGee JOD. *The Macrophage*. Oxford University, 1992.

43.- Scott WA., Powloski NA., Murray HW., Andreach M., Zrike J., Cohn ZA. Regulation of arachidonic acid metabolism by macrophage activation. *J. Exp. Med.* **155:1148 - 1159**, 1982.

44.- Taffer SM., Russell SW. Macrophage-mediated tumor cell killing: regulation of expression of cytolytic activity by prostaglandin E. *J. Immunol.* **126:424 - 431**, 1981.

45.- Wolpe SD., Cerami A. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. *FASEB J.* **3:2565 - 2573**, 1989.

46.- Szein MB., Steeg PS., Johnson HM., Oppenheim J. Regulation of human peripheral blood monocyte DR antigens expression by lymphokines and recombinant interferons. *J. Clin. Invest.* **73:556 - 567**, 1984.

47.- Green SJ., Nancy CA., Metzger MS. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxide in macrophages. *J. Leukocyte Biol.* **50:93 - 109**, 1991.

48.- Henson PM., Henson JE. Fittschen C., Kimani G., Bratton

- DL., Riches DWH. Phagocytic cells: Degranulation and secretion. In: Basic principles and clinical correlates. Raven, 1988.
- 49.- Leibovich SJ., Ross R. The role of the macrophage in wound repair. *Am. J. Pathol.* **78:71 -79**, 1975.
- 50.- Jeffrey V., Ravetch and Jean-Pierre Kinet. *Annu. Rev. Immunol.* **9:457 - 492**, 1991.
- 51.- Ravetch JV., Anderson CL. Fc γ R Family: proteins, transcripts and genes. In *Fc Receptors and the Action of Antibodies*, chapter VI. Edit. H. Metzger. Washington, D.C. Am. Soc. Microbiol, 1990.
- 52.- Kinet, J.P. Antibody-cell interactions: Fc receptors. *Cell.* **57:351 - 354**, 1989.
- 53.- Unkeless JC., Scigliano E., Freedman VH. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu. Rev. Immunol.* **6:251 - 281**, 1988.
- 54.- Anderson CL. and Looney RJ. Review: human leukocyte IgG Fc receptors. *Immunol. Today.* **7:264 - 273**, 1986.
- 55.- Williams AF., Barclay AN. The immunoglobulin superfamily domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **6:381 - 405**, 1988.
- 56.- Lubeck MD., Steplewski Z., Baglia F., Klein MH., Dorrington KD., Koprowski H. The interaction of murine IgG subclass proteins with human monocyte Fc receptors. *J. Immunol.* **135:1299 - 1304**, 1985.
- 57.- Unkeless JC., Eisen HN. Binding of monomeric immunoglobulin to Fc receptors of mouse macrophages. *J. Exp. Med.* **142:1520 - 1533**, 1975.
- 58.- Simmons D., Seed B. The Fc γ receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein. *Nature* **333:568 - 570**, 1988.
- 59.- Perussia B., Dayton ET., Lazarus R., Fanning V., Trinchieri G. Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells. *J. Exp. Med.* **158:1092 - 1113**, 1983.
- 60.- Ernst LK., van der Winkel GJ., Chiu I-M., Anderson CL. Three genes for the human high affinity Fc receptor for IgG (Fc γ RI)

encode four distinct transcription products. *J Biol. Chem.* **267:15692 - 15700**, 1992.

61.- Kurlander RJ., Batker J. The binding of human immunoglobulin G1 monomer and small, covalently cross-linked polymers of immunoglobulin G1 to human peripheral blood monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Clin. Invest* **69:1-8**, 1988.

62.- Selvaraj P., Rosse WF., Silber R., Springer TA. The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nature* **333:565-567**, 1988.

63.- Girard MT., Hjaltadottir S., Fejes-Toth AN., Guyre PM. Glucocorticoids enhance the gamma-interferon augmentation of human monocyte immunoglobulin G Fc receptor expression. *J. Immunol.* **138:3235 - 3241**, 1987.

64.- Yancey KB., O'Shea J., Chused T., Brown E., Takahashi T., Frank MM., Lawley TJ. Human C5a modulates monocytes Fc and C3 receptor expression. *J. Immunol* **135:465 - 470**, 1985.

65.- Simms HH., Frank MM., Quinn TC., Holland S., Gaither TA. Studies on phagocytosis in patients with acute bacterial infections. *J. Clin. Invest.* **83:252 - 260**, 1989.

