

00346

3
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**EFFECTO DEL ESTRADIOL Y DEL DIETILESTILBESTROL
ENTRES PROCESOS DEL SISTEMA INMUNE DEL RATON**

T E S I S

Que para obtener el grado Académico de

MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

p r e s e n t a

JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS

México, D. F.

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS.

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EFFECTO DEL ESTRADIOL Y DEL DIETILESTILBESTROL EN
TRES PROCESOS DEL SISTEMA INMUNE DEL RATON.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR).

P R E S E N T A

JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS

DIRECTOR DE TESIS: Med. Cir. JUAN J. MANDOKI WEITZNER

R

Ceibaco

Dedico esta tesis a la memoria de mi madre, Paz Guarneros Hernández q.e.p.d., quien me inculcó desde mi infancia, la formación universitaria aún habiendo sacrificado su bienestar personal.

Con todo mi amor a Patricia, Rocío e Hiram.

A mi director de tesis, en gratitud a mi formación, al apoyo permanente que me ha brindado en todos aspectos y como reconocimiento a su sabiduría y honestidad.

A todos mis maestros amigos y compañeros, que con sus enseñanzas me han permitido culminar mi primer paso en el posgrado.

TABLA DE CONTENIDOS

I.- ANTECEDENTES

Importancia del sistema inmunitario
El control del sistema inmunológico
El papel central del macrófago

II.- EFECTOS DE LOS ESTROGENOS EN EL SISTEMA INMUNOLOGICO

En los macrófagos
En la producción de anticuerpos
En las células asesinas naturales
En los linfocitos

III.- HIPOTESIS DE TRABAJO

IV.- METAS

V.- MATERIAL Y METODOS

1) Actividad fagocitaria

a). Evaluación *in vitro* de la actividad fagocitaria en macrófagos peritoneales residentes, mediante **ensayos colorimétricos de la reducción del azul de tetrazolio:**

- i) del tratamiento *in vivo* con dietilstilbestrol.
- ii) de la exposición *in vitro* a estrógenos.

b). Evaluación *in vitro* de la actividad fagocitaria en macrófagos de la línea celular J774A.1, mediante **ensayos de la ingestión de partículas de látex y de cuentas del número de células reductoras de azul de tetrazolio.**

2.- Anticuerpos séricos y número de clonas secretoras de inmunoglobulinas anti-H37Rv.

a) Niveles sanguíneos de IgG anti-H37Rv, en ratones tratados con estrógenos, **ELISA INDIRECTO (inmunoensayo enzimático en fase sólida).**

b) Número de clonas secretoras de IgG anti-H37Rv en ratones tratados con estrógenos, **FIPA (inmunoensayo enzimático de placa en filtro).**

c) Peso del bazo en ratones inmunizados y tratados con estrógenos.

d) Número de clonas secretoras de IgM e IgG (respuesta primaria), provenientes del bazo de ratones tratados con dietilstilbestrol, **FIPA (inmunoensayo enzimático de placa en filtro).**

3).- Cuantificación de la actividad secretora *in vitro* de 5 hibridomas de células B de ratón (secretoras de IgG).

a) **ELISA indirecto (inmunoensayo enzimático en fase sólida)**, para cuantificar inmunoglobulinas (IgG), en los sobrenadantes de cada hibridoma:

- i) Elaboración de curvas estándar para cuantificar IgG.
- ii) Elaboración de curvas dosis-respuesta a la exposición *in vitro* a estrógenos, de la actividad secretora de inmunoglobulinas.

- b) Elaboración de curvas de crecimiento y viabilidad para cada hibridoma expuesto a estrógenos

VI.-RESULTADOS

1) Actividad fagocitaria

- a). Efecto de la administración de dietilestilbestrol en el ratón, en la actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales residentes, evaluado *in vitro*, mediante la reducción del azul de tetrazolio (ensayos colorimétricos).
- b). Efecto de la exposición *in vitro* a estrógenos, en la actividad fagocitaria, de macrófagos peritoneales residentes de ratón, evaluado mediante la reducción de azul de tetrazolio (ensayos colorimétricos).
- c). Efecto *in vitro* del suero de ratones tratados con estrógenos, en la actividad fagocitaria en células de la línea celular de macrófagos murinos J774A.1 (TIB67 ATCC), evaluado mediante la fagocitosis de partículas de látex.
- d). Efecto *in vitro* de estradiol y dietilestilbestrol en la línea celular J774A.1 (TIB67 ATCC), evaluado mediante el número de células reductoras de azul de tetrazolio.

2) Anticuerpos séricos y número de clonas secretoras de inmunoglobulinas anti-H37Rv.

- a). Efecto del tratamiento de ratones con estrógenos, en los niveles sanguíneos de IgG anti-H37Rv (fase primaria).
- b). Efecto de dos combinaciones de tratamiento con estrógenos e inmunización en ratones, sobre el número de clonas secretoras de IgG anti-H37Rv (fase primaria).
- c). El peso del bazo en ratones, con dos combinaciones de tratamiento de estrógenos e inmunización.
- d) Efecto del tratamiento *in vivo* con dietilestilbestrol, sobre el número de clonas secretoras de inmunoglobulinas IgM e IgG anti-H37Rv (respuesta primaria).

3) Exposición *in vitro* a estrógenos, de 5 hibridomas de células B de ratón, secretoras de IgG.

Efecto *in vitro* del estradiol, o dietilestilbestrol, en la secreción de inmunoglobulinas, en la viabilidad celular y en el crecimiento.

VII.- DISCUSION

VIII.- AGRADECIMIENTOS

IX.- REFERENCIAS

ABREVIATURAS

AIF	Adyuvante incompleto de Freund
BCF	Amortiguador de citratos-fosfatos
DEE	Dietilestilbestrol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
E ₂	Estradiol-17 β
ELISA	Inmunoensayo enzimático en fase sólida
ELISPOT	Inmunoensayo enzimático de punto
FIPA	Inmunoensayo enzimático de placa en filtro
KOH	Hidróxido de potasio
LPS	Lipopolisacárido de E. coli 026:B6
MSFM	Medio libre de suero para macrófagos
MTT	Metiltetrazolio
NBT	Azul de tetrazolio
PBS	Amortiguador de fosfato salina (pH7.2)
PMA	Forbol, 12-miristato 13-acetato
SBF	Suero bovino fetal

GLOSARIO

Estratos balanceados	Distribución de animales en grupos en base a su peso corporal.
Hibridoma de células B	Línea tumoral de linfocitos B, secretora de inmunoglobulinas monoclonales dirigidas contra un solo epítopo.
Línea celular	Células establecidas derivadas de una célula única.
Lote de ratones	Grupo de animales sujetos a un tratamiento.
Macrófago peritoneal residente	Macrófago obtenido de la cavidad peritoneal del ratón normal

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

- Fig. 1** Efecto *in vitro* del tratamiento de ratones con DEE (72h), en la actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales residentes.
- Fig. 2** Exposición *in vitro* a estrógenos (24h), de macrófagos peritoneales residentes, y efecto en la actividad fagocitaria.
- Fig. 3** Efecto *in vitro* del suero de ratones tratados con DEE (72h), en la actividad fagocitaria de la línea celular J774A.1 (exposición de 18h).
- Fig. 4** Polígono de frecuencias de la Fig. 3.
- Fig. 5** Efecto *in vitro* del suero de ratones tratados con estrógenos (72h), en la actividad fagocitaria de la línea celular J774A.1 (exposición de 30 min).
- Fig. 6** Polígono de frecuencias de la Fig. 5.
- Fig. 7** Curva dosis-respuesta de la actividad fagocitaria de la línea celular J774A.1 en presencia de estrógenos 2×10^{-13} a 2×10^{-9} M (24h).
- Fig. 8** Curva dosis-respuesta de la actividad fagocitaria de la línea celular J774A.1 en presencia de estrógenos 2×10^{-9} a 2×10^{-5} M (24h).
- Fig. 9** Curva dosis-respuesta de la actividad fagocitaria de la línea celular J774A.1 en presencia de estrógenos 2×10^{-6} a 64×10^{-6} M (24h).
- Fig. 10** Curva dosis-respuesta de la actividad fagocitaria de la línea celular J774A.1 en presencia de estrógenos 2×10^{-6} a 64×10^{-6} M (72h).
- Fig. 11** Efecto del tratamiento con estrógenos (72h), en la fase primaria (5^o día), en los niveles sanguíneos de IgG anti-H37Rv.

- Fig. 12** Efecto del tratamiento con estrógenos (72h), en la fase primaria (17º día), en los niveles sanguíneos de IgG anti-H37Rv.
- Fig. 13** Efecto del tratamiento con estrógenos (72h), posterior a la inmunización, en el número de células secretoras de inmunoglobulinas anti-H37Rv (5º día).
- Fig. 14** Efecto del tratamiento con DEE (72h), previo a la inmunización, en el número de células secretoras de inmunoglobulinas anti-H37Rv (5º día).
- Fig. 15** Efecto del tratamiento con estrógenos (72h), posterior a la inmunización, en el peso del bazo (5º día).
- Fig. 16** Efecto del tratamiento con DEE (72h), previo a la inmunización, en el peso del bazo (5º día).
- Fig. 17** Efecto del tratamiento con DEE (72h), posterior a la inmunización, en el número de células secretoras de IgM e IgG (5º día).
- Fig. 18** Curva de crecimiento del híbrido MMD6.
- Fig. 19** Validación del ELISA indirecto para cuantificar IgG en el híbrido MMD6 (estándar).
- Fig. 20** Curva dosis-respuesta para la secreción de IgG, exposición a E₂ (72h) híbrido MMTBD6.
- Fig. 21** Curva dosis-respuesta para la secreción de IgG, exposición a E₂ (72h) híbrido MMTBD6.
- Fig. 22** Curva dosis-respuesta para la secreción de IgG (índice de estimulación), exposición a estrógenos (72h) híbrido MMTBD6.
- Fig. 23** Validación del ELISA indirecto para cuantificar IgG en los híbridos anti-actina y anti-ribotimidina utilizando un estándar.
- Fig. 24** Curva dosis-respuesta para la secreción de IgG, en el híbrido anti-actina, expuesto a estrógenos (72h) 2X10⁻¹⁰ a 2X10⁻⁷ M.
- Fig. 25** Curva de crecimiento del híbrido anti-actina en presencia de E₂(2X10⁻⁹ a 2X10⁻⁷ M).
- Fig. 26** Curva de crecimiento del híbrido anti-actina en presencia de DEE(2X10⁻⁹ - 2X10⁻⁷ M).
- Fig. 27** Curva de crecimiento del híbrido anti-actina en presencia de E₂ y DEE (2X10⁻⁷ M).
- Fig. 28** Curva dosis-respuesta para la secreción de IgG, híbrido anti-ribotimidina, exposición a estrógenos (72h) 2X10⁻¹⁰ a 2X10⁻⁷ M.
- Fig. 29** Curva de crecimiento del híbrido anti-ribotimidina en presencia de E₂ (2X10⁻⁹ a 2X10⁻⁷ M).
- Fig. 30** Curva de crecimiento del híbrido anti-ribotimidina en presencia de DEE (2X10⁻⁹ a 2X10⁻⁷ M).
- Fig. 31** Curva de crecimiento del híbrido anti-ribotimidina en presencia de E₂ y DEE (2X10⁻⁷ M).
- Fig. 32** Curva dosis-respuesta para la secreción de IgG, del híbrido anti-dinitrofenol, expuesto a estrógenos (72h) (2X10⁻¹⁰ a 2X10⁻⁶ M).
- Fig. 33** Curva de crecimiento del híbrido anti-dinitrofenol, con una exposición (72h) a estrógenos (2X10⁻⁷ M).
- Fig. 34** Validación del ELISA indirecto para cuantificar IgG en el híbrido anti-lipoproteína-a, con un estándar.
- Fig. 35** Curva dosis-respuesta para la secreción de IgG, del híbrido anti-lipoproteína-a, exposición a E₂ (72h) (2X10⁻¹⁰ a 2X10⁻⁶ M).
- Fig. 36** Curva de crecimiento del híbrido anti-lipoproteína-a, exposición a E₂ (72h). (2X10⁻⁷ M).

TABLA I EFECTO DEL TRATAMIENTO *IN VIVO* CON DEE (72h), SOBRE EL NUMERO DE CELULAS SECRETORAS DE INMUNOGLOBULINAS IgM E IgG ANTI-H37Rv.

TABLA II EFECTO DEL E₂ SOBRE LA SECRECION DE IgG DEL HIBRIDOMA MMTBD6.

Fotografía 1 Células de la línea tumoral J774A.1 en condiciones de cultivo (400X).

Fotografía 2 Células de la línea tumoral J774A.1 NBT positivas (400X).

- Fotografía 3** Inmunopunto de célula secretora de inmunoglobulina específica (100X).
Fotografía 4 Inmunopunto de célula secretora de inmunoglobulina específica, de la fotografía 3 (400X).
Fotografía 5 Inmunopunto de célula secretora de inmunoglobulina específica (100X).
Fotografía 6 Inmunopunto de célula secretora de inmunoglobulina específica, de la fotografía 5 (400X).
Fotografía 7 Inmunopunto de célula secretora de inmunoglobulina específica (100X).
Fotografía 8 Inmunopunto de célula secretora de inmunoglobulina específica, de la fotografía 7 (400X).

I.-ANTECEDENTES

IMPORTANCIA DEL SISTEMA INMUNITARIO

Al sistema inmunitario se le reconoce un papel central en la prevención y curación de procesos infecciosos y neoplásicos, así como en la patogenia de enfermedades alérgicas y autoinmunes.

EL CONTROL DEL SISTEMA INMUNOLOGICO

Hasta hace poco tiempo se consideraba al sistema inmunológico como un sistema autónomo y autorregulado a través de una red de interacciones complejas. Sin embargo, en fechas recientes, ha empezado a reconocerse el papel que juega el sistema neuroendocrino, por medio de hormonas y neurotransmisores, en el control de la actividad inmunitaria, al demostrarse la influencia de estos mediadores bioquímicos en la respuesta inmune (Weigent, 1990).

