



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

51982
MAY
1985

RECONOCIMIENTO INTERCELULAR:
FACTORES INVOLUCRADOS EN EL RECONOCIMIENTO
POR MACROFAGOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)
P R E S E N T A :
MARIA GUADALUPE MALDONADO MERCADO

México, D. F.

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

RECONOCIMIENTO INTERCELULAR: FACTORES INVOLUCRADOS
EN EL RECONOCIMIENTO POR MACROFAGOS.

Este trabajo se presenta como tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Biología).

Aprobaron la tesis y son miembros del Jurado:

DR. ROGER EDUARDO CARVAJAL SARAVIA.

DRA. ANNIE PARDO SEMO DE SHEINBAUM.

M. EN C. GLORIA YOLANDA BERDEJA GARCIA.

DR. ALFONSO TORRE BLANCO.

M. EN C. SARA FRIAS VAZQUEZ.

M. EN C. MARIO SEGURA ALMARAZ.

M. EN C. PILAR TORRES GARCIA.

Agradezco al Dr. Roger E. Carvajal Saravia, la dirección
orientación y apoyo brindado durante la elaboración de
este trabajo; así como el haberme transmitido los cono-
cimientos necesarios para infundir en mí el interés por
la investigación.

A mi madre, y hermano con cariño
y admiración.

C O N T E N I D O

RESUMEN	1
INTRODUCCION Y ANTECEDENTES	2
MATERIAL Y METODOS	12
RESULTADOS	18
DISCUSION	44
CONCLUSIONES	53
REFERENCIAS	54

RESUMEN

El reconocimiento intercelular juega un papel importante en la conservación de la integridad, individualidad y la identidad tisular durante el desarrollo de los organismos. Se acepta que este fenómeno es mediado por receptores de membrana. Uno de los procesos de reconocimiento más estudiado y aun no aclarado es el correspondiente a la discriminación de componentes propios y extraños, por parte de las células del Sistema Fagocítico Mononuclear.

En el presente estudio, se examinó la posibilidad de que los macrófagos sean capaces de reconocer estructuras específicas que funcionen como marcadores de lo propio en la superficie de las células autólogas. Para tal efecto, se estudio la capacidad discriminativa que ejerce el macrófago sobre eritrocitos autólogos y heterólogos. Como estrategia se pretendió enmascarar o eliminar este marcador de lo propio en los eritrocitos autólogos y homólogos, mediante la utilización de anticuerpos (fragmento Fc) anti-eritrocito o mediante el rasuramiento enzimático de la superficie eritrocitaria, para luego examinar si estas células son fagocitadas por macrófagos peritoneales normales de ratón.

Se encontró que el macrófago, es capaz de reconocer eritrocitos propios y no endocitarlos *in vitro* solo si el sistema cuenta con la presencia de suero autólogo u homólogo. El factor sérico responsable es un componente soluble, dializable y con efecto especie-específico. Al eliminar o enmascarar los marcadores de la superficie eritrocitaria se encontró, que el macrófago es capaz de endocitar eritrocitos propios, de manera, similar a lo que ocurre con eritrocitos heterólogos normales o eritrocitos homólogos viejos o senescentes.

En base a estos hallazgos, se propone que la capacidad discriminativa fagocítica reside en la existencia de una señal de identidad o marcador de "lo propio" presente en las células de un organismo la cual, al ser reconocida por el macrófago, previene la fagocitosis. Además, se discute la posibilidad de que este mecanismo de reconocimiento ocurra en diferentes asociaciones biológicas.

INTRODUCCION.

Las asociaciones biológicas requieren como condición *sine qua non* la existencia, a nivel celular, de mecanismos de reconocimiento para discriminar individuos de otra especie, células de otros tejidos y aun células del mismo tejido pero con algún grado de transformación o deterioro (1). Este fenómeno es requerido tanto para asociaciones entre células de la misma especie (tejidos, órganos, colonias, entre otras) como para las que existen entre células de distintas especies (simbiosis y parasitismo).