66.- Anderson CL., Looney RJ. Human leukocyte IgG Fc receptors. *Immunol. Today* **7:264 - 266**, 1986.

67.- Anderson CL., Shen I., Eicher DM., Wewers MD., Gill JK. Phagocytosis mediated by three distinct Fc γ receptor classes on human leukocytes. *J. Exp. Med.* **171:1333 - 1345**, 1990.

68.- Anderson CL., Guyre Pm., Whittin JC., Ryan DH., Looney RJ., Fanger MW. Soluble circulating Fc receptors on human mononuclear phagocytes. Antibody characterization and induction of superoxide production in a monocyte cell line. *J. Biol. Chem.* **261:12856 - 12864**, 1986.

69.- Debets JMH., van der Winkel JGJ., Ceuppens JL., Dieteren IEM., Buurman WA. Cross-linking of both Fc γ RI and Fc γ RII induces secretion of tumor necrosis factor by human monocytes, requiring high affinity Fc-Fc γ R interactions. *J. Immunol.* **144:1304 - 1310**, 1990.

- 70.- Shen L., Guyre PM., Anderson CL., Fanger MW. Heteroantibody mediated cytotoxicity: antibody to the high affinity Fc receptor for IgG mediates cytotoxicity by human monocytes that is enhanced by interferon- γ and is not blocked by human IgG. *J. Immunol.* **137:3378 - 3382**, 1986.
- 71.- Shen L., Guyre PM., Fanger MW. Polymorphonuclear leukocyte function triggered through the high affinity Fc receptor for monomeric IgG. *J. Immunol.* **139:534 - 538**, 1987.
- 72.- Unkeless JC., Scigliano E., Freedman VH. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu. Rev. Immunol.* **6:251 - 281**, 1988.
- 73.- Brooks DG., Qui WQ., Luster Ravetch JV. Structure and expression of human Fc γ receptor II (CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes. *J. Exp. Med.* **170:1369 - 1385**, 1989.
- 74.- Rossman MD, Chen E., Chien P., Rotten M., Cprek A., Schreiber AD. Fc γ receptor recognition of IgG ligand by human monocytes and macrophages. *Am J Resp. Cell Mol. Biol.* **1:211 - 220**, 1989.
- 75.- Jones DH., Looney RJ., Anderson CL. Two distinct classes of IgG Fc receptors on a human monocyte line (U937) defined by differences in binding of murine IgG subclasses at low ionic strength. *J. Immunol.* **135: 2248 - 3353**, 1985.
- 76.- Looney RJ., Abraham GN, Anderson CL. Human monocytes and U937 cells bear two distinct Fc receptors for IgG. *J. Immunol.* **136:1641 - 1647**, 1986.
- 77.- Mellman IS., Unkeless JC. Purification of a functional mouse Fc receptor through the use of a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* **152:1048 - 1069**, 1980.
- 78.- Ravetch JV., Luster AD., Weinshank JK., Pavlovic AD., Hulmes J., Pan YC., Unkeless JC., Structural heterogeneity and functional domains of murine immunoglobulin G Fc receptors. *Science* **234:718 - 725**, 1986.
- 79.- Lewis VA., Koch T., Plutner H., Mellman I. A complementary DNA clone for a macrophage-lymphocyte Fc receptor. *Nature* **324:372 - 375**, 1986.

- 80.- Hogarth PM., Hibbs ML., Bonadonna L., Scott BM., Witort E., Pietersz GA., Mckenzie IF. The mouse Fc receptor for IgG (Ly-17): molecular cloning and specificity. *Immunogenetics*. **26:161 - 168**, 1987.
- 81.- Stuart SG., Trounstein M., Vaux D., Koch T., Martens C., Mellman I., Moore KM. Isolation and expression of cDNA clones encoding a human receptor for IgG (Fc γ RII). *J. Exp. Med.* **166:1668 - 1684**, 1988.
- 82.- Hibbs ML., Bonadonna L., Scott BM., Mckenzie IFC., Hogarth PM. Molecular cloning of a human immunoglobulin G Fc receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85:2240 - 2244**, 1988.
- 83.- Stengelin S., Stamenkovic T., Seed B. Isolation of cDNA for two distinct human Fc receptors by ligand affinity cloning. *EMBO J.* **7:1053 - 1059**, 1988.
- 84.- Brooks DG., Qiu WQ., Luster AD., Ravetch JV. Structure and expression of a human IgG FcRII (CD32): Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes. *J. Exp. Med.* **170:1369 - 1386**, 1989.
- 85.- Stuart SG., Simister NE., Clarkson SB., Shapiro M., Mellman I. The low affinity Fc receptor for human IgG (hFcRII) exists as multiple isoforms. *EMBO J.* **8:3657 - 3666**, 1989.
- 86.- Qiu WQ., de Bruin D., Brownstein BH., Pearse R., Ravetch JV. Organization of the human and mouse low-affinity FcR genes: Evidence for duplication and recombination. *Science* **248:732 - 735**, 1990.
- 87.- Huizinga TWJ., van Kememade F., Koenderman L., Dolman KM., von dem Borne AEG Jr., Tetteroo PAT, Roos R. The 40-kDa Fc γ receptor (FcRII) on human neutrophils is essential for the IgG-induced respiratory burst and IgG-induced phagocytosis. *J. Immunol.* **142:2365 - 2369**, 1989.
- 88.- Walker BAM., Hagenlocker BE., Stubbs EB Jr., Sandborg RR, Agranoff BW., Ward PA. Signal transduction events and Fc γ R engagement in human neutrophils stimulated with immune complexes. *J. Immunol.* **146:735 - 741**, 1991.
- 89.- Weinshank RL., Luster AD., Ravetch JV. Function and regulation of a murine macrophage specific IgG Fc receptor, Fc γ R α .