La presencia de receptores específicos para neuropéptidos y hormonas estrogénicas, en la superficie de las células inmunocompetentes, ha sido demostrada por varios investigadores (Cohen y cols, 1983; Forsberg, 1984; Weusten y cols, 1986; Ranelletti, 1988; Wada, 1992). Por otra parte, se ha podido constatar que las sustancias producidas por las células del sistema inmunitario actúan sobre algunas estirpes celulares del sistema neuroendocrino (Blalock y Stanton, 1980; Blalock y Harp, 1981; Blalock y Smith, 1981; Dafny y Reyes-Vazquez, 1985).

Con todas estas observaciones se ha llegado a la conclusión de que ambos sistemas, el inmunitario y el neuroendócrino pueden interactuar, pero aún se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en dichos fenómenos.

EL PAPEL CENTRAL DEL MACROFAGO

Una de las células más importantes del sistema inmune es el macrófago, el cual posee una gran versatilidad en sus respuestas. Es una célula que produce un gran número de sustancias, entre estas; hormonas polipéptidicas, componentes del complemento, factores de la coagulación, enzimas, inhibidores de enzimas, proteínas de la matriz extracelular, proteínas acarreadoras, lípidos bioactivos, hormonas de tipo esteroide, e intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno. (Nathan, 1987).

Los macrófagos son células que entran primero en contacto con los antígenos, los fagocitan, los procesan y exponen fragmentos de los mismos (9 residuos de aminoácidos), en su membrana junto con moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHCII), que posteriormente son presentados a los linfocitos T cooperadores, desencadenándose toda una cascada de eventos que a su vez producirán reacciones celulares, citotóxicas y humorales como la producción de anticuerpos, que darán como resultado todas ellas la eliminación del antígeno que originó la respuesta (Male, 1987).

Además de estas acciones, el macrófago reconoce y elimina las células neoplásicas, mediante la producción de sustancias citotóxicas para las células tumorales, como lo es el factor de necrosis tumoral TNF α y β , y el grupo de proteínas llamadas interferones α , β , y γ (Müller, 1989).

II.- LOS EFECTOS DE LOS ESTROGENOS EN EL SISTEMA INMUNE.

Se han realizado estudios sobre los efectos de la administración de varias hormonas (estrógenos y glucocorticoides), midiendo diversos parámetros de la respuesta inmune como los efectos en la redistribución de: linfocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos; en la hipersensibilidad retardada, en la citotoxicidad mediada por anticuerpos, su mitogenicidad, en la actividad fagocítica, y

en la quimiotaxis. Además estudiaron los efectos sobre los factores humorales involucrados en la respuesta inmune (Parrillo y Fauci, 1979), los cambios en el patrón de leucocitos circulantes, en la respuesta a mitógenos, en los cambios en los niveles sanguíneos de anticuerpos circulantes, y en la producción *in vitro* de inmunoglobulinas (Cupps y Fauci, 1982 y 1985; Descotes, 1986).

A.- EN LOS MACROFAGOS

La administración de estrógenos *in vivo* produce consistentemente estimulación de la actividad fagocitaria del sistema reticulo-endotelial, medida por la depuración plasmática de carbón coloidal, aclaramiento plasmático de endotoxinas bacterianas, de lípidos marcados con radioisótopos y por eritrofagocitosis (Nicol, 1964; Trejo, 1972; Warr, 1973; Loose, 1976; Boorman, 1980; Descotes, 1986).

B.- EN LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS

Los estrógenos administrados a animales han producido resultados inconsistentes en cuanto a la modulación de la producción de anticuerpos. Se han observado aumentos en las concentraciones de anticuerpos específicos en el suero durante la respuesta primaria (Rao, 1972), y disminuciones (Toivanen, 1967) o aumentos en la respuesta secundaria (Thanavala, 1973), en las concentraciones de anticuerpos séricos.

En cuanto al número de células productoras de anticuerpos se han observado resultados igualmente inconsistentes con la administración de estrógenos tanto *in vivo* como *in vitro*. Se han encontrado disminuciones en unos casos (Sijivic, 1974; Ezaki, 1982; Luster, 1980), y aumentos en otros (Kenny, 1976; Paavonen, 1981), en el número de células productoras de anticuerpos.

C.- EN LAS CELULAS ASESINAS NATURALES

Otros componentes del sistema inmunológico que son afectados por la administración de estrógenos son las células asesinas naturales. Estas células realizan la llamada vigilancia inmunológica y llevan a cabo la eliminación de células neoplásicas, preferentemente de las de reciente aparición, evitando el desarrollo de tumores en su fase inicial. Los resultados obtenidos muestran consistentemente una disminución de la actividad citotóxica de estas células con la administración *in vivo* de estrógenos, fenómeno que no ha sido reproducido *in vitro* (Seaman, 1978; Onsrud, 1982).

III.- HIPOTESIS DE TRABAJO

Los efectos observados por diversos autores en el sistema inmunitario con la administración de estrógenos (E_2 , E_3 o DEE), no muestran patrones coherentes, por lo que no ha sido posible esbozar cuáles son las acciones fisiológicas de las hormonas estrogénicas en este sistema.

La comparación de las acciones *in vivo* e *in vitro* de los estrógenos en el sistema inmune, permitirían distinguir las acciones directas de las indirectas, y con ello contribuir a la mejor comprensión de la función reguladora de estas hormonas.

Al estudiar una estirpe celular expuesta *in vitro* a concentraciones fisiológicas de una hormona, se podrán observar probablemente las acciones directas fisiológicas de esa hormona.

IV.-METAS

- 1) Estudiar el efecto del DEE administrado *in vivo* en el ratón, sobre la actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales residentes de ratón.
- 2) Estudiar las acciones del E_2 y DEE *in vitro*, en la actividad fagocitaria, de macrófagos peritoneales residentes.
- 3) Estudiar las acciones de E_2 y DEE administrados *in vitro* sobre la actividad fagocitaria de macrófagos de la línea celular J774A.1.(T1B67 ATCC)

4) Estudiar en sangre venosa, las acciones del E_2 y DEE administrados *in vivo* sobre la producción de anticuerpos.

5) Estudiar las acciones de la administración *in vivo* del DEE, en el número de clonas secretoras de inmunoglobulinas IgM e IgG.

6) Estudiar el efecto directo de la exposición a estrógenos, en células B tumorales (hibridomas), en la secreción de anticuerpos.

IV.- MATERIAL Y METODOS

1.- Actividad fagocitaria

Existen varios métodos para valorar la actividad fagocitaria *in vitro* que se agrupan en dos tipos principales;

A) Los que se basan en la ingestión de partículas o células sin marca, o con marca no isotópica (Weisman, 1967; Kurlander, 1981):

partículas de látex, zimosan opsonizado, bacterias (simples o fluorescencinadas) y eritrocitos solos u opsonizados.

B) Los que se basan en la ingestión de partículas (lípidos marcados con ^{131}I), o células marcadas con radiosotopos (^{51}Cr).

Las técnicas que no usan marca radioactiva presentan diversos inconvenientes: son procedimientos muy laboriosos, lo que imposibilita procesar un número grande de muestras y requieren además de largo tiempo para su interpretación, ya que hay que realizar muchas observaciones microscópicas. Además la valoración tiene un componente subjetivo alto, debido a que el observador aún al experimentado, le es difícil discernir entre las células o partículas que fueron fagocitadas y las que se encuentran adheridas a la superficie externa de la membrana celular.

En las técnicas basadas en la cuantificación de células o partículas con marca radioactiva, aunque su sensibilidad es muy alta, requieren de reactivos y equipo de alto costo, y por tanto poco accesibles a cualquier laboratorio de investigación, además el manejo de estas técnicas conlleva riesgos para la salud del experimentador.

a) Evaluación *in vitro* de la actividad fagocitaria en macrófagos peritoneales residentes de ratón, mediante ensayos colorimétricos.

i) Evaluación *in vitro* del efecto en la actividad fagocitaria, del tratamiento *in vivo*.

Los siguientes experimentos se llevaron a cabo utilizando la técnica colorimétrica de la reducción del azul de tetrazolio (NBT) (RooK, 1985).

Este método fué originalmente descrito para el diagnóstico de la deficiencia en la actividad microbicida de los leucocitos polimorfonucleares (Bahener, 1968; Nathan, 1969). Las bases bioquímicas para la reducción del azul de tetrazolio, fueron reportadas (Bahener, 1976), demostrándose que el anión superóxido formado durante el evento fagocitario era el causante de la reducción de este colorante (Babior, 1973).

La generación del anión ocurre en forma semejante en macrófagos durante la fagocitosis, lo cual fué reportado y evaluado en una modificación al método original (Murray, 1980), y reproducido por otros autores (Brett, 1988; Muller, 1989).

Se hicieron 2 lotes (de 4 ratones macho Balb/c cada uno), por estratos balanceados, con pesos entre 20 y 30g. Se les administró el disolvente (aceite de maíz), o el DEE disuelto en aceite, 6 mg/Kg/día, durante 3 días por vía subcutánea. Al cuarto día se sacrificaron y se les inyectó en la cavidad peritoneal 10 ml de solución balanceada de Hank a 5° C con 50 U/ml de heparina, se les extrajo el líquido administrado y se hizo un pool de las células residentes de la cavidad peritoneal con cada lote de animales. Se lavaron 2 veces con solución de Hank centrifugando a 300Xg durante 10 min. Se resuspendieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM), complementado con suero bovino fetal 10% (SBF), se contaron las células y se evaluó la viabilidad mediante la exclusión de azul tripan.

Se sembraron 2×10^6 células/pozo en placas de 96 pozos estériles (Nunc), se dejaron adherir durante 2 hrs, después de este tiempo se substituyó el medio de cultivo por una mezcla de partículas de ZymosanA/azul de tetrazolio (NBT, Sigma), cada uno en concentración de 1 mg/ml (incubadas

previamente durante 90 minutos en agitación constante a 37°C). Se incubaron las células con la suspensión de partículas/NBT durante 60 min a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se lavaron los pozos 3 veces con metanol al 70% y se secaron al aire, se agregó a cada pozo 120µl de hidróxido de potasio 2M, se incubaron a temperatura ambiente durante 90 min. Enseguida se agregó a cada pozo 140µl de dimetilsulfóxido (DMSO) y se agitó vigorosamente la placa, se hicieron las lecturas colorimétricas en un lector de microplacas Biotek el311 a una longitud de onda de 630 nm.

ii) Evaluación de la actividad fagocitaria con el tratamiento *in vitro* de las células residentes de la cavidad peritoneal.

Se obtuvieron las células en la forma descrita en el inciso anterior, de un pool de 4 ratones machos de la misma cepa. Se sembraron 2X10⁵ células/pozo y se incubaron durante 24 h a concentraciones crecientes en progresión geométrica de E₂ o DEE (disueltos en etanol), como pozos control se utilizó el disolvente (etanol absoluto). Se utilizó el mismo método para evaluar la actividad fagocitaria, y se analizaron en la misma forma los resultados.

b) Evaluación *in vitro* de la actividad fagocitaria de macrófagos de la línea celular J774A.1, mediante ensayos de la ingestión de partículas de látex.

Nuestros ensayos iniciales fueron desarrollados mediante la ingestión de partículas de látex (Weisman, 1967), intentando obtener un método confiable y reproducible, en el que se pudieran procesar un número grande de muestras.

Para estudiar la acción de los estrógenos se hicieron 2 lotes, cada uno de 3 ratones macho Balb/c de 20 a 30g de peso, se trataron con el disolvente (aceite de maíz), o con el disolvente más DEE (Merck) 6 mg/kg durante 3 días por vía s.c. (0.1 ml/10 g de peso). Al 4^o día se obtuvieron

muestras de sangre por punción cardíaca, se obtuvo el plasma mediante centrifugación, se hizo un pool de los sueros de los animales de cada lote.

Para estos experimentos se utilizaron células de la línea celular J774A.1 (ATCC TIB 67), de macrófagos murinos.

Se crecieron las células en condiciones de cultivo (37°C, en ambiente húmedo con 5% de CO₂), en botellas estériles de poliestireno de 25 cm² (Nunc), en medio de cultivo D-MEM, complementado con 10% de reemplazo de suero de proceso controlado tipo 1 inactivado con calor (CPSR-1 heat inactivated, Sigma), el cual contiene la mínima cantidad de colesterol, triglicéridos y hormonas esteroides.

Se esterilizaron en autoclave previamente cubre objetos redondos de 12 mm de diámetro, que se colocaron en los pozos antes de sembrar las células. Estas fueron transferidas a las placas de cultivo de 24 pozos (Nunc), las cuales contenían los cubreobjetos.

La viabilidad fué estimada previamente mediante la exclusión de azul tripan. Se sembraron 1X10⁵ células/pozo, después que la células se adhirieron a los cubreobjetos (2 h), el medio de cultivo fué reemplazado con medio libre de suero para macrófagos (1 ml) (Macrophage Serum Free Medium, MSFM Gibco). Enseguida se agregaron a los pozos 100 µl del suero de uno u otro tratamiento, se llevó a cabo la incubación a dos tiempos, uno de 30 minutos y el otro de 18 h. Se utilizaron como pozos control, células incubadas en presencia de suero bovino fetal inactivado por calor (Sigma).

Al término de éste período se agregaron a los pozos con los diferentes tratamientos, 1X10⁷ partículas/pozo, de látex de 0.8µ de diámetro (Sigma) y se incubaron durante un lapso de 30 minutos, al término de los cuales, se lavaron las células con amortiguador de fosfato-salina pH 7.4 (PBS) 5 veces para eliminar el exceso de partículas no fagocitadas.

Se retiraron los cubreobjetos redondos de los pozos en los cuales se habían colocado previamente, inmediatamente se fijaron con calor las células adheridas a los mismos y se tñieron con Giemsa. Posteriormente se colocaron los cubreobjetos en portaobjetos y se sellaron con barniz de uñas, se observaron en un microscopio en el objetivo de inmersión (1000X). Se contaron en 200 células (incubación de 30 min) y en 50 células (incubación de 18 h), el número de partículas de látex fagocitadas por célula.

c) Evaluación de la actividad fagocitaria de macrófagos de la línea celular J774A.1, mediante cuentas del número de células NBT positivas.