El reconocimiento entre células de la misma especie cumple funciones a distintos niveles. Así, en los organismos pluricelulares el reconocimiento celular se encuentra presente en:

a) La reproducción de las especies. Este proceso requiere de mecanismos de reconocimiento durante la fertilización o unión de gametos. Es conocido el fenómeno biológico por el cual se restringe la fusión, o entrada, de gametos a organismos de una misma especie (2), y solo de manera eventual a individuos de especies diferentes pero con gran cercanía filogenética (3). Este fenómeno de reconocimiento parece llevarse a cabo mediante interacciones en la superficie de células gaméticas en base a receptores específicos. La fusión entre el esperma y huevo en el erizo de mar es un ejemplo de ello; en este proceso se ha demostrado la existencia de fenómenos de reconocimiento célula-célula, adhesión y, finalmente fusión, con carácter totalmente específico (2). Se ha propuesto para este proceso biológico, que la adhesión específica depende de la presencia de ciertas proteínas de membrana con capacidad para unirse específicamente a arreglos de carbohidratos (4).

b) La histiogénesis: El reconocimiento intercelular es importante para la constitución de la estructura y arquitectura de los tejidos y la conformación de un organismo. La adhesión homotípica (de la misma estirpe) es llevada a cabo entre células de una región definida; no ocurre así entre células de diferente región anatómica. Lo anterior también se manifiesta en el hecho de que las células de un órgano dado se mantienen, juntas durante su formación hasta la fase final del proce

so de desarrollo (5). Eventualmente el reconocimiento e interacción con células de un tejido diferente (alotípico) también es importante en la conformación final de los órganos; el ejemplo más notable es la vascularización e inervación de los tejidos (6). La pérdida de esta capacidad de reconocimiento es la característica de los tumores metastásicos (7).

c) En la morfogénesis. Las células progenitoras pueden migrar entre distintos tejidos y reconocer su destino final. La superficie de contacto es reconocida por las células migratorias y puede ser determinada por la naturaleza de la membrana o a través de arreglos macromoleculares que se encuentran en la superficie de las células que conforman "la ruta" por la que se desplazan hacia su ubicación definitiva. La fase morfogenética migratoria continúa con otra etapa de reconocimiento que determina la posición final de la célula progenitora del órgano en el embrión y concluye con la posterior diferenciación para la formación de un tejido específico (8,9,10).

Muchos tejidos y órganos en el embrión se originan en un sitio distinto a su sitio final, sin embargo, las células embrionarias son capaces de reacomodarse ya que poseen mecanismos de reconocimiento celular a nivel de membrana que determina que los conjuntos de células de la misma estirpe se agreguen y unan para formar un tejido primordial (reconocimiento homotípico) (6). Este mecanismo es determinante para el desarrollo embrionario normal, y cualquier falla en dicho mecanismo parece estar involucrado en el desarrollo anormal que incluye malformaciones y neoplasias (6,12).

En los insectos, durante el desarrollo, ocurren cambios que se manifiestan en la variación de forma, funciones de los tejidos y algunas veces hasta su género de vida. Durante estas constantes variaciones metamórficas, la eliminación de los tejidos deciduos, de las células en degeneración, o de las células muertas, es llevada a cabo mediante fagocitosis, para lo cual han de requerirse necesariamente de mecanismos de discriminación o reconocimiento (11,12).

En las especies de vida unicelular los individuos pueden asociarse para formar colonias, tal es el caso de las amebas y de ciertas bacterias.

En el caso de las amebas, éstas pueden encontrarse aglomeradas pero siempre mantienen su individualidad, ya que una ameba no fagocita a otra ameba de la misma especie aunque sea más pequeña, en cambio si es capaz de ejercer este efecto sobre casi cualquier otra partícula biológica, de tamaño adecuado, con la que entre en contacto (13,14).

El reconocimiento también es evidente en aquellos seres pluricelulares que en determinadas circunstancias pueden hacer vida unicelular y son capaces de reagregarse de manera específica, aún cuando se haya realizado mezcla de células de varios organismos, como ocurre con las esponjas (76). Algo similar ocurre en seres de vida unicelular que en ciertas condiciones pueden formar aglomerados celulares organizados como en el caso de las anemonas y ciertos hongos (77). Un ejemplo de ello es el hongo *Dictyostelium discoideum* que existe como mixoameba, en cierta etapa de su vida unicelular, sin tener contacto con los demás individuos de la misma especie. En condiciones adversas como sería la escasez de nutrientes, algunas de estas células son capaces de agregarse después de un acercamiento mediado por quimiotaxis por liberación de AMP_C (3,5-adenosin monofosfato cíclico) extracelular, para formar colonias que se comportan como un organismo pluricelular o pseudoplasmodium con funciones diversas y componentes bien diferenciados (2,15).