J. Exp. Med. **167:1909 - 1925**, 1988.

90.- Ra C., Jouvin MH., Blank U., Kinet JP. A macrophage Fc γ receptor and the mast cell receptor for immunoglobulin E share an identical subunit. Nature. **341:752 - 754**, 1989.

91.- Kurosaki T., Ravetch JV. A single amino acid substitution in the GPI attachment domain is responsible for the alternative membrane anchoring of Fc γ RIII (CD16). Nature. **342:805 - 807**, 1989.

92.- Hibbs ML., Selvaraj P., Carpen O., Springer TA., Kuster H., Jouvin ME., Kinet J. Mechanisms for regulating expression of membrane isoforms of Fc γ RIII (CD16). Science **246:1608 - 1611**, 1989.

93.- Kurosaki T., Ravetch JV. A single amino acid in the glycosyl phosphatidylinositol attachment domain determines the membrane topology of Fc γ RIII. Nature **342:805 - 807**, 1989.

94.- Anderson P., Caligiuri M., O'Brien C., Manley T., Ritz J., Schlossman SF. Fc γ receptor type III (CD16) is included in the ζ NK receptor complex expressed by human natural killer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87:2274 - 2278**, 1990.

95.- Lanier LL., Cwirla S., Yu G., Testi R., Phillips JH. Membrane anchoring of a human IgG Fc receptor (CD16) determined by a single amino acid. Science **246:1611 - 1613**, 1989.

96.- Ravetch JV., Perussia B. Alternative membrane forms of Fc γ RIII (CD16) on human NK cells and neutrophils: Cell-type specific expression of two genes which differ in single nucleotide substitution. J. Exp. Med. **170:481 - 497**, 1989.

97.- Lanier LL., Yu G., Phillips JP. Co-association of CD3 with a receptor (CD16) for IgG Fc on human NK cells. Nature. **342:803 - 806**, 1989.

98.- Clarkson SB., Ory PA. Developmentally regulated IgG Fc receptors on cultured human monocytes. J. Exp. Med. **167:408 - 417**, 1988.

99.- Fleit HB., Wright SD., Unkeless JC. Human neutrophil Fc γ receptor distribution and structure. Proc. Natl. Acad. Sci USA. **79:3275 - 3279**, 1982.

100.- Perussia B., Trinchieri G., Jackson A, et al. The Fc receptor

for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **133:180 - 189**, 1984.

101.- Kimberly RP., Ahlstrom JW., Click ME., Edberg JC. The glycosyl phosphatidylinositol-linked Fc γ RIII_{PMN} mediates transmembrane signalling events distinct from Fc γ RII. *J. Exp. Med.* **171:1239 - 1255**, 1990.

102.- Salmon JE., Brogle NL., Edberg JC., Kimberly RP. Fc γ receptor III induces actin polymerization in human neutrophils and primes phagocytosis mediated by Fc γ receptor II. *J. Immunol.* **146:997 - 1004**, 1991.

103.- Clarkson SB., Kimberly RP., Valinsky JE., Witmer MD., Bussel JB., Nachman RL., Unkeless JC. Blockade of clearance of immune complexes by an anti-Fc receptor monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* **164:474 - 489**, 1986.