Debido a que inicialmente tuvimos problemas para poder solubilizar el producto del colorante (formazán de NBT), se obtuvieron los resultados mediante cuentas de los porcentajes de células NBT positivas (Breit, 1988).

Se utilizaron las células de la línea celular J774A.1, las cuales se crecieron en las mismas condiciones señaladas en el inciso 1 b).

Para estudiar la acción directa *in vitro* de los estrógenos en estas células aproximadamente 5×10^5 células viables fueron sembradas por pozo. Después que la células se adherieron a los pozos, el medio de cultivo fué reemplazado con medio libre de suero para macrófagos (MSFM Gibco). Estradiol-17 β (E₂ Syntex), o dietiltilbestrol (DEE, Merck) fueron disueltos en etanol absoluto (Merck), se aplicó cada tratamiento a cuatro pozos, diluciones apropiadas de los estrógenos en etanol fueron agregadas a los pozos correspondientes, la concentración final de etanol fué del 0.5%, los pozos control de disolvente recibieron la misma concentración de etanol.

Las células fueron expuestas a los estrógenos por 3, 24 o 72 h en

concentraciones en el rango de 2×10^{-13} M a 64×10^{-8} M.

ESTIMACION DEL PORCENTAJE DE CELULAS NBT POSITIVAS.

Se retiró el medio de cultivo con los estrógenos o el disolvente y se sustituyó en cada pozo, con una alícuota de 500 μ l de la suspensión de partículas de Zymosan-A pretratadas con NBT (descrita en el inciso 1 a) y se continuó el período de incubación en condiciones de cultivo por 60 minutos. Posteriormente las células fueron lavadas 3 veces con PBS, para eliminar el exceso de partículas. El porcentaje de células NBT-positivas fué determinado en un microscopio invertido (400X), por el número de células conteniendo gránulos de NBT-formazán en el citoplasma.

Se llevaron a cabo ensayos en forma paralela con las mismas concentraciones de E₂ y DEE para estimar la viabilidad por exclusión de azul tripan.

2.- Anticuerpos séricos y número de clonas secretoras de inmunoglobulinas anti-H37Rv.

a) Niveles sanguíneos de IgG anti-H37Rv, en ratones tratados con estrógenos.

Para estudiar las acciones de los estrógenos en la producción de anticuerpos específicos, se emplearon y distribuyeron los animales (ratón macho Balb/c con pesos entre 20 y 30 g), en lotes por estratos balanceados. Se inmunizaron (día 0) con un extracto proteico del filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*, cepa H37Rv (Parra y cols., 1986), disuelto en PBS y emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (AIF), se administró en dosis única vía intraperitoneal (20 μ g), a cada ratón.

Al quinto o décimoséptimo día, posteriores a la inmunización se obtuvieron mediante punción del plexo venoso retroorbitario con un tubo capilar, muestras de sangre venosa, la cual se dejó coagular a

temperatura ambiente y se obtuvieron 40 μ l de suero, el cual se diluyó con PBS 1:50 inicialmente y se hicieron diluciones al doble, a partir de esta dilución inicial.

ELISA INDIRECTO

Se procedió a incubar los sueros durante 4h a temperatura ambiente en agitación suave, en placas de 96 pozos (Nunc Maxisorp) las cuales previamente se habían cubierto con el extracto que se utilizó para inmunizar a los animales, (disuelto en amortiguador de carbonatos pH 9.6 , 0.1M en frío durante toda la noche), luego se lavó la placa cinco veces con amortiguador de fosfato-salina-detergente T20 (Tween 20, 0.01 %; en PBS), para eliminar el exceso de antígeno), se utilizó albúmina bovina 1% fracción V (en amortiguador de carbonatos pH 9.6 , 0.1M), para "bloquear" los sitios no ocupados por el antígeno y evitar así reacciones falsas positivas, incubando durante toda la noche a 4° C, se volvió a lavar cinco veces con PBS-T20.

Acto seguido se agregó un anticuerpo de conejo (marcado con peroxidasa) anti IgG de ratón (titulado previamente para conocer la dilución de trabajo). Durante 1 h se incubó a temperatura ambiente, al término de este período se lavó con PBS-T20 cinco veces.

Se agregó una mezcla de ortofenilendiamina (Sigma)(cromógeno) 40 mg/100 ml y 150 μ L/100 ml de peróxido de hidrógeno al 30% (Merck)(sustrato), disueltos en amortiguador de citrato-fosfato, se detiene la reacción con ácido sulfúrico 2M 50 μ L/pozo y se leyó la placa en un lector de microplacas Biotek el311 a una longitud de 492 nm contra un filtro de referencia de 630 nm.

Se considera que la cantidad de color desarrollado en 30 minutos es proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en el sobrenadante.

b) Número de clonas secretoras de IgG anti-H37Rv, mediante inmunoensayo enzimático de placa en filtro (FIPA).

Se estudió el efecto del tratamiento *in vivo* con estrógenos sobre el número de células secretoras de anticuerpos IgG anti-H37Rv.

j) Tratamiento posterior a la inmunización.

Se inmunizaron ratones Balb/c machos (día 0), con el mismo extracto proteico de *M. tuberculosis* por la misma vía y en la misma dosis que en el inciso 2 a), se administraron los estrógenos (6 mg/kg/día vía subcutánea), o el disolvente (aceite de maíz), los 3 días posteriores a la inmunización (días 1, 2, y 3).

Al quinto día de la inmunización, se sacrificaron a los ratones y se les extrajo el bazo en condiciones asépticas, se transfirió a una caja de Petri estéril. Enseguida se procedió mediante inyecciones repetidas al órgano con D-MEM sin suero, a extraer las células. Estas fueron transferidas a un tubo estéril de 15 ml y se centrifugaron a 300Xg durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y se agregó amortiguador de lisis pH 7.6 (Cloruro de amonio al 0.9% , Trizma/HCl 0.17M), durante 2 min, al término de los cuales se agregó D-MEM hasta el borde del tubo y se centrifugó nuevamente a 300Xg durante 5 min, se lavaron las células 2 veces con medio de cultivo.

Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 ml de D-MEM complementado con SBF al 10%, se contaron en cámara de Neubauer y se evaluó la viabilidad con azul tripan.

Se colocaron en placas de 24 pozos (Nunc), filtros millipore 13 mm de diámetro y poro de 0.22 μ , estériles (autoclave 120 ° C 30 min) a los cuales se les incubó durante 2 h a 37 ° C, con 10 μ g del extracto proteico H37Rv en amortiguador de carbonatos 0.1M pH 9.6, bloqueados con albúmina bovina fracción V al 1% en el mismo amortiguador durante 2 h y lavadas posteriormente con PBS pH 7.2 estéril 10 veces. Se procedió a sembrar 2X10⁶ células/pozo en las placas.

Se incubaron las células durante 4 h sobre los filtros de nitrocelulosa, en condiciones de cultivo. Posteriormente se retiraron las células y se lavaron los filtros de los pozos con PBS estéril 10 veces, se agregó IgG de conejo (conjugado a peroxidasa), Fab específico (diluido 1:500) anti-IgG de ratón.

Se utilizaron como controles: negativos filtros sin el extracto proteico H37Rv (solo bloqueados) y como control positivo células del hibridoma murino MMTBD6 (productoras de anticuerpos IgG anti-*M. tuberculosis*).

Se agregó a los pozos 500 µl de diamminobenzidina (como cromóforo) y peróxido de hidrógeno (como sustrato), se dejó transcurrir la reacción y a los 30 min. se detuvo agregando 100 µl de H₂SO₄ 2N. Se observaron los inmunopuntos a 400X en campo claro habiendo hecho translúcido el filtro impregnándolo con aceite de inmersión.

ii) Tratamiento previo a la Inmunización.

Se administraron a ratones Balb/c machos los estrógenos (6 mg/kg/día vía subcutánea), o el disolvente los 3 días anteriores (días -3, -2, y -1), a la inmunización (día 0), con el extracto proteico de *M. tuberculosis*. Se procedió posteriormente en la misma forma que en el caso anterior, a la obtención de las células, a la realización del ensayo, el análisis de los resultados y su presentación.

c) Peso del bazo en ratones inmunizados y tratados con estrógenos.

Se estudió el efecto del tratamiento *in vivo* con estrógenos sobre el peso del bazo, en los mismos animales empleados en los experimentos del inciso anterior, en las mismas combinaciones de tratamiento e inmunización.

Al quinto día de la inmunización se extrajo el bazo en condiciones asépticas, se transfirió a una caja de Petri estéril previamente pesada, se pesó nuevamente la misma caja de Petri, pero ahora con el órgano y por

diferencia se estableció el peso del bazo, se comparó con los de los otros tratamientos.

l) Tratamiento posterior a la inmunización.

Se inmunizaron ratones Balb/c machos (día 0), con el mismo extracto proteico de *M. tuberculosis* por la misma vía y en la misma dosis que en el inciso 2 a), se administraron los estrógenos (6 mg/kg/día vía subcutánea), o el disolvente (aceite de maíz), los 3 días posteriores a la inmunización (días 1, 2, y 3).

ii) Tratamiento previo a la inmunización.

Se administraron a ratones Balb/c machos los estrógenos (6 mg/kg/día vía subcutánea), o el disolvente (aceite de maíz), los 3 días anteriores (días -3, -2, y -1), a la inmunización (día 0), con el extracto proteico de *M. tuberculosis*.

d) Número de clonas secretoras de IgM e IgG (respuesta primaria), anti-H37Rv mediante ensayo FIPA.

Se hizo el estudio en seis grupos cada uno de cuatro ratones Balb/c machos de 8 semanas de edad. Los ratones de los grupos 1, 2 y 3, recibieron adyuvante incompleto de Freund (AIF) y los grupos 4, 5 y 6, 20 µg de un extracto proteico de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) por vía intraperitoneal, en AIF. Los tres días siguientes los grupos 1 y 4 no recibieron tratamiento, los grupos 2 y 5 recibieron el disolvente (aceite de maíz), los grupos 3 y 6 recibieron DEE (Merck) 6 mg/kg/día por vía subcutánea disuelto en aceite de maíz.

Se obtuvieron los esplenocitos y se sembraron a una densidad de 1X10⁶ células/pozo, se dejaron en condiciones de cultivo durante 4 h sobre filtros de nitrocelulosa cubiertos y bloqueados con el extracto proteico de *M. tuberculosis*, todo esto en la forma descrita en el inciso 2 b) l).

Al término de éste período se retiraron las células mediante vigorosos lavados con amortiguador PBS-T20. Se determinó el número de clonas secretoras de anticuerpos

específicos como inmunopuntos, mediante el ensayo inmunoplaaca en filtro FIPA, (Möller y Borrebaeck, 1985). Las clonas positivas fueron detectadas mediante anticuerpos anti-IgM de ratón (específicos vs. cadena μ), desarrollados en cabra y anti-IgG de ratón (Fab específico), desarrollados en conejo; ambos conjugados con peroxidasa (Sigma). Los inmunopuntos fueron revelados y contados en la forma descrita en el inciso 2 b) i).

3. Cuantificación de la actividad secretora *in vitro* de 5 hibridomas de células B de ratón (secretores de IgG).

Se utilizaron las hibridomas de células B de ratón: MMD6TB (anti-*Mycobacterium tuberculosis*, y L7 (anti lipoproteína-a), facilitados por el Dr. Luis F. Montaña, Depto. Biología Celular, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, anti-actina y anti-ribotimidina facilitados por el Dr. Jesús Calderón, Depto. Biología Celular CINVESTAV, y 2C8 (anti-dinitrofenol), facilitado por el Dr. Enrique Ortega, Depto. Inmunología, Instituto de Investigaciones Bionómicas UNAM.

a) Hibridoma MMTBD6.

Se sembraron 2×10^4 células en placas de poliestireno (Nunc) de 96 pozos en presencia de concentraciones crecientes de E_2 (Syntex) o DEE (Merck) en el rango de 2×10^{-13} a 2×10^{-4} M, disueltos en etanol (Merck) 95%, la concentración final de etanol fué de 0.01%. Después de 72 h de exposición a los estrógenos, se utilizaron los sobrenadantes de las células para cuantificar la concentración de inmunoglobulinas anti-H37Rv, mediante ELISA indirecta (Engvall, 1980; Wakefield, 1982; Boerrigter, 1983; Layton, 1987), cada concentración fué ensayada por cuadruplicado.

En forma simultánea se hizo el mismo ensayo para evaluar la viabilidad mediante ensayo colorimétrico de la reducción de

MTT (Mosmann, 1983), agregando 20 μ l de una solución de MTT (5 mg/ml en PBS estéril), incubando 4 hr a 37°C, al término de los cuales se desecharon los sobrenadantes y se agregó una solución de isopropanol ácido (0.04 N/HCl en isopropanol), agitando vigorosamente para disolver los cristales de formazán del MTT, se leyeron las placas en un lector de microplacas Biotek el311 a 570 nm contra un filtro de referencia de 405 nm.

La cuantificación por ELISA se realizó cubriendo placas de 96 pozos de fondo plano (Nunc-Maxisorp) con 2 μ g de extracto proteico de filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv, en amortiguador de carbonatos (0.1M pH 9.6, 100 μ l), secadas con vacío (bloqueadas con gelatina DIFCO 0.1% en el mismo amortiguador de carbonatos 150 μ l, toda la noche a 4°C), lavadas con PBS-T20 5 veces, se agregaron 100 μ l del sobrenadante de cada pozo de los diferentes tratamientos. Se incubaron durante 4 h a 37°C en agitación, se lavaron 10 veces con PBS-T20, y se agregó un anticuerpo (IgG) de cabra anti-IgG de ratón (conjugado con peroxidasa) Fab específico, diluido 1:1500.

Después de 1 h de incubación se lavó 8 veces con PBS-T20 y se agregó 100 μ l/pozo de una mezcla de ortofenilendiamina (cromógeno) (Sigma)(40 mg/100 mL y 150 μ L/100 mL de peróxido de hidrógeno al 30% (sustrato)(Merck), disueltos en amortiguador de citrato-fosfato pH 5.4. Se detuvo la reacción con 50 μ l de $H_2S O_4$ 2M. Se leyó la placa en un lector de microplacas Biotek el 311 a una longitud de 492 nm contra un filtro de referencia de 630 nm. La cantidad de color desarrollado en 30 minutos fué proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en el sobrenadante.