Dentro de las asociaciones entre especies distintas debemos mencionar la simbiosis, que a nivel unicelular inducen la formación de micro-sistemas específicos tales como la flora intestinal, la placa dento-bacteriana o el plancton, para lo cual se requiere de mecanismos de discriminación (16,17).

A nivel de especies pluricelulares, aunque no en todos los procesos simbióticos hay contacto íntimo a nivel celular, en ninguno de los casos simbiotes se desencadenan mecanismos de agresión, sino que ambos organismos se toleran sin que se produzca disgregación. En cambio, en el parasitismo el organismo agresor que llega al huésped (por medio de pasos sucesivos de adhesión, penetración e instalación) lo reconoce como el lugar específico en donde se puede establecer (75) y por otra parte el huésped lo reconoce como extraño (o no propio) desencadenando las respuestas de vigilancia y de defensa (18,19).

De lo anterior se desprende que cada organismo multicelular posee mecanismos de reconocimiento que le permiten mantener su identidad, su individualidad y su integridad. En el primer caso se preserva la identidad de la especie bloqueando o limitando la posibilidad de la fertilización heteróloga. En los otros se impide que el espacio físico que ocupa un organismo no pueda ser ocupado por otro.

Se explica de esta manera la inviabilidad de los trasplantes heterólogos. Los injertos son viables cuando se llevan a cabo entre seres de la misma especie y aún entre éstos existen ciertas diferencias que son reconocidas a nivel celular por los componentes del aparato inmunológico (19).

Otro proceso que requiere reconocimiento dentro de una misma especie es el relacionado con la remoción de componentes celulares propios que hayan sufrido algún tipo de transformación estructural (degeneración o deterioro) la cual casi siempre tiene expresión a nivel de membrana. Entre éstas se pueden citar las transformaciones de tipo tumoral (20) y las consecuentes con el envejecimiento o deterioro accidental de las estructuras celulares (21,22).

Los procesos de reconocimiento entre organismos pluricelulares que permiten preservar la individualidad y la integridad discriminando entre lo propio y no propio han sido divididos en: inmunológicos y no inmunológicos. Los primeros son altamente específicos y el sistema que los incluye cuenta con células que en su membrana tienen receptores específicos dirigidos contra alguna estructura o arreglo molecular. Entre éstas últimas (antígenos) se encuentran prácticamente todos los componentes existentes en la naturaleza que tengan cierto peso molecular y complejidad estructural. Existe en el aparato inmune al menos una célula con capacidad de reconocimiento para cada uno de ellos (23). También existen células (linfocitos) que tienen receptores dirigidos contra componentes propios pero éstas se encuentran impedidas para montar una reacción contra tales estructuras (tolerancia inmunológica). En cambio, si los linfocitos con receptores específicos para componentes extraños entran en contacto con la sustancia contra la cual están dirigidos sus receptores, se activan, proliferan y montan una reacción específica que procura la neutralización y eliminación del material extraño (parásitos, componentes de

otras especies, fármacos, etc). Esta reacción es más vigorosa en la medida en que haya más lejanía filogenética entre el organismo huésped y el organismo que provee el material extraño (24). Sin embargo, también se conoce que existen otros requerimientos, por parte de la sustancia extraña, para que se lleve a cabo esta reacción y que en su conjunto determinan la inmunogenicidad (25).

El mecanismo inmunológico de reconocimiento es altamente específico y exquisitamente discriminativo, en función de la existencia de células precomprometidas con una estructura. Por tanto, éstas pueden diferenciar entre un componente extraño y otro, y eventualmente entre un componente propio y otro, por lo que un inmunocito solamente reacciona con un antígeno y no con otros. Este mecanismo aparece tardíamente en la evolución de las especies y estas células linfocitarias de reconocimiento, solo se encuentran a partir de peces sin mandíbula (superclase Agnatha, ciclóstomos ej. lamprea) (23,24).

En los organismos pluricelulares más primitivos en la escala filogenética el reconocimiento de lo propio y extraño es menos complejo y está a cargo de una estirpe celular que tiene esta función. Este fenómeno lo encontramos en la formación de colonias en especies marinas (filum Porifera), en donde varios amibocitos se reconocen y forman una colonia. La adhesión intercelular se lleva a cabo y se dan las interacciones necesarias para formar un organismo multicelular. Sin embargo, estas células son capaces de reconocer organismos extraños (no relacionados filogenéticamente) los adhieren a su superficie, los ingieren (endocitosis) y los degradan por digestión intracelular (8). Esto indica que la fagocitosis y digestión intracelular de las partículas extrañas son parte de un mecanismo de conservación de la individualidad y del ejercicio de la defensa. Una condición para que esto ocurra es que exista la capacidad de reconocimiento y discriminación entre los componentes propios y extraños.