104.- Miettinen JM., Rose JK., Mellman I. Fc receptor isoforms exhibit distinct abilities for coated pit localization due to cytoplasmic domain heterogeneity. *Cell.* **58:317 - 327**, 1989.

105.- Perussia B., Tutt MM., Qiao WQ., Kuziel WA., Tucker PW., Trinchieri G., Bennett M., Ravetch JV., Kumar V. Murine natural killer cells express functional Fc γ receptor II encoded by the Fc γ R γ gene. *J. Exp. Med.* **170:73 - 87**, 1989.

106.- Anderson P., Caligiuri M., O'Brian C., Manley T., Ritz J., Schlossman SF. Fc γ RIII (CD16) is included in the ζ NK receptor complex expressed by human natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87:2274 - 2278**, 1990.

107.- Mercap M., Weissman AM., Frank S., Klausner RD., Ashwell JD. Activation driven programmed cell death and T cell receptor $\zeta\eta$ expression. *Science.* **246:1162 - 1165**, 1990.

108.- Nelson DJ., Jacobs ER., Tang JM., Zeller JM., Bone RC. Immunoglobulin-G-induced single ionic channels in human alveolar macrophages membranes. *J. Clin. Invest.* **76:500 - 507**, 1985.

109.- Young JD., Ko SS., Cohn ZA. The increase in intracellular free calcium associated with IgG γ 2b/ γ 1 Fc receptor-ligand interactions: role in phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81:5430 - 5434**, 1984.

- 110.- Lew DP., Andersson T., Hed J., Di Virgilio F., Pozzan T., Stendahl O. Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent phagocytosis in human neutrophils. *Nature* **315:509 - 511**, 1985.
- 111.- Di Virgilio F., Meyer BC., Greenberg S., Silverstein SC. Fc receptor-mediated phagocytosis occurs in macrophages at exceedingly low cytosolic Ca^{2+} levels. *J. Cell Biol.* **106:657 - 666**, 1988.
- 112.- Sawyer DW., Sullivan JA., Mandell GL. Intracellular free calcium localization in neutrophils during phagocytosis. *Science* **230:663 - 666**, 1985.
- 113.- Johnston PA., Adams DO., Hamilton TA. Fc-receptor mediated protein phosphorylation in murine peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **124:197 - 202**, 1984.
- 114.- Connelly PA., Farrell CA., Merenda JM., Conklyn MJ., Showell HJ. Tyrosine phosphorylation is an early signaling event common to Fc receptor crosslinking in human neutrophils and rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177:192 - 201**, 1991.
- 115.- Huang M., Indik Z., Brass LF., Hoxie JA., Schreiber AD., Brugge JS. Activation of $Fc\gamma RII$ induces tyrosine phosphorylation of multiple proteins including $Fc\gamma RII$. *J. Biol. Chem.* **267:5467 - 5473**, 1992.
- 116.- Ting AT., Einspahr KJ., Abraham RT., Leibson PJ. Fc γ receptor signal transduction in natural killer cells-coupling to phospholipase C via a G protein-independent, but tyrosine kinase-dependent pathway. *J. Immunol.* **147:3122 - 3127**, 1991.
- 117.- Einspahr KJ., Abraham RT., Binstadt BA., Uehara Y., Leibson PL. Tyrosine phosphorylation provides an early and requisite signal for the activation of natural killer cell cytotoxic function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88:6279 - 6283**, 1991.
- 118.- Greenberg S., Chang P., Silverstein SC. Tyrosine phosphorylation is required for Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J. Exp. Med.* **177:529 - 534**, 1993.
- 119.- Klausner RD., Samelson LE. T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosine kinase connection. *Cell.* **64:875 - 878**, 1991.