El estandar de IgG de ratón fué purificado de suero de ratón Balb/c por medio de cromatografía de afinidad por columna de proteína A, la pureza del estandar fué evaluada por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, y la concentración de proteína determinada por el método de Bradford. Se cubrió una placa

en concentraciones de 100 pg a 2 µg/pozo, el estándar fué detectado por el mismo conjugado cabra-peroxidasa anti-IgG de ratón (Fab específico), diluido 1:1,500, que se utilizó para cuantificar los sobrenadantes.

Se utilizó el mismo cromógeno y sustrato que para el ELISA de los sobrenadantes, se compararon las absorbancias de la curva estándar con las de los sobrenadantes y así se obtuvieron las concentraciones de IgG en µg/ml, posteriormente se expresaron como un índice al relacionarlo con los controles respectivos.

b) Hibridomas anti-actina y anti-ribotimidina.

Se procedió en la misma forma que en el inciso 3 a), para evaluar la actividad secretora y la viabilidad. Se procedió a cuantificar las IgG totales en los sobrenadantes de los pozos con los diferentes tratamientos, debido a que no contábamos con antígeno puro para cubrir las placas, por lo que se cubrieron con anticuerpo IgG de cabra fragmento F(ab)₂ anti-IgG de ratón (Cappel) 2µg/pozo en la técnica habitual. Se usó para detectar la IgG de los sobrenadantes como segundo anticuerpo IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina, anti-IgG de ratón (molécula completa) (Sigma), y como sustrato paranitrofenilfosfato 10mM, dietanolamina 1M, MgCl₂ 0.25mM, en Tris/HCl 0.1M, NaCl 0.1M a pH 9.8. Se deluvo la reacción con 50 µl de NaOH 3N.

Se utilizó como estándar IgG de ratón grado reactivo (pureza PAGE/SDS≥ 95%) (Sigma), de acuerdo a la técnica descrita previamente.

Se leyó la placa en un lector de microplacas Biotek el311 a 405 nm contra un filtro de referencia de 630 nm.

c) Hibridoma anti-dinitrofenol.

Se procedió en la misma forma que en el inciso 3 a), para evaluar la actividad secretora y la viabilidad, (se extrajo el MTT-formazán con DMSO).

La cuantificación por ELISA se realizó cubriendo placas de 96 pozos de fondo plano (Nunc-Maxisorp) con 100 µl de albúmina bovina fracción V al 1% (en amortiguador de Tris/HCl 0.125 M pH 9.5) 2 h a 37°C, y uniéndola covalentemente a ácido tetranitrobenzensulfónico (Eastman, Kodak) 100 µl/pozo 1 mM (en amortiguador de boratos) 1 h 37°C. Se agregaron los sobrenadantes de los pozos de las células del hibridoma, expuestas a los diferentes tratamientos. Se incubaron durante 4 h a temperatura ambiente, se lavaron 10 veces con PBS-T20, y se agregó un anticuerpo (IgG) de cabra (conjugado con peroxidasa), anti-IgG de ratón (Fab específico), diluido 1:1500. Se revelaron con el cromógeno, el sustrato y en la forma descrita en el inciso 3 a).

d) Hibridoma anti-lipoproteína-a (L7).

Se procedió en la misma forma que en el inciso 3 a), para evaluar la actividad secretora y la viabilidad (se extrajo el MTT-formazán con DMSO).

Se utilizó como estándar IgG de ratón grado reactivo (pureza PAGE/SDS≥ 90%) (Sigma). Se hizo una curva cubriendo placas de poliestireno maxisorp (Nunc) con 0.150 a 2.5 µg/pozo en amortiguador de carbonatos, bloqueando con albúmina bovina y detectando con anticuerpo de cabra (conjugado a peroxidasa) anti-IgG de ratón (Fab específico), diluido 1:1500.

La cuantificación por ELISA se realizó cubriendo placas de 96 pozos de fondo plano (Nunc-Maxisorp) con 2 µg de Lipoproteína-a, en amortiguador de carbonatos, incubando toda la noche a 4°C, se bloquearon con albúmina bovina fracción V 1% en el mismo amortiguador de carbonatos.

Se cuantificaron en los sobrenadantes de las células la cantidad de inmunoglobulinas, cada tratamiento fué ensayado por cuadruplicado. Se detectaron las inmunoglobulinas con el mismo

anticuerpo que el estandar. Se revelaron con el cromógeno, el sustrato y en la forma descrita en el inciso 3 a).

Análisis estadístico

Se utilizó para el análisis estadístico de los resultados la prueba de t de Student cuando se compararon dos grupo de datos con varianzas homogéneas (según la prueba de F de Fisher); Cuando las varianzas fueron heterogéneas, se empleó la prueba de Mann-Whitney. Cuando se comparó un grupo testigo con varios grupos tratados, se empleó la prueba de Dunnett. En el caso en que las distribuciones discrepaban significativamente de una distribución normal, se empleó la prueba de Kruskal- Wallis. El programa usado para

efectuar estas pruebas fue el de SigmaStat F.W. V 1.0 de Jandel Scientific para computadora personal. Para la comparación de cuentas con distribución de Poisson, se empleó la prueba bilateral correspondiente (Zar). Las regresiones fueron estimadas por método de los mínimos cuadrados, se calcularon los análisis de varianza correspondientes así como los límites de confianza al 95% La fuerza de asociación lineal entre las poblaciones (estimación de ρ^2) fué estimada de acuerdo a la ecuación de Hayes (Hayes). Para elaborar las gráficas se empleó el programa para computadora personal SigmaPlot F.W. V 2.01 de Jandel Scientific.

VI.- RESULTADOS

1.- Efecto de Estrógenos en la Actividad Fagocitaria *in vitro*.

Se observó estimulación por el tratamiento *in vivo* de ratones tratados con DEE, en la actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales residentes (Fig. 1). En contraste el tratamiento *in vitro* con DEE de la misma estirpe celular, tuvo un efecto depresor en todo el rango de concentraciones estudiadas (Fig. 2), No hubo diferencias estadísticamente significativa entre el E₂ y el DEE.

a) Actividad fagocitaria medida con método colorimétrico

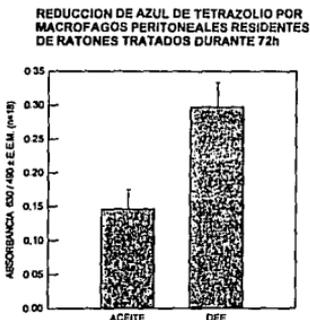


Fig.1. Actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales residentes de ratones tratados con aceite de maíz (disolvente) o con DEE durante 72 h (Δ mediana 104%, $P=0.0001$, t student).

REDUCCION DE AZUL DE TETRAZOLIO POR MACROFAGOS PERITONEALES RESIDENTES EXPOSTOS *IN VITRO* A DEE Y E₂ (24h)

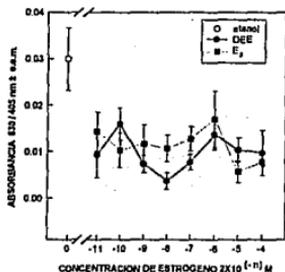


Fig.2. Actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales residentes de ratón, expuestos *in vitro* a etanol (disolvente), E₂ o DEE durante 24h.

La exposición *in vitro* de macrófagos peritoneales residentes de ratón, a DEE disminuye la actividad fagocitaria (73.3% $p<0.05$, Dunnett). El efecto depresor fue semejante para todo el rango de concentraciones estudiadas (no dosis-dependiente). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre E₂ y el disolvente o E₂ y DEE.

b) Actividad fagocitaria medida por el número de partículas fagocitadas

Se comparó el número de partículas de látex fagocitadas por macrófagos de la línea J774A.1 expuestos durante 18 h (figuras 3 y 4) o durante 30 min (figuras 5 y 6) al suero de ratones tratados con DEE o el disolvente (aceite de maíz). No se observaron diferencias significativas entre las medianas de los grupos, los cuales no presentaron una distribución normal, por lo que se elaboraron polígonos de frecuencias con el objeto de intentar observar un posible desplazamiento de los polígonos, en cuanto a los rangos del número de partículas fagocitadas, pero tampoco se observaron diferencias importantes.

EFFECTO DEL SUERO DE ANIMALES TRATADOS *IN VIVO* EN LOS MACROFAGOS MURINOS DE LA LINEA J774A.1 EXPUESTOS 18h.

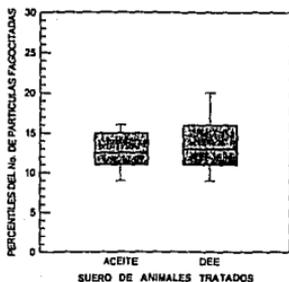


Fig.3

Se muestra el número de partículas fagocitadas que corresponden a los percentiles 5, 25, 50, 75 y 95 para cada grupo (n=50).

EFFECTO DEL SUERO (18h) DE ANIMALES TRATADOS EN LA FAGOCITOSIS DE LATEX POR CELULAS DE LA LINEA J774A.1 DE MACROFAGOS MURINOS

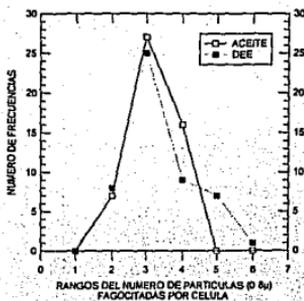


Fig. 4. Polígonos de frecuencias correspondientes a la Fig. 3. Rangos: 1(0 a 4), 2(5 a 9), 3(10 a 14), 4(15 a 19), 5(20 a 24) y 6(25 a 29).

EFFECTO DEL SUERO DE ANIMALES TRATADOS *IN VIVO* EN LOS MACROFAGOS MURINOS DE LA LINEA J774A.1 EXPUESTOS 30 min.

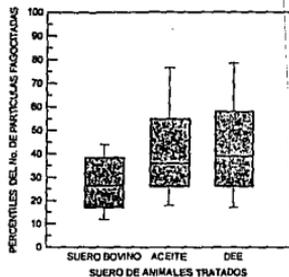


Fig.5. Se muestra el número de partículas fagocitadas que corresponden a los percentiles 5, 25, 50, 75 y 95 para cada grupo (n=200).

EFFECTO DEL SUERO (30min) DE ANIMALES TRATADOS EN LA FAGOCITOSIS DE LATEX POR CELULAS DE LA LINEA J774A.1 DE MACROFAGOS MURINOS

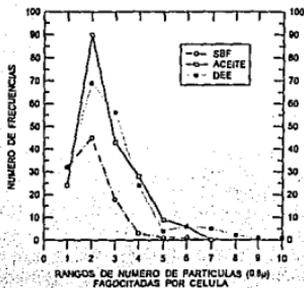


Fig. 6 Polígonos de frecuencias correspondientes a la Fig. 5. Rangos: 1(0 a 19), 2(20 a 39), 3(40 a 59), 4(60 a 79), 5(80 a 99) y 6(100 a 119), 7(120 a 139), 8(140 a 159), 9(160 a 179), 10(180 a 199) (n=200 por grupo).

Las células expuestas durante 30 min a suero de ratones tratados con aceite o DEE en aceite, presentaron actividad fagocitaria significativamente mayor (Δ mediana de 35.8 y 47.1% respectivamente; $p < 0.0001$ Kruskal-Wallis), que las células tratadas con suero bovino fetal.

c) Número de células NBT positivas

Los experimentos para cada estrógeno y cada rango de concentraciones, fueron corridos separadamente y se graficaron juntos, esto explica las diferencias en los valores control en cada una de las gráficas.

La exposición de las células a E_2 o DEE a concentraciones de 2×10^{-13} M a 2×10^{-9} M durante 3h, no afectó el porcentaje de células NBT-positivas (datos no mostrados). Los efectos de exposiciones más prolongadas (24h), se muestran en la Fig.7. A la concentración de 2×10^{-13} M (la concentración más pequeña estudiada) se incrementó el porcentaje de células NBT-positivas, hasta en 150% ($p < 0.01$) con E_2 y 405% ($p < 0.01$) con DEE. Los efectos de esta concentración y de concentraciones 10, 100 y 1000 veces mayores, no difirieron significativamente entre sí ($p = 0.84$ para E_2 y $p = 0.93$ para DEE).

CURVA DOSIS-RESPUESTA REDUCCION DE NBT POR CELULAS DE LA LINEA J774A.1, EXPUESTAS 24h A ESTROGENOS.

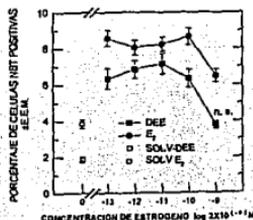


Fig. 7. Excepto donde se indica con n.s., las diferencias con respecto a los valores control fueron significativas ($p < 0.01$) ($n = 8 \times 10^3$ células por concentración).

Con concentraciones mayores (de 2×10^{-9} M a 2×10^{-5} M), exposiciones también durante 24h, los porcentajes de células NBT-positivas disminuyeron linealmente hacia los respectivos valores control, con incrementos logarítmicos en las concentraciones de estrógenos (Fig. 8); para E_2 , est. $\rho^2 = 0.76$, componente lineal $p < 5 \times 10^{-4}$, componente no lineal n.s.; para DEE, est. $\rho^2 = 0.93$, componente lineal $p < 5 \times 10^{-4}$, componente no lineal n.s.

CURVA DOSIS-RESPUESTA REDUCCION DE NBT POR CELULAS DE LA LINEA J774A.1 EXPUESTAS 24h A ESTROGENOS

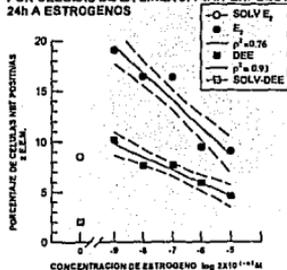


Fig. 8. Se muestra el comportamiento lineal que siguen las células conforme al incremento logarítmico de las concentraciones de estrógenos, hacia los valores control ($n = 8 \times 10^3$ células por concentración).