Metschnikoff en 1882 (23) observó que en los erizos de mar existen células capaces de reconocer y englobar partículas extrañas, y que constituyen su sistema defensivo. Este mecanismo de discriminación propio-extrño se ha conservado en la escala evolutiva hasta las especies más avanzadas de mamíferos. Sin embargo, éste no es capaz de distinguir entre compo

nentes extraños diferentes o entre componentes propios diferentes, simplemente hace la discriminación propio-extraño.

Este mecanismo está a cargo de células con capacidad fagocítica que en los vertebrados conforman el Sistema Retículo Endotelial o modernamente llamado Sistema Fagocítico Mononuclear (SFMN), el cual se encuentra ubicado en distintos órganos y sus células efectoras tienen características propias acordes con el órgano o tejido en el que se encuentran: células de Kupffer en los sinusoides hepáticos, células reticulares en los centros linfoides, células gliales en el sistema nervioso central, células de Langerhans en los epitelios, macrófagos e histiocitos en tejido conjuntivo, monocitos en la sangre, etc. Todos ellos derivan de la serie monoblastica y provienen de una célula germinal que se ubica en la médula ósea. Este sistema de reconocimiento está íntimamente ligado al sistema inmunológico ya que cualquier sustancia que entra al organismo es reconocida, captada y procesada por estas células y después presentada a los linfocitos para echar a andar una respuesta altamente específica que es la inmunológica. Independientemente de ésta última, las células del Sistema Retículo Endotelial (macrófagos) cumplen con la función de discriminación y de primera barrera defensiva contra lo extraño, con lo que se constituyen en un factor importante para la preservación de la identidad y de la individualidad celular (1).

Sin embargo, debe considerarse que a pesar de poseer esta capacidad discriminativa este no es un mecanismo específico de reconocimiento; por lo que se le ha calificado como no-inmunológico (12). Para explicar este fenómeno y su mecanismo se han planteado muchas hipótesis las cuales han sido estudiadas en diferentes modelos; uno de los más empleados es el modelo: macrófago tisular vs. eritrocito (26) o macrófago vs. otras células de fácil manejo *in vitro*.

Perkins (27) encontró que entre más distante es la relación filogenética entre la especie donadora de la célula fagocítica y la de la partícula, la capacidad para adherir y fagocitar, aumenta. Esta correlación (índice fagocítico y relación filogenética) también se ha observado en la fagocitosis de proteínas agregadas (6). La fagocitosis es selectiva ya que el macrófago no fagocita a dos partículas extrañas a la vez, es decir, primero "reconoce" y fagocita a una y luego a otra (26). Al estudiar la capacidad de los macrófagos peritoneales para reconocer células homólogas y heterólo-

gas en rata, ratón y cobayo en un sistema de fagocitosis *in vitro* con timocitos no opsonizados, se encontró que los macrófagos de rata y ratón fagocitan timocitos homólogos alterados y heterólogos normales; los macrófagos de cobayo fagocitan únicamente timocitos de pollo. Esto indica que los macrófagos de mamíferos poseen capacidad para discriminar células homólogas de heterólogas (28). En el reconocimiento xenogénico, entre macrófagos de ratón y fibroblastos de rata y de pollo, se observa que los primeros fagocitan a las células blanco de pollo pero no a fibroblastos singénicos o alogénicos (29). Sin embargo, los macrófagos no solo fagocitan partículas extrañas sino que pueden ejercer éste efecto sobre células propias. Así, los macrófagos peritoneales reconocen y fagocitan eritrocitos viejos y también jóvenes singénicos si son tratados con tripsina *in vitro* (30) u otros agentes químicos como tioglicolato, peryodato, entre otros (31). Esto sugiere que el reconocimiento requiere de estructuras intactas en la superficie de la célula propia. Igualmente, los eritrocitos infectados con el virus de leucemia Rauscher son eliminados por macrófagos singénicos normales; con esto se confirma que los receptores de membrana son importantes en el reconocimiento de células isologas deterioradas o alteradas (32).