- 120.- Ra C., Jouvin ME., Blank U., Kineret J. A macrophage Fc γ receptor and the mast cell receptor for IgE share an identical subunit. *Nature* **341:752 - 754**, 1989.
- 121.- Yu K., Lyall R., Jariwala N., Zilberstein A., Haimovich J. Antigen and ionophore-induced signal transduction in rat basophilic leukemia cells involves protein tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **266:22564 - 22568**, 1991.
- 122.- Benhamou M., Stephan V., Robbins KC., Siraganian RP. High-affinity IgE receptor-mediated stimulation of rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells induces early and late protein-tyrosine phosphorylations. *J. Biol. Chem.* **267:7310 - 7314**, 1991.
- 123.- Kawakami T., Inagaki N., Takei M., Fukamachi H., Coggeshall Km., Ishizaka K., Ishizaka T. Tyrosine phosphorylation is required for mast cell activation by Fc ϵ RI cross-linking. *J. Immunol.* **148:3513 - 3519**, 1992.
- 124.- Weinshank RL., Luster AD., Ravetch JV. Function and regulation of a murine macrophage-specific IgG Fc receptor, Fc γ R- α . *J. Exp. Med.* **167:1909 - 1925**, 1988.
- 125.- Scholl PR., Ahern D., Geha RS. Protein tyrosine phosphorylation induced via the IgG receptors Fc γ RI and Fc γ RII in the human monocytic cell line THP-1. *J. Immunol.* **149:1751 - 1757**, 1992.
- 126.- Brozna JP., Hauff NF., Phillips WA., Johnston RB Jr. Activation of the respiratory burst in macrophages. Phosphorylation specifically associated with Fc receptor-mediated stimulation. *J. Immunol.* **141:1642 - 1647**, 1988.
- 127.- Zheleznyak A., Brown EJ. Immunoglobulin-mediated phagocytosis by human monocytes requires protein kinase C activation. *J. Biol. Chem.* **267:12042 - 12048**, 1992.
- 128.- Suzuki T. Signal transduction mechanisms through Fc γ receptors on the mouse macrophage surface. *FASEB. J.* **5:187 - 193**, 1991.
- 129.- Della Bianca V., Grzeskowiak M., Rossi F. Studies on molecular regulation of phagocytosis and activation of the NADPH oxidase in neutrophils-IgG and C3b-mediated ingestion and associated respiratory burst independent of phospholipid turnover and

- Ca²⁺ transients. *J. Immunol.* **144:1411 - 1417**, 1990.
- 130.- Aderem AA., Scott WA., Cohn ZA. Evidence for sequential signals in the induction of the arachidonic acid cascade in macrophages. *J. Exp. Med.* **163:139 - 154**, 1986.
- 131.- Brown MS., Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostatis. *Science.* **232:34 - 47**, 1986.
- 132.- Goldstein JL., Brown MS., Anderson RGW., Russell DW., Schneider WJ. Receptor-mediated endocytosis. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1:1 - 39**, 1985.
- 133.- Jones DH., Nusbacher J. Anderson CL. Fc receptor-mediated binding and endocytosis by human mononuclear phagocytes: monomeric IgG is not endocytosed by U937 cells and monocytes. *J. Cell. Biol.* **100:558 - 564**, 1984.
- 134.- Eisen HN., *Meth. Med. Res.*, **10:115 - 121**, 1964 (II)
- 135.- Larralde C & Janof. P. The effects of the DNP:HSA molar ratio on the quantity and the affinity of rat anti-DNP antibodies in the primary response. *Immunochemistry.* **9:1209 - 1219**, 1972.
- 136.- Lowry OH., Rosenbrough NJ., Farr AL. and Randall RJ. *J. Biol. Chem.* **193:265 - 278**, 1951.
- 137.- Little JR. and Eisen HN. *Methods in Immunology and Immunochemistry.* Williams and Chase (editors), Academic Press Inc. New York, Vol I:**131 - 136**, 1967.
- 138.- Hurn, BAL. and Chantler SM. Production of reagent antibodies. *Meth. Enzimol.* **70:104-142**, 1980.
- 139.- Sculman C., Wilde and Kohler G., *Nature.* **276:269 - 270**, 1978.
- 140.- Kohler G. et al *J. Immunol.* **126:317 - 332**, 1981.
- 141.- American Type Culture Collection (ATCC). *Catalogue of Cell Lines & Hybridomas*, Sixth edition, 1988.
- 142.- GIBCO BRL. *Catalogue and Reference Guide*, **11, 82**, 1992.
- 143.- Galfrè G, Howe SC., Milstein C, Butcher GW., and Howard JC. Antibodies to Major Histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature.* **266:550 - 552**, 1977.
- 144.- Galfrè G. and Milstein C. Preparation of Monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Meth. Enzymol.* **73:1 - 46**, 1981.

- 145.- Marck SC., Parikh I., and Cuatrecasas P. A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Analytical Biochem.* **60**: 149-152, 1974.
- 146.- Wright S. Methods for the study of receptor-mediated phagocytosis. *Meth. Enzym.* **132**:204 - 209, 1986.
- 147.- Darryl R. Basic methods for the study of phagocytosis. *Meth. Enzym.* **132**:95 - 102, 1986.
- 148.- Jungi T. A rapid and sensitive method allowing photometric determination of erythrophagocytosis by mononuclear phagocytes. *J. Immunol. Meth.* **82**:141 - 148, 1985.