Con concentraciones aún mayores (de 2×10^{-4} M a 64×10^{-6} M), los porcentajes de células NBT-positivas continuaron disminuyendo linealmente con incrementos logarítmicos en las concentraciones de estrógenos hasta valores menores a los de las células control, (Fig. 9); para E_2 est. $\rho^2 = 0.94$, componente lineal $p < 1 \times 10^{-4}$, componente no lineal n.s.; para DEE est. $\rho^2 = 0.72$, componente lineal $p < 2 \times 10^{-4}$, componente no lineal n.s.

CURVA DOSIS-RESPUESTA REDUCCION DE NBT
 POR CELULAS DE LA LINEA J774A.1 EXPUESTAS
 24h A ESTROGENOS

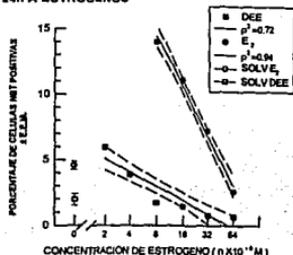


Fig. 9. Comportamiento concentración-de-
 pendiente con incrementos logarítmicos de
 las concentraciones de estrógenos hacia y
 por abajo de los valores control ($n= 8 \times 10^3$
 células por concentración).

Exposiciones durante un tiempo más pro-
 longado (72h) a concentraciones de DEE
 semejantes a las de la Fig. 9, disminuyeron
 linealmente los porcentajes de células NBT-
 positivas a valores menores al del valor
 control (Fig. 10), con aumentos logarítmicos
 en las concentraciones de DEE; est. $\rho^2 =$
 0.57 , componente lineal $p < 6 \times 10^{-7}$, compo-
 nente no lineal n.s.

CURVA DOSIS-RESPUESTA REDUCCION DE NBT
 POR CELULAS DE LA LINEA J774A.1 EXPUESTAS
 72h A ESTROGENOS

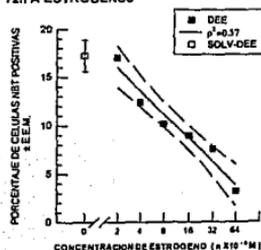


Fig.10. Efectos de la exposición a DEE du-
 rante 72h continúan presentando las células
 un comportamiento concentración-depen-
 diente, pero ahora por debajo del valor control
 ($n= 8 \times 10^3$ células por concentración).

2.- Producción de anticuerpos.

a). Efecto del tratamiento con estrógenos en los niveles sanguíneos de IgG anti-H37Rv.

Se estudió el efecto de la administración de estrógenos (durante 3 días), en la fase primaria de la respuesta inmune del ratón, inmunizando (día 0), con el extracto proteico de *Mycobacterium tuberculosis*. Se evaluó la respuesta midiendo mediante ELISA indirecto, los anticuerpos IgG anti-H37Rv en el suero, los días 5 (Fig. 11) y 17 (Fig. 12), posteriores a la inmunización. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ni entre los tratamientos y el grupo control a ninguno de los dos tiempos estudiados.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON ESTRÓGENOS EN LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS (IgG anti-H37Rv) DIA 5to. POSTERIOR A LA INMUNIZACIÓN.

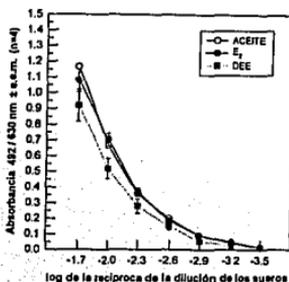


Fig. 11. ELISA indirecto para evaluar el efecto del tratamiento con E₂ y DEE (durante los días 1, 2 y 3), sobre la producción de anticuerpos IgG anti-H37Rv (fase primaria), evaluada en el suero el día 5 posterior a la inmunización. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los sueros de ratones tratados y los de ratones testigos

EFFECTO DEL TRATAMIENTO IN VIVO POSTERIOR A LA INMUNIZACIÓN CON H37Rv, EN LOS NIVELES SERICOS DE IgG 17 DIAS DESPUES DE INMUNIZAR

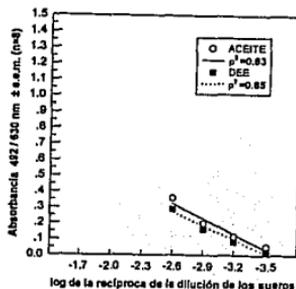


Fig. 12. ELISA indirecto para evaluar el efecto del tratamiento con DEE (durante los días 1, 2 y 3), sobre la producción de anticuerpos IgG anti-H37Rv (fase primaria), evaluada en el suero el día 17 posterior a la inmunización. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes de las regresiones lineales de los sueros de ratones tratados y los de ratones testigos.

b). Efecto de dos combinaciones de tratamiento con estrógenos e inmunización en el número de clonas secretoras de IgG anti-H37Rv.

Se estudió el efecto del tratamiento con estrógenos en ratones (durante 3 días), posterior o previo a la inmunización (día 0), con el extracto proteico de *Mycobacterium tuberculosis*, mediante ensayo inmunoenzimático de punto de filtro (FIPA), para cuantificar el número de células secretoras de anticuerpos IgG anti-H37Rv, con el objeto de tratar de correlacionar los resultados con los de los niveles sanguíneos circulantes de anticuerpos anti-H37Rv, para determinar si los niveles sanguíneos de anticuerpos, correspondían a incrementos en el número de células secretoras (si es que los estrógenos tienen efecto estimulante de la proliferación), o a incrementos en la secreción de los anticuerpos por estas

células (si es que los estrógenos tienen efectos intensificadores de la producción).

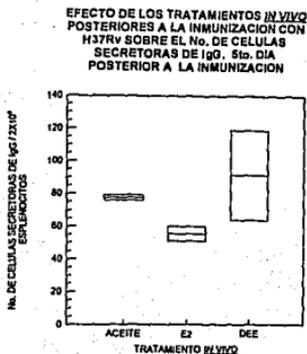


Fig. 13 Efecto del tratamiento con E_2 y DEE (durante los días 1, 2 y 3), sobre el número de células secretoras de IgG anti-H37Rv evaluado mediante ELISPOT, al 5º día posterior a la inmunización (día 0). El incremento de 18% en los animales tratados con DEE respecto al grupo control tratado con el disolvente, no fue estadísticamente significativo. Los esplenocitos provienen de los animales cuyos datos se presentaron en la figura 11 (n=4).

EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS *IN VIVO* PREVIOS A LA INMUNIZACION CON H37Rv SOBRE EL No. DE CELULAS SECRETORAS DE IgG. AL 5º DIA DE LA INMUNIZACION

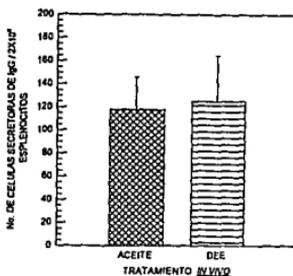


Fig. 14 Efecto del tratamiento con DEE (durante los días -3, -2 y -1), sobre el número de células secretoras de IgG anti-H37Rv al día 5º posterior a la inmunización. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (n=3).

c). Efecto de dos combinaciones de tratamiento con estrógenos e inmunización en el peso del bazo.

Se estudió el efecto de las combinaciones de tratamiento con estrógenos e inmunización con el extracto proteico de *Mycobacterium tuberculosis*, para tratar de identificar una posible correlación entre el número de células secretoras de inmunoglobulinas anti-H37Rv y el peso del órgano esplénico, al 5º día posterior a la inmunización, en los mismos animales. En ninguna de las dos combinaciones; de tratamiento posterior (Fig. 15), o previo (Fig. 16), a la inmunización, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO *IN VIVO* POSTERIOR A LA INMUNIZACION CON H37Rv EN EL PESO DEL BAZO AL 5to. DIA POSTERIOR A LA INMUNIZACION

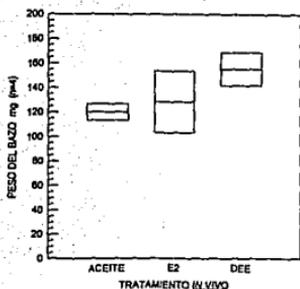


Fig. 15. Efecto del tratamiento con E₂ y DEE (durante los días 1, 2 y 3), sobre el peso del bazo al 5º día posterior a la inmunización. El incremento ponderal de 29% del grupo tratado con DEE con respecto al control no fue estadísticamente significativo (n=4).

EFFECTO DEL TRATAMIENTO *IN VIVO* PREVIO A LA INMUNIZACION CON H37Rv EN EL PESO DEL BAZO AL 5to. DIA POSTERIOR A LA INMUNIZACION

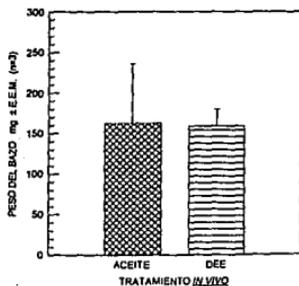


Fig. 16. Efecto del tratamiento con DEE (durante los días -3, -2 y -1), sobre el peso del bazo al 5º día posterior a la inmunización. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (n=3).

d). Efecto del tratamiento *in vivo* con DEE sobre el número de clonas secretoras de IgM e IgG anti-H37Rv.

Nuestros resultados preliminares que se presentan en la Tabla 1 y Fig. 17, muestran que en los grupos que no recibieron el antígeno (grupos 1, 2 y 3), con los diferentes tratamientos, el número de clonas secretoras de anticuerpos IgM e IgG fue semejante. En los grupos que recibieron el antígeno (grupos 4, 5 y 6), el número de clonas secretoras de anticuerpos IgM e IgG fue considerablemente mayor. No hubo diferencias significativas en el número de clonas secretoras de anticuerpos IgM con los diferentes tratamientos (grupos 1, 2 y 3), ni entre el número de clonas secretoras de IgG (grupos 4 y 5), tratados con antígeno o con antígeno y solvente. Comparado con el grupo tratado con el solvente (grupo 5), el número de clonas secretoras de IgG del grupo tratado con DEE (grupo 6) fue 2.8 veces mayor $p < 0.0002$ (2).

NUMERO DE CLONAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS IgM e IgG ANTI-H37Rv DETECTADAS AL 5º DIA MEDIANTE INMUNOENSAYO ENZIMATICO EN FILTRO.

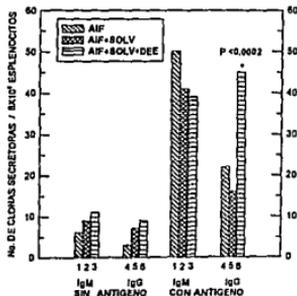


Fig. 17 Efecto del tratamiento *in vivo* con DEE (durante los días 1, 2 y 3), después de la administración de AIF, o de la inmunización con el extracto proteico de *Mycobacterium tuberculosis* en AIF, sobre el número de células secretoras de inmunoglobulinas IgM e IgG. Debido a que se comparan cuentas se utilizó la prueba de dos muestras con distribución de Poisson (n=4).

TABLA I

EFFECTO DEL TRATAMIENTO *IN VIVO* CON DEE SOBRE EL NUMERO DE CELULAS SECRETORAS DE INMUNOGLOBULINAS IgM e IgG ANTI-H37Rv.

DISEÑO EXPERIMENTAL

TRATAMIENTOS		GRUPOS					
	DIA	1	2	3	4	5	6
ANTIGENO	0				+	+	+
ADYUVANTE	0	+	+	+	+	+	+
DEE 6mg/kg/día	1,2 y 3			+			+
ACEITE DE MAIZ	1,2 y 3		+	+		+	+

RESULTADOS

		No. de clones positivas en 8×10^6 esplenocitos					
ISOTIPO IgM	CINCO	6	9	11	50	41	39
ISOTIPO IgG	CINCO	3	7	9	22	16	45*
* P<0.0002							

3.- Exposición *in vitro* a estrógenos, de 5 hibridomas de células B de ratón, secretoras de IgG.

Se estudió el efecto *in vitro* del E₂ o DEE, en la secreción de inmunoglobulinas, en la viabilidad celular y en el crecimiento.

a) Hibridoma MMTBD6.

Se estudió el crecimiento y la viabilidad celular de éste hibridoma en presencia del disolvente (etanol), y no se observó que fueran afectados (Fig. 18), posteriormente se establecieron las condiciones para cuantificar indirectamente las concentraciones de anticuerpos en los sobrenadantes de los cultivos con un estándar comercial (Fig.19), y posteriormente se estudió el efecto de los estrógenos en este hibridoma.

CURVA DE CRECIMIENTO DEL HIBRIDOMA MURINO MMTBD6

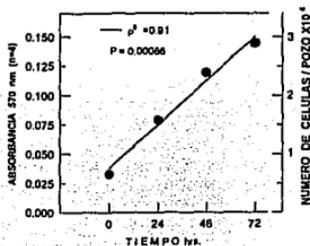


Fig. 18. El crecimiento de éste hibridoma en presencia de etanol, durante todo el período de estudio sigue una fase exponencial, se evaluó mediante la reducción del MTT. El disolvente no afecta el crecimiento.

CURVA ESTANDAR IgG DE RATON DETECTADA CON ELISA INDIRECTO

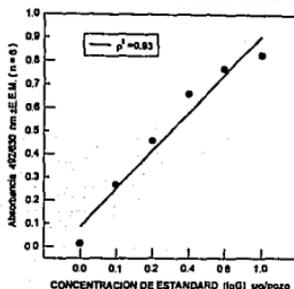


Fig. 19 Se estableció ésta curva estándar para calcular las concentraciones de las determinaciones de los sobrenadantes de los cultivos del hibridoma MMTBD6, e indirectamente cuantificar las concentraciones de los mismos.

Los efectos del E₂ sobre la secreción de inmunoglobulinas en el hibridoma MMTBD6 se presentan en la tabla II. El E₂ aumentó la secreción de IgG en forma concentración-dependiente. El efecto estimulante en el experimento 1, se observó con 2X10⁻¹⁰ M (Fig. 20), y fué hasta de 64% con 2X10⁻⁷ M.