Otra de las funciones del macrófago, además de la de eliminar de la circulación a los eritrocitos viejos, es la de depurar al organismo de otras células propias pero envejecidas o deterioradas (33,34). Para explicar el mecanismo de discriminación se ha sugerido la existencia de cargas negativas en la membrana de los eritrocitos, lo cual sería un requisito importante para mantenerse en circulación: dichas cargas disminuyen con la edad de las células (22, 34), lo que las haría más adhesivas en su contacto con las células del Sistema Retículo Endotelial y por lo tanto fagocitables (36). Se ha propuesto que el ácido siálico juega un papel fundamental en este proceso. Este compuesto se encuentra presente tanto en las partículas extrañas como en las propias, y estas serán o no fagocitadas dependiendo del contenido de ácido en la superficie de la membrana, constituyendo el glicocalix (35, 37,38). Las células de Kupffer de rata adhieren firmemente eritrocitos de rata o ratón tratados con N-acetil neuraminidasa (sialidasa) y no así eritrocitos normales (39). Este fenómeno también se observa en linfocitos tratados con esta enzima. Esta se ha empleado para permitir fagocitosis de células homólogas. De acuerdo con las observaciones realizadas por otros

autores (40,41), al remover los residuos de ácido N-acetil-neuramínico, la superficie de dicha célula expone residuos de galactosa; esto promueve la unión a células hepáticas singénicas en donde probablemente la presencia de una "lectina" permita la unión a residuos de galactosa (42). El proceso de envejecimiento provocaría también éste tipo de interacciones, por lo que se ha postulado que con la edad tanto los linfocitos como los eritrocitos sufren cambios en la superficie que al ser detectados permiten que sean retirados de la circulación (43,44).

Para explicar la capacidad de distinguir entre lo propio y lo extraño se han propuesto diferentes mecanismos. Algunos autores sugieren, en base a ciertos hallazgos, que las opsoninas son los mediadores del reconocimiento y la adhesión (45,46). Estas moléculas tendrían, por un lado, sitios activos específicos para los componentes propios alterados o para el material xenogénico y por otro una estructura que sería reconocida por receptores en el macrófago, específicos para cada tipo de opsonina. Se sugiere que estos componentes podrían ser anticuerpos (43), o la fracción b del componente 3 del sistema de complemento (C3b) (47,48,49). Sin embargo, no en todos los casos en los que se aprecia fagocitosis xenogénica por macrófagos se pueden detectar títulos de anticuerpos en el suero (50). Además, se sabe que el reconocimiento de lo extraño también puede ocurrir en ausencia de suero (51). Por otra parte se conoce que los anticuerpos (como efectores de una respuesta inmune inducida) se forman como consecuencia de un reconocimiento previo del material propio o extraño por parte de la célula específica (27,49). Además, algunos autores han reportado que (52,53) la especificidad de los anticuerpos parece estar relacionada con el previo reconocimiento de la partícula extraña por los macrófagos. Sin embargo, actualmente se sabe que la formación de los anticuerpos es posterior al reconocimiento por el macrófago lo cual hace inconsistente esta proposición.

Otros autores han propuesto que el macrófago tiene la capacidad de reconocer sustancias extrañas, ya que células propias no alteradas a las que se unen proteínas extrañas (Concanavalina A) pueden ser fagocitadas (54). Weir (12), en cambio sugiere que el reconocimiento del material extraño por parte del macrófago está dado por la interacción entre las glicopro-

teínas de la célula fagocítica y los carbohidratos ubicados en la superficie de las partículas extrañas, en especial los microorganismos, sin que intervenga ningún receptor específico. Sin embargo, este autor pudo inhibir la adhesión utilizando diferentes azúcares.

Por otra parte, se ha sugerido la presencia de receptores en la superficie del macrófago capaces de ligar células dañadas o alteradas y células xenogénicas (20,28,46), así como la existencia de receptores en el macrófago capaces de reconocer estructuras que en las células propias normales están enmascaradas por carbohidratos (55), neuroamilosas (56) o moléculas cargadas (57). Estas estructuras al sufrir alteración permitirían la exposición de estructuras propias que serían reconocidas por el macrófago lo cual desencadenaría su atrapamiento (58).