CURVA DOSIS-RESPUESTA HIBRIDOMA MMTBD6 EXPUESTO 72h A E₂. EFECTO SOBRE LA SECRECION DE IgG.

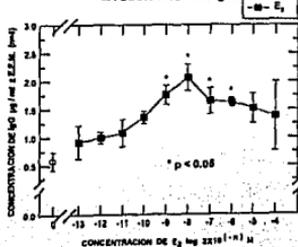


Fig. 20 Resultados del experimento 1, el ensayo se realizó por cuadruplicado, no se

muestra la curva con DEE, ya que no se observó diferencia estadísticamente significativa con respecto a su control de disolvente.

En el experimento 2 (Fig.21), el incremento máximo ocurrió a una concentración de E_2 más pequeña 2×10^{-8} M y fué de mayor magnitud (255%). Aumentos adicionales en las concentraciones de E_2 produjeron concentraciones de IgG progresivamente menores (Figs. 20, 21 y 22).

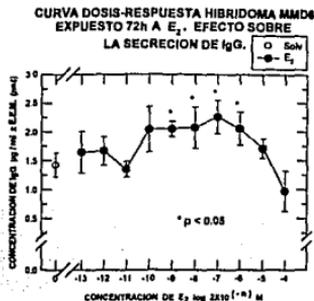


Fig. 21 Resultados del experimento 2, se realizó el ensayo por cuadruplicado, no se presenta la curva con DEE, ya que no se observó diferencia estadísticamente significativa con respecto a su control de disolvente.

Los resultados del tercer experimento, hecho por octuplicado (Fig. 22) se expresan como la razón entre el promedio de las concentraciones en los pozos expuestos a E_2 y el promedio de las concentraciones en los pozos control. Con E_2 a la concentración de 2×10^{-8} M la razón fue de 1.73 ($p < 0.05$). DEE adicionado a los cultivos en el rango de 2×10^{-8} a 2×10^{-7} M no incrementó la secreción de IgG.

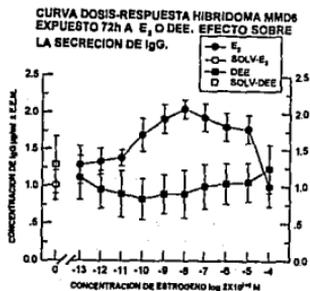


Fig. 22. Obtención del Índice de estimulación con E_2 al dividir la concentración obtenida de IgG para cada tratamiento con respecto a su control de disolvente ($n=8$).

TABLA II

EFEECTO DEL E₂ SOBRE LA SECRECION DE IgG DEL HIBRIDOMA MMTBD6

[E ₂]/L	EXPERIMENTO 1			EXPERIMENTO 2		
	[IgG] ±e.e.m.	Δ%*	P**	[IgG] ±e.e.m	Δ%*	P**
0	1.38 ± 0.32			0.58 ± 0.27		
2X10 ⁻¹² M	1.43 ± 0.21	4	ns	0.99 ± 0.10	71	ns
2X10 ⁻¹¹ M	1.35 ± 0.13	0	ns	1.03 ± 0.24	72	ns
2X10 ⁻¹⁰ M	2.04 ± 0.39	48	ns	1.36 ± 0.11	134	ns
2X10 ⁻⁹ M	2.05 ± 0.13	49	<0.05	1.75 ± 0.17	202	<0.05
2X10 ⁻⁸ M	2.07 ± 0.36	50	<0.05	2.06 ± 0.24	255	<0.05
2X10 ⁻⁷ M	2.26 ± 0.29	64	<0.05	1.66 ± 0.23	186	<0.05
2X10 ⁻⁶ M	2.12 ± 0.32	54	<0.05	1.64 ± 0.08	183	<0.05
2X10 ⁻⁵ M	1.67 ± 0.24	21	ns	1.51 ± 0.26	160	ns
2X10 ⁻⁴ M	0.97 ± 0.29	29	ns	1.01 ± 0.62	72	ns

n = 4

* diferencia porcentual con respecto al control

** DUNNETT vs. control

En los demás hibridomas estudiados; anti-actina (Fig. 24), anti-ribotimidina (Fig. 28), anti-dinitrofenol (Fig. 32) y anti-lipoproteína (Fig. 35), no se observó incremento en la secreción de anticuerpos, dentro del mismo rango de concentraciones de los estrógenos que produjeron efecto estimulante en el hibridoma MMTBD6. Tampoco se observó inhibición en la proliferación celular (Figs. 25-27, 29-31 y 33 excepto en el hibridoma L7, esta fue atribuible al efecto del disolvente (Fig. 36, $p < 0.001$, Dunnett).

b) Hibridomas anti-actina y anti-ribotimidina.

Se estableció un ELISA indirecto para poder cuantificar las IgG totales en los sobrenadantes de los cultivos de estos hibridomas (Fig. 23), al no poder contar con los antígenos para cuantificar los anticuerpos específicos.

CURVA ESTANDAR IgG DE RATON
DETECTADA CON ANTIGLOBULINA
CONJUGADA A FOSFATASA ALCALINA

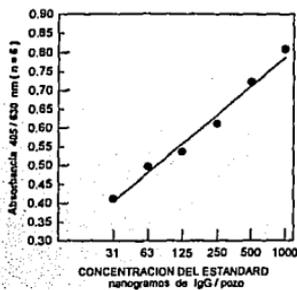


Fig. 23. Establecimiento de las condiciones de un ELISA indirecto tipo sandwich, para determinar la cantidad de IgG total en los sobrenadantes de los cultivos (n=6), de los hibridomas anti-actina y anti-ribotimidina, validación del sistema de medición.

HIBRIDOMA ANTI-ACTINA EXPUESTO
72h A E₂ O DEE
EFECTO SOBRE LA SECRECIÓN DE IgG

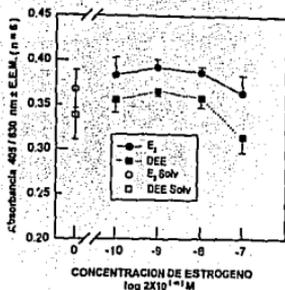


Fig. 24. Efecto de los estrógenos en la secreción de IgG *in vitro* en el rango de concentraciones que se observó efecto en el hibridoma MMTBD6, no se observaron diferencias significativas con respecto a sus controles.

HIBRIDOMA ANTI-ACTINA EXPUESTO 72h
A E₂ EFECTO EN EL CRECIMIENTO

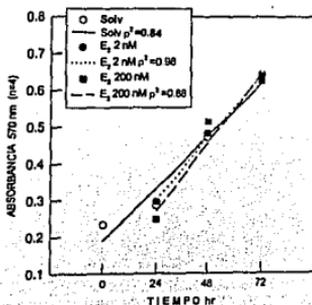


Fig. 25 Efecto de dos concentraciones de E₂ sobre el crecimiento de este hibridoma, no se observó diferencias significativas de los grupos tratados con respecto a el control de disolvente a los diferentes tiempos estudiados (n=4).

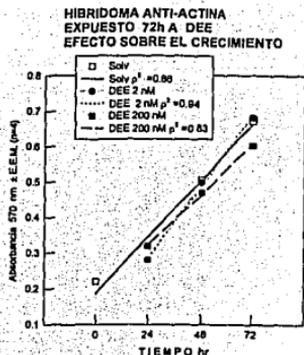


Fig. 26. Efecto de dos concentraciones de DEE sobre el crecimiento de éste hibridoma, no se observó diferencias significativas de los grupos tratados con respecto a el control de disolvente a los diferentes tiempos estudiados (n=4).

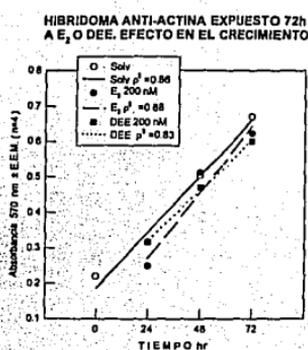


Fig. 27. Efecto de concentraciones altas de E₂ y DEE sobre el crecimiento de éste hibridoma, no se observó diferencias significativas de los grupos tratados con respecto a el control de disolvente a los diferentes tiempos estudiados (n=4).

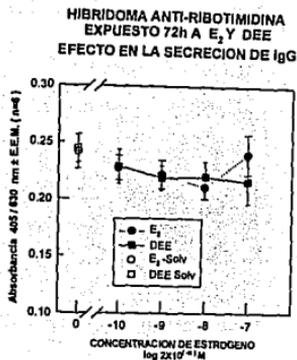


Fig. 28. Efecto de E₂ y DEE en el rango de concentraciones estimulante para el hibridoma MMTBD6 no se observaron diferencias significativas con respecto a los grupos control (n=6).

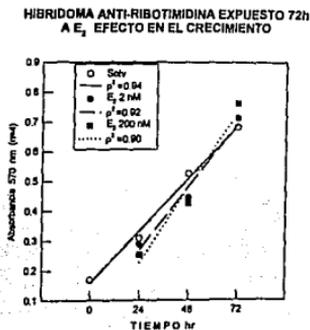


Fig. 29. Efecto del E₂ sobre el crecimiento de éste hibridoma a dos concentraciones, no se observaron diferencias significativas con respecto a la curva control de disolvente (n=4).

HIBRIDOMA ANTI-RIBOTIMIDINA EXPUESTO 72h
A DEE EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO

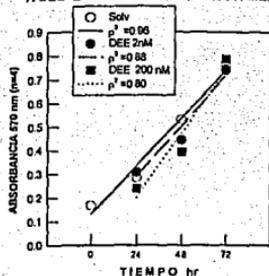


Fig. 30. Efecto del DEE sobre el crecimiento de éste hibridoma a dos concentraciones, no se observaron diferencias significativas con respecto a la curva control de disolvente (n=4).

HIBRIDOMA ANTI-RIBOTIMIDINA EXPUESTO 72h
A E₂ O DEE EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO

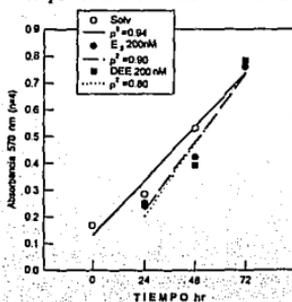


Fig. 31 Efecto del E₂ y DEE sobre el crecimiento de éste hibridoma, no se observaron diferencias significativas con respecto a la curva control de disolvente (n=4).

c) Hibridoma anti-dinitrofenol.

HIBRIDOMA 2C8 EXPUESTO 72h A E₂
O DEE. EFECTO EN LA SECRECIÓN
DE ANTICUERPOS ANTI-DNP (lgG)

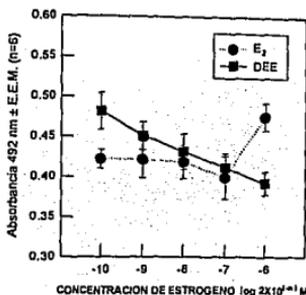


Fig. 32. Efecto de E₂ y DEE en la secreción de IgG por el hibridoma anti-DNP (2C8), en el rango de concentraciones estimulantes para el hibridoma MMTBD6, no se observaron diferencias significativas en los grupos tratados con respecto a los grupos control de disolvente (n=6).

HIBRIDOMA 2C8 EXPUESTO 72h
A E₂ O DEE.
EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO

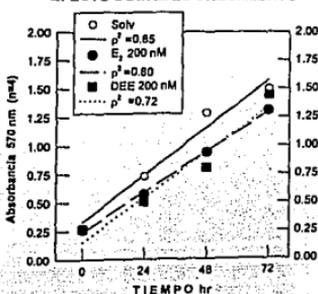


Fig. 33. Efecto de E₂ y DEE 2X10⁻⁷ M en el crecimiento del hibridoma 2C8, no se observaron diferencias significativas de ambos estrógenos con respecto a la curva de disolvente (n=4).

d) Hibridoma anti-lipoproteína-a

CURVA ESTANDAR IgG DE RATON
(ELISA INDIRECTO)

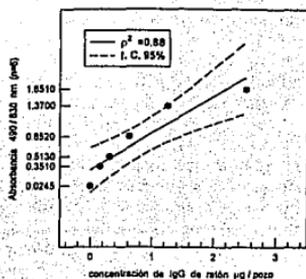


Fig. 34. Se estableció un ELISA tipo sandwich para cuantificar en los sobrenadantes del hibridoma L7 la IgG anti-lipoproteína-a; fijando a la fase sólida lipoproteína-a pura (PAGE/SDS), usando como estandar anticuerpo monoclonal anti-lipoproteína-a comercial y detectando con IgG de cabra-POD (Fab específica).anti-IgG de ratón (molécula completa).

lipoproteína-a), en el rango de concentraciones estimulante para el hibridoma MMTBD6, no se observaron diferencias significativas con respecto al grupo control de disolvente (n=6).

HIBRIDOMA MURINO ANTI-LIPOPROTEINA a
EXPUESTO 72h A E₂.
EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO

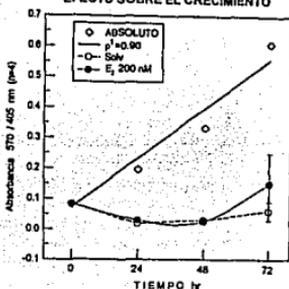


Fig. 36. Efecto del disolvente y E₂ 2X10⁻⁷ M sobre el crecimiento del hibridoma murino L7, comparado respecto al crecimiento espontáneo del mismo en ausencia de disolvente o estrógeno. Hubo diferencias estadísticamente significativas a las 24, 48 y 72h (p<0.005, Dunnett).

HIBRIDOMA MURINO ANTI-LIPOPROTEINA a
EXPUESTO 72h A E₂.
EFECTO EN LA SECRECIÓN DE IgG

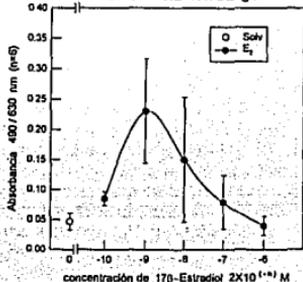


Fig. 35. Efecto del E₂ sobre la secreción de IgG *in vitro* por el hibridoma L7 (anti-

VII. DISCUSION

EFECTOS DE ESTROGENOS EN MACROFAGOS

1.- Macrófagos peritoneales residentes

A). Estimulación *in vivo* de la actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales residentes, provenientes de ratones tratados con DEE.