También se ha planteado la existencia, en la superficie de las células de un organismo, de un marcador para lo propio, el cual sería especie-específico con sus receptores respectivos, en macrófagos (59) y linfocitos (60). Alternativamente se propuso la existencia de receptores tanto para lo propio como para lo extraño (28,53).

En general, los mecanismos de reconocimiento intercelular están asociados a estructuras en la membrana plasmática que permiten desencadenar diferentes tipos de interacciones posteriores al reconocimiento mismo. Así por ejemplo: la adhesión intercelular establece la consecuencia del fenómeno de reconocimiento en la histiogénesis (5) o la formación de colonias (61); la migración celular en la morfogénesis (6), y otras. En el caso de los macrófagos aún no se esclarece cual es el evento consecuente al reconocimiento. Si el macrófago tuviera capacidad de reconocer lo extraño, a través de una estructura de membrana, la consecuencia sería la adhesión y fagocitosis, en cambio, si el macrófago tuviese la capacidad de reconocer lo propio la consecuencia sería la separación de la célula reconocida y por tanto la no interferencia en su actividad biológica. La demostración de una u otra consecuencia aportaría evidencias a favor de alguna de las dos posibilidades.

En síntesis, se puede agrupar a los posibles mecanismos de reconocimiento en dos opciones hipotéticas: 1) la presencia de receptores para lo extraño y 2) la presencia de receptores para lo propio.

La primera opción encierra la posibilidad, bastante remota, de que el macrófago tenga infinidad de receptores para una casi infinita colección de posibles sustancias extrañas con las que pudiera entrar en contacto y poder ejercer sobre éstas su efecto fagocítico. Esta posibilidad por cuestiones de límite espacial y funcional del macrófago se hace difícil, pero requiere su comprobación o rechazo en forma experimental.

En este trabajo se buscaron evidencias en favor de la segunda hipótesis (existencia de receptores para lo propio), la cual implica la presencia de una señal o marcador de "lo propio" en células homólogas que pudiera ser reconocida como tal por el macrófago de la misma especie. Para sustentar esta hipótesis de trabajo se asumió que el macrófago se encuentra en un estado fisiológico permanente de fagocitosis y que la presencia de estas "señales" en la superficie de la célula en reconocimiento podrían modularlo negativamente al tomar contacto.

La carencia o ausencia de estas "señales" determinarían en cambio, el atrapamiento y endocitosis de la partícula o célula. Para tal efecto, se examinó la actividad discriminativa de los macrófagos de ratón midiendo su capacidad para adherir y fagocitar eritrocitos de la misma especie y de especies con diversa relación filogenética. A los eritrocitos homólogos se les sometió a distintos tratamientos con el propósito por una parte de enmascarar y, por otra, para eliminar la supuesta señal o marcador de lo "propio", buscando que el macrófago los reconozca como extraños. Todos estos procedimientos fueron realizados *in vitro* y como método de estimación del fenómeno de reconocimiento se determinó el índice fagocítico en sistemas de cultivo de células.

MATERIAL Y METODOS.

Animales. Se utilizaron ratones CDI (cepa abierta), de ambos sexos y de 25 a 30 g. reproducidos en el Bioterio de la Facultad de Medicina U.N.A.M., donde se criaron exclusivamente con purina y agua *ad libitum*.

Células blanco. Se utilizaron eritrocitos de ratón (sistema homólogo) los cuales se obtuvieron por sangrado cardíaco. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se les practicó una intervención quirúrgica, consistente, en una incisión longitudinal en sentido anteroposterior en la región ventral. Se abrió la pared anterior del tórax por fractura del esternón, para localizar el corazón, realizando una incisión, en la aurícula derecha; la sangre así obtenida, se extraía con una pipeta de transferencia y se colectaba en un tubo con perlas de vidrio en condiciones de esterilidad. El tubo se sometió a agitación para producir desfibrinación mecánica, luego se centrifugó (1000 r.p.m. durante 5 min en una centrífuga refrigerada) para separar el paquete de células y el suero; éste último se guardó a 4°C hasta su uso. Se evitó la utilización de anticoagulantes para prevenir efectos negativos en la adhesión celular. El paquete globular fue lavado tres veces mediante centrifugación (300 × g) con solución balanceada de Hank's (SSBH), pH 7.2

Se obtuvieron además, eritrocitos de pollo, por sangrado yugular; de cobayo, por punción cardíaca transtorácica, y de burro y carnero por punción venosa; todos bajo las mismas condiciones de esterilidad. La sangre se colectó y se almacenó en solución de Alsever (62). Antes de emplearla, los eritrocitos fueron lavados con SSBH tres veces por centrifugación.