Hay numerosos reportes en la literatura de la estimulación de la actividad fagocitaria de macrófagos ("estimulación del sistema retículoendotelial"), por la administración de DEE y otros estrógenos. Han sido utilizados varios esquemas de administración de estrógenos (dosis únicas bajas o altas; diferentes dosis en forma repetida), además de diversos métodos; como son los de aclaramiento plasmático de carbón coloidal (Nicol, 1967; Warr, 1973), de lípidos marcados con radioisótopos ^{131}I (Trejo, 1972; Loose, 1976), de células y endotoxinas bacterianas marcadas con radioisótopos (^{67}Cr) (Trejo, 1972). **Nuestros resultados coinciden con los reportados en la literatura.** Nuestra aportación consiste en haber estudiado esta respuesta tanto *in vivo* como *in vitro*.

B) La exposición *in vitro* a DEE de macrófagos peritoneales residentes de ratón, disminuye la actividad fagocitaria. El efecto depresor fue semejante para todo el rango de concentraciones estudiadas (de 2×10^{-11} a 2×10^{-4} M). Estas observaciones contrastan con la estimulación *in vivo* de la actividad fagocitaria de macrófagos, lo que parece indicar que la acción estimulante de los estrógenos en los macrófagos es un efecto indirecto. Este efecto indirecto puede requerir la participación de otras células, posiblemente secretoras de factores inmunomoduladores, o transformadoras de estrógenos en hormonas inoestimulantes.

2.- Macrófagos tumorales de ratón

A.- En los ensayos de actividad fagocitaria en macrófagos tumorales murinos de la línea J774A, utilizando partículas de látex, el suero de animales tratados con DEE no produjo ningún efecto apreciable. Estos resultados podrían deberse a que el tiempo transcurrido entre la última administración del estrógeno y la obtención del suero haya sido demasiado largo, y que por tanto ya no estuvieran presentes en el suero posibles productos de transformación de estrógenos con actividad estimulante de la actividad fagocitaria de macrófagos.

B.- Los efectos del E_2 y DEE observados en este estudio en macrófagos tumorales murinos de la línea J774A.1, consistentes en un aumento considerable en la actividad fagocitaria a concentraciones muy bajas (2×10^{-13} M) de los estrógenos, fueron semejantes a los de concentraciones hasta mil veces mayores (2×10^{-10} M). Sólo concentraciones aún mayores disminuyeron en forma lineal con respecto al logaritmo de las concentraciones la actividad fagocitaria, que llegó a disminuir a valores inferiores a los basales.

Esta discrepancia, con respecto a macrófagos peritoneales residentes normales expuestos *in vitro* a estrógenos es difícil de explicar a la luz de los conocimientos actuales. Sólo cabe señalar que en relación a otra respuesta, la secreción de interleucina 1β , en monocitos circulantes humanos (Polan, 1989) y en la línea HL60 de células tumorales de leucemia promielocítica, se observa un efecto bifásico semejante (Mori, 1992).

Una explicación posible de estos efectos bifásicos sería la siguiente: Clohisy y cols. (1987), observaron en células de médula ósea no transformadas, precursoras de macrófagos, incrementos en la membrana plasmática, inducidos por la 1,25-dihidroxitamina D_3 , en la expresión del receptor manosa-fucosa específico de macrófagos. Este receptor permite la endocitosis de algunas glucoproteínas y partículas derivadas de levaduras, p. ej., Zymosan (que es la partícula empleada en este estudio). Concentraciones bajas del

estrógeno pudieran inducir el aumento en la expresión de los receptores para manosa-fucosa, y concentraciones mayores de estrógenos pudieran disminuir la expresión de los receptores a los estrógenos (receptor down-regulation), dando por resultado los efectos bifásicos señalados.

Otra posible explicación está basada en la posible presencia de dos tipos de proteínas de unión específica a estrógenos (tipo I y tipo II) observadas en monocitos humanos de sangre periférica (Markaverich y Clark, 1979; Ranelletti y cols., 1988; Wada y cols., 1992). Los de tipo I son de alta afinidad y baja capacidad y los de tipo II son de baja afinidad y alta capacidad. El efecto estimulante de los estrógenos en la actividad fagocitaria de la línea tumoral correspondería a una acción mediada por proteínas tipo I y el efecto inhibitorio a proteínas tipo II.

EFFECTO SOBRE EL NUMERO DE CELULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS

Incremento significativo en el número de células secretoras de IgG específicas, en ratones tratados con DEE e inmunizados por vía intraperitoneal con extracto proteico de *Mycobacterium tuberculosis*

El aumento observado en este estudio en el número de células secretoras de anticuerpos específicos por la administración *in vivo* de DEE, contrasta con las disminuciones reportadas por Slijvic (1974), Luster (1980) y Ezaki (1982). La magnitud de las disminuciones es función de la dosis de antígeno administrado; a mayor dosis de antígeno, corresponde una menor disminución en el número de células secretoras de anticuerpos específicos. Con dosis suficientemente grandes de antígeno puede abolirse la disminución en el número de células secretoras de anticuerpos específicos producida por los estrógenos (Slijvic, 1974; Ezaki, 1982).

En un estudio posterior, Slijvic (1975) observó que el bloqueo por medio de carbón coloidal de la captación hepática de

un antígeno reducía el efecto inhibitorio de estrógenos en el número de células formadoras de placas de lisis.

Kenny (1976) reportó que el tratamiento con estrógenos no disminuye el número de células formadoras de placas de lisis. Kenny inmunizó por vía intraperitoneal, mientras Slijvic y Ezaki emplearon la vía intravenosa. Nuestros experimentos muestran, usando la vía intraperitoneal y otro antígeno para la inmunización, que la administración de DEE, después de la inmunización, aumenta el número y acelera la diferenciación de clonas secretoras del isotipo IgG. Esta interpretación concuerda con las observaciones de Paavonen (1981), del incremento de la diferenciación de células B expuestas *in vitro* a E_2 en presencia del mitógeno PWM.

El esquema de tratamiento seguido en estos experimentos es semejante al del estudio del efecto estimulante *in vivo* de estrógenos en la actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales residentes. En ambos tipos de experimentos se observó el efecto estimulante de estrógenos.

EFFECTOS IN VITRO EN HIBRIDOMAS MURINOS DE CELULAS B

En un hibridoma de células B tumorales, expuestas a E_2 se observó estimulación de la actividad secretora de IgG específicas, mientras en otros cuatro hibridomas no se observó efecto alguno. Exposición a DEE en las mismas condiciones no produjo efecto apreciable en ninguno de los hibridomas. Se conocen varios estimulantes de la función secretora de hibridomas de células B: ácido retinoico (Aotsuka, 1991), medios condicionados (Astaldi, 1983; Pintus y cols., 1983; Sugawara y cols., 1985; Klaus, 1987; Stewart & Fuller, 1989; King & Sartorelli, 1989; Gomathi y cols., 1991). Aunque no conocemos estudios en que se haya descrito la estimulación en un hibridoma de células B de su actividad secretora, en células B normales se ha descrito la estimulación *in vitro* en la producción de anticuerpos específicos con E_2 , a

concentraciones semejantes a las observadas en este estudio (Kenny y cols., 1976; Paavonen y cols., 1981).

La falta de actividad del DEE que contrasta con la actividad del E_2 , resulta sorprendente, ya que estos dos estrógenos comparten muchas acciones tan diversas como son, la cornificación vaginal en roedores, el efecto uterotrófico, efecto bifásico en la colesterolemia de la rata, efectos bifásicos en la coagulabilidad sanguínea de la rata y el ratón, estimulación *in vivo* de la actividad fagocitaria de macrófagos en el ratón, efecto bifásico en la actividad fagocitaria de macrófagos de la línea J774A.1, inactividad en la colesterolemia del ratón e inactividad *in vitro* en la fagocitosis de macrófagos peritoneales del ratón.

Si la estimulación de la actividad secretora de IgG específicas dependen de la biotransformación del E_2 (Fotsis, 1994) por el hibridoma en el producto activo, por ejemplo, la introducción en el átomo de carbono C_{14} o C_{18} de un grupo hidroxilo o en los átomos de carbono C_{15} , C_{16} , C_{17} o C_{18} de un grupo carbonilo en la molécula del E_2 , estas biotransformaciones no son posibles en el DEE.

Si este fuera el caso, la ineficacia del E_2 en otros hibridomas podría deberse a que carecen de los sistemas enzimáticos para realizar la transformación del E_2 en el producto activo.

Otra posible explicación de la inactividad de los estrógenos en algunos hibridomas estudiados sería la falta de receptores a los estrógenos o a los productos de biotransformación de los mismos.

VIII AGRADECIMIENTOS

Med. Cir. Felipe A. Massó Rojas
Dr. Edgar Zenteno Galindo
Dr. Luis F. Montañó Estrada
Dr. Jesús Calderón Tinoco
Dr. Enrique Ortega
Lic. I. B.B. Claudia Garay

Dr. Lino de León Hernández
Dr. Abraham Landa Piedra
Q.F.B. Ma. Juana García Mondragón
M.C. Hortensia Soto Trejo
M.C. Guadalupe Maldonado Mercado
Fotógrafo José Avilés

IX REFERENCIAS

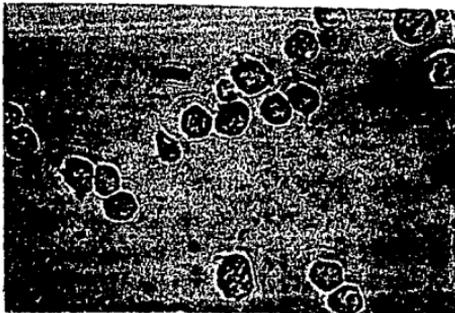
- Aotsuka, Y., Naito, M. (1991)** Enhancing effects of retinoic acid on monoclonal antibody production of Human-Human hybridomas. *Cell. Immunol.* 133:498
- Astaldi, G.C.B. (1983)** Use of Human endothelial culture supernatant (HECS) as a growth factor for hybridoma. *Meth. Enzymol.* 92:39.
- Attanasio, A., Gupta, D. (1980)** Simultaneous radioimmunoassay of estrogens and androgens in plasma in prepuberal children (in) *Radioimmunoassay of steroid hormones* (editor) Derek Gupta (editorial) Verlag Chemie Weinheim Florida, pag. 117-126.
- Babior, B.M., Kipnes, R.S., Curnutte, J.T. (1973)** Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent *J. Clin. Invest.* 52:741-744.
- Baehner, R.L., Nathan, D.G. (1968)** Quantitative Nitro Blue Tetrazolium Test in Chronic Granulomatous Disease. *N. Engl. J. Med.* 278;18:971-976.
- Baehner, R.L., Boxer, L.A., Davis, J. (1976)** The Biochemical basis of Nitro blue Tetrazolium Reduction in normal Human and chronic Granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 48;2:309-313.
- Barahao, R.I., Tenebaum, A., Rumi, L.S. (1991)** Effects of sexual steroid hormones on the functionality of murine peritoneal macrophages. *Steroids* 56;481-485.
- Blalock, J.E., Stanton J.D. (1980)** Common pathways of interferon and hormonal action, *Nature* 282:406
- Blalock, J.E., Harp C. (1981)** Interferon and adrenocorticotrophic hormone induction of steroidogenesis, melanogenesis and antiviral activity. *Arch. Virol.* 67:45
- Blalock, J.E., Smith, E.M. (1985)** Human leukocyte interferon (Hu IFN α): Potent endorphine-like opioid activity. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 101:472.
- Boerrigter, G.H., Vos, A., Scheper, R.J. (1983)** Direct measurement of in vitro antibody production using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Immunol. Methods* 61;377-384.
- Boorman, G.A., Luster, M.I., Dean, J.H., Wilson, R.E. (1980)** The effect of adult exposure to diethylstilbestrol in the mouse macrophage function and number. *J. Reticuloendoth. Soc.* 28;6:547-560.
- Brett, S.J., Butler, R. (1988)** Interactions of Mycobacterium lepraemurium with resident peritoneal macrophages; Phagocytosis and stimulation of the oxidative burst. *Clin. Exp. Immunol.* 71:32-38.
- Clohisy, D.R., Bar-Shavit, Z., Chappel, J.C., Teitelbaum, S.L. (1987)** 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ Modulates Bone Marrow Macrophage Precursor Proliferation and Differentiation. *J. Biol. Chem.* 262:33;15922-15929.
- Cohen, J.H.M., Danel, L., Cordier, G., Saez, S., Revillard, J.P. (1983)** Sex steroid receptors in peripheral T cells: absence of androgen receptors and restriction of estrogen receptors to OKT8-positive cells. *J. Immunol.* 131;6:2767-2771.
- Crosignam, P.G., Trossi, L., Attanasio, A., Lombroso, F., Malvano, R. (1980)** Estradiol and estriol direct RIA in pregnancy, procedure, validation and normal values (in) *Radioimmunoassay of Steroid Hormones*, (editor) Derek Gupta (editorial) Verlag Chemie Weinheim Florida, pag 117-126.
- Cupps, R., Fauci, A.S. (1982)** Corticosteroid mediated immunoregulation in man. *Immunol. Rev.* 65;133-155
- Cupps, R., Gerrard, T.L., Falkoff, R.J. (1985)** Effects of in vitro corticosteroids on B cell activation, proliferation and differentiation. *J. Clin. Invest.* 74;754.
- Dafny, N., Reyes-Vazquez, C. (1985)** Three different types of alpha-interferons alter naloxone-induced abstinence in morphine addicted rats. *Immunopharmacology* 9:13.
- Descotes, J. (1986)** Immunotoxicity of hormones and hormone antagonists

- (in) Immunotoxicology of Drugs and Chemicals (editorial) Elsevier Science Publishers Netherlands, pag. 190-198.
- Edwards, C.K., Jacobs, M.J., Myers-Keith, P., Younger, L.M. (1989)** Murine macrophage activation with resorcylic acid lactones (RALs); comparison with diethylstilbestrol and 17 β -estradiol. *Immunopharmacology* 17:107-118.
- Engvall, E. (1980)** Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT (editors) van Vunakis, H. Langone, J.J. (editorial) Academic Press, New York. Meth. Enzymol. 70 :419-439.
- Ezaki, T., Nawa, Y., Hayama, T., Yamaguchi, K., Kotani, M. (1982)** Modulation of immune responses against SRBC after of oestrial treatment in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 48:239-243.
- Fauci, A.S., Pratt, K.R., Whalen, G. (1977)** Activation of Human B lymphocytes. IV regulatin effects of corticosteroids on the triggering signal in the plaque forming response of Human peripheral blood lymphocyte to polyclonal activation. *J. Immunol.* 119:598
- Forsberg, J.G. (1984)** Short-term and long-term effects of estrogen on lymphoid tissues and lymphoid cells with some remarks on the significance for carcinogenesis. *Arch. Toxicol.* 55:79-90.
- Fotsis, T., Zhang, Y., Pepper, M.S., Adlercreutz, R.M., Nawroth, P.P., Schwelgerer, L. (1994).** The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *Nature* 368; 237-239.
- Green, L.M., Reade, J.L., Ware, C.F. (1984)** Rapid colorimetric Assay for Cell Viability: Application to the Quantitation of Cytotoxic and Growth Inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Methods.* 70:257-268.
- Gomathi, K.G., Sharma, E., Sharma, S.K. (1991)** Protein growth factor(s) from C6 glioma cells thata promote the growth of murine hybridomas. *J. Immunol. Methods.* 139:101-105.
- Greendake, R.M., Bradley, E.M., Swisher, S.N. (1965)** Studies on the effects of administration of ACTH and adrenal corticosteroids on erythrophagocytosis *J. Clin. Invest.* 44:746-753.
- Hayes, W.L. (1973).** Statistics for the Social Sciences, 2nd. Ed., Holt Rinehart & Winston, Inc. New York. p. 650.
- Kenny, J.F., Pangburn, P.C., Trail, G. (1976)** Effect of Estradiol on Immune Competence. In vivo and in vitro Studies. *Infect. and Immun.* 13:2:448-456.
- King, I.C., and Sartorelli, A.C. (1989)** Ewing sarcoma growth factor as a supplement for the cloning of hybridoma *J. Immunol. Methods.* 118:297.
- Klaus, G.B. (1987)** Lymphocytes: A practical approach. IRL Press, Oxford.
- Klempner, M.S., Gallin, J.I. (1978)** Inhibition of neutrophil Fc receptor function by corticosteroids. *Clin. Exp. Immunol.* 34:137-142.
- Kurlander, R.J. (1981)** The effects of corticosteroids on IgG Fc receptor and complement receptor mediated interaction of monocytes with red cells. *Clin. Immunol. and Immunopath.* 20:325-335.
- Layton, G.T., Smithyman, A.M. (1987)** A cell ELISA Technique. The direct detection and semi-quantitation of immunoglobulin positive cells in 7 day lymphocyte cultures using the microtitre culture plates as the solid phase. *J. Immunol. Methods.* 57:37-42.
- Loose, L.D., Di-Luzio, M.R. (1976)** Dose-related reticulo endothelial system stimulation by diethylstilbestrol. *J. Reticuloendoth. Soc.* 20;6:457-460.
- Luster, M.I., Boorman, G.A., Dean, J.H., Luebke, R.W., Lawson, L.D. (1980)** The Effect of Adult Exposure to Diethylstilbestrol in the Mouse: Alterations in Immunological Functions. *J. Reticuloendoth. Soc.* 28;6:561-569.
- Male, D., Champion, B., Cooke, A. (1987)** Lymphokines (in) *Advanced Immunology* (editorial) Gower Medical Publishing, London. p. 11.1-11.8

- Markaverich, B.M., Clark, J.H. (1979).** Two Binding Sites for Estradiol in Rat Uterine Nuclei: Relationship to Uterotropic Response. *Endocrinology* 105: 6; 1458-1462.
- Möller, S.A., Borrebaeck, C. A. K. (1985)** A Filter Immuno-Plaque Assay for the Detection of Antibody-Secreting Cells In Vitro. *J. Immunol. Methods* 79:195-204.
- Mori, H., Sawairi, M., Itoh, N., Hanabayashi, T., Tamaya, T. (1992)** Effects of sex steroids on cell differentiation and interleukin-1 β production in the human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *J. Reprod. Med.* 37:10;871-878.
- Müller, F., Rollag, H., Froiland, S.S. (1989)** Nitroblue tetrazolium reduction in monocytes and monocyte-derived macrophages. Effect of oxidative burst stimulants and interferons. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand.* 97:6;490-496.
- Murray, H.W., Cohn, Z.A. (1980)** Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity III. Enhanced oxidative metabolism as an expression of macrophage activation. *J. Exp. Med.* 152;1596-1609.
- Nathan, D.G., Baehner, R.L., Weaver, D.K. (1969)** Failure of Nitroblue tetrazolium reduction in the phagocytic vacuoles of leukocytes in chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* 48;1895-1904.
- Nathan, C.F. (1987)** Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79;319-326.
- Nicol, T., Vernon-Roberts, B. (1964)** Oestrogen: the natural stimulants of body defence. *J. Endocrinol.* 30;277-291.
- Onsrud, M., Sander, S. (1982)** Influence of in vivo diethylstilbestrol phosphate on some Human blood lymphocyte sub-populations. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C* 90;271-276.
- Paavonen, T., Andersson, L.C., Adlercreutz, H. (1981)** Sex hormone regulation of in vitro immune response. Estradiol Enhances Human B Cell Maturation via Inhibition of Suppressor T Cells in Pokeweed Mitogen-stimulated Cultures. *J. Exp. Med.* 154;1935-1945.
- Parra, C., Montaña, L.F. (1986)** Inhibition of mitogenesis by phytohemagglutinin and lens culinaris lectin in adherent cell supernatant treated with protein extract of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 52:309
- Parrillo, J.E., Fauci, A.S. (1979)** Mechanisms of glucocorticoid action of immune processes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 19:179-201.
- Pintus, C., Ranson, J.H., Evans, C.H. (1983)** Endothelial cell growth supplement. A cell cloning factor that promotes the growth of monoclonal antibody producing hybridoma cells. *J. Immunol. Methods.* 61:195.
- Polan, M.L., Loukides, J., Nelson, P., Carding, S., Diamond, M., Walsh, A., Bottomly, K. (1989)** Progesterone and Estradiol Modulate Interleukin-1 β Messenger Ribonucleic Acid Levels in Cultured Human Peripheral Monocytes. *J. Clin. Endocrinol. and Metab.* 69:6;1200-1206.
- Rannellfetti, F.O., Piantelli, M., Carbone, A., Rinelli, A., Scambia, G., Panicci, B.P., Mancuso, S. (1988)** Type II estrogen-Binding Sites and 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67:5;888-892.
- Rao, S.S., Thanawala, Y.M., Thakur, A.N. (1972)** The effect of an estrogenic steroid on the primary antibody response under different hormonal environments. *Acta Endocrinologica* 69;595-601.
- Rook, G.A.W., Steele, J., Umar, S., Dockrell, H. M. (1985)** A simple Method for the Solubilisation of reduced NBT, and Its Use as a Colorimetric Assay for Activation of Human Macrophages by γ interferon. *J. Immunol. Methods* 82;161-167.
- Seaman, W.E., Blackman, M.A., Gindhart, T.D., Roubinian, J.R., Loeb, J.M. (1978)** B estradiol reduces natural killer cells in mice. *J. Immunol.* 121;6;2193-2198.
- Sierakowski, S., Godwin, J.S. (1988)** Mechanism of action of glucocorticoid

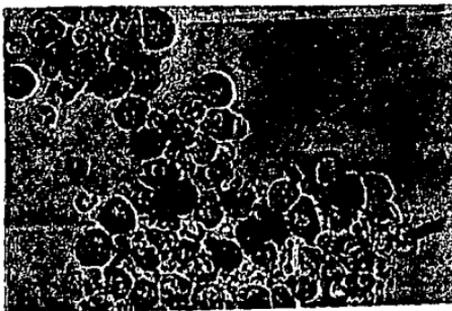
- induced immunoglobulin production:II requirement for fetal calf serum. *Clin. Exp. Immunol.* 71;198-201.
- Sijjiv,V.S.,Warr,G.W. (1974)** Activity of reticuloendothelial system and the antibody response III. The fate of type III pneumococcal polysaccharide and the antibody response. *J. Immunol.* 27;1009-1022.
- Sijjiv,V.S.,Clark,D.W.,Warr,G.W. (1975)** Effects of oestrogens and pregnancy on the distribution of sheep erythrocytes and the antibody response in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 20;179-186.
- Stewart,S.S., and Fuller,S.A. (1989)** Enhancement of hybridoma production by medium supplemented with murine ascitic fluid. *J. Immunol. Methods.* 123:45.
- Sugaswara,R.J.,Cahoon,B.E.,Karu,A.E. (1985)** The influence of murine macrophage conditioned medium on cloning efficiency, antibody synthesis and growth rate of hybridomas. *J. Immunol. Methods* 79:263.
- Thanawala,Y.M.,Rao,S.S.,Thakur,A.N. (1973)** The effect of an oestrogenic steroid on the secondary immune response under different hormonal environments. *Acta Endocrinologica* 72;582-586.
- Toivanen,P. (1967)** Effect of estrogens on the humoral antibody response in guinea pigs. *Ann. Med. Exp. Fenn.* 45;152-156.
- Trejo,R.A.,Loose,L.D.,Di-Luzio,N.R. (1972)** Influence of diethylstilbestrol (DES) on reticuloendothelial function tissue distribution, and detoxication of *S. enteritidis* endotoxin. *J. Reticuloendoth. Soc.* 11;88-97.
- Tsou,K.,Cheng,Ch.S.,Nachlas,M.M.,Seligman,A.M. (1956)** Syntesis of some p-nitrophenyl substituted tetrazolium salts as electron acceptors for the demonstration of dehydrogenases. *J. Am. Chem. Soc.* 78;6139-6144.
- Verp,M.,Karparkin,S. (1975)** Effect of plasma steroids, or steroid products on the adhesion of human opsonized thrombocytes to human leukocytes *J. Lab. Clin. Med.* 85;3:478-486.
- Wada,K.,Itoh,T.,Nakagawa,M,Misao,R.,Mori,H.,Tamaya,T. (1992)** Estrogen binding sites in peripheral blood monocytes and effects of danazol on their sites *in vitro* *Gen. Pharmac.* 23;4:693-700.
- Wakefield,E.F.,Shelton,M.J.,Hosking,C.S. (1982)** A Quantitative ELISA for IgG in cell culture supernatants. *Clin. Chim. Acta* 123;303-310.
- Warr,G.W.,Sijjiv,V.S. (1973)** Activity of the reticuloendothelial system and the antibody response I. Effects of stilbestrol on RES activity and localization of sheep erythrocytes in the mouse. *Br. J. Exp. Path.* 54;56-68.
- Weigent,D.A.,Blalock,J.E. (1987)** Interactions between the Neuroendocrine and Immune Systems:Common Hormones and Receptors. *Immunol. Rev.* 100;79-108.
- Weisman,A.,Korn,E.D. (1967)** Phagocytosis of latex beads by *Acanthamoeba* I. Biochemical properties. *Biochemistry* 2;485-497.
- Weusten,J.J.A.M.,Blanckestein,M.A.,Gmelig Meyling,F.H.J.,Schoorman,H.J.,Kater,L.,Thijssen,J.H.H. (1986)** Presence of oestrogen receptors in human blood mononuclear cells and thymocytes. *Acta Endocrinologica* 112;409-414.
- Zar,J.H. (1984)** *Biostatistical Analysis*, 2nd ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J. p. 194-195.

MICROFOTOGRAFIAS



FOTOGRAFIA 1

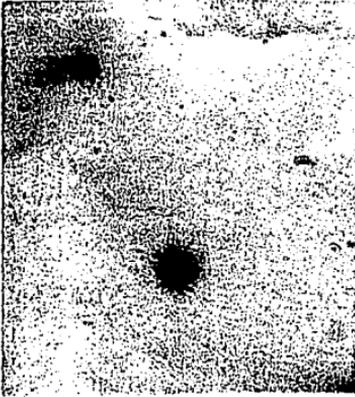
**LINEA CELULAR J774A.1(ATCC TIB67) EN CONDICIONES DE CULTIVO
(400X)**



FOTOGRAFIA 2

CELULAS DE LA LINEA J774A.1 NBT POSITIVAS (400X).

INMUNPUNTOS



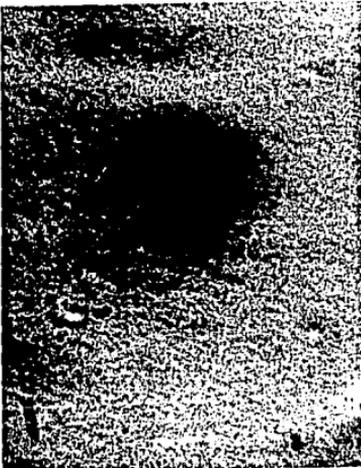
FOTOGRAFIA 3

CLONA SECRETORA Ig (100X).



FOTOGRAFIA 5

CLONA SECRETORA DE Ig (100X)



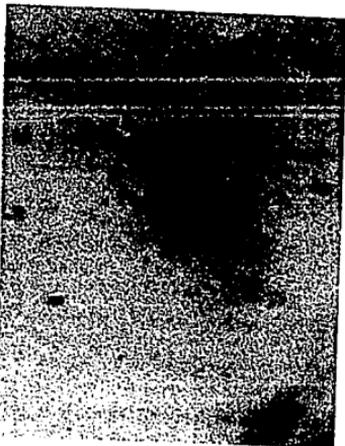
FOTOGRAFIA 4

CLONA ANTERIOR (400X)



FOTOGRAFIA 6

CLONA ANTERIOR (400X)



FOTOGRAFIA 7

CLONA SECRETORA DE Ig (100X)



FOTOGRAFIA 8

CLONA SECRETORA ANTERIOR (400X)