Marcado de las células blanco. A 0.5 ml de paquete de eritrocitos homólogos o heterólogos, se les adicionó NaCrO_4 (^{51}Cr , 5 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$, ININ) en 100 μl de NaCl al 0.9%, y 0.4 ml de SSBH. Se incubó durante 30 min. a 37°C; posteriormente la suspensión se lavó tres veces con SSBH y los globulos rojos se resuspendieron en medio de cultivo (RPMI 1640, GIBCO, N.Y.) [suplementado con suero fetal de ternera (SFT, GIBCO, N.Y.) al 10%] penicilina (10 u.i./ ml) y estreptomycin (1 mg/ml).

Envejecimiento de las células blanco. Los eritrocitos suspendidos en solución de Alsever se dejaron almacenados a 4°C durante 2 meses. Después de este lapso las células lisadas se eliminaron por centrifugación y las células restantes se consideraron eritrocitos viejos. En algunos experimentos las subpoblaciones de eritrocitos fueron separadas por flotación diferencial (63), en una centrífuga a 15°C a 2000 × g por una hora. La parte superior del paquete celular se consideró compuesta fundamentalmente, por células jóvenes y las del fondo por eritrocitos viejos (64).

Tratamiento enzimático de las células blanco. Después de haber sido marcados con el isótopo radiactivo, alícuotas de eritrocitos se incubaron a 37°C por 30 min en SSBH, con las siguientes enzimas: Tripsina (Merck, tipo III), 100 µg por cada 20 µl de paquete de eritrocitos; Sialidasa (N acetil-neuraminidasa, Sigma), 50 unidades por cada 20 µl de paquete Pronasa (Sigma); Papaína (Merck) y amilasa (Sigma), 1 mg por 0.5 ml de paquete de eritrocitos. La digestión fue terminada por enfriamiento a 4°C. Las células se lavaron tres veces con SSBH, se resuspendieron en medio de cultivo y se ajustaron a una concentración de 5×10^6 células por ml ..

Sueros y factores séricos. El suero fetal de ternera (SFT) se inactivó a 56°C por 30 min en baño María para eliminar las opsoninas dependientes de complemento (C3b). La adsorción con los eritrocitos respectivos, para eliminar anticuerpos heterófilos, se llevo a cabo mezclando un volumen de células con dos volúmenes de suero. Esta mezcla se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Los eritrocitos se removieron por centrifugación a 1000 r.p.m., por 5 minutos.

El suero homólogo de ratón para ser empleado en algunos experimentos se dializó contra un litro de agua; el difusado (lo que queda fuera de la bolsa de diálisis) se concentró por liofilización, y se resuspendió en solución salina para su uso. Diferentes cantidades de este material se pasaron a través de una columna de Sephadex G-25 calibrada con PBS (solución balanceada de fosfatos) pH 7.2; esta solución también fue usada como eluyente. Se colectaron fracciones de 5.0 ml cuya densidad óptica fue determinada a 280 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro (Zeiss).

En los casos en los que no se utilizó suero o factores séricos, se

uso un suplemento de suero (SS), para mantener la mono capa de macrófagos adheridos al vidrio. Este sustituto nutricional y de presión oncótica tiene la siguiente composición: lactoalbúmina hidrolizada (Difco) 4.7 g; glicógeno de ostra (Merck), 1.0 g; polivinil pirrolidona (Merck), 0.75g; L-glutamina (Merck), 20mg; pantotenato de calcio (Merck), 10 mg; agua destilada, 100ml . Se preparó de acuerdo al método de Stuart (65) utilizando concentraciones similares a las del suero.

Células fagocíticas. A los animales donadores de las células blanco homólogas (ratón), se procedió a inyectarla en la cavidad peritoneal 5.0 ml de SSBH con heparina (1 u./ml). El líquido se recuperó con pipetas de transferencia a través de un orificio abierto en el peritoneo parietal y se colectó en tubos de plástico (Falcon). Esta suspensión se centrifugó a 1000 r.p.m. por 5 min. El paquete de células se suspendió en 1.0 ml de NH_4Cl al 0.89% y se incubó a 37°C por 5 minutos para eliminar los eritrocitos contaminantes; posteriormente las células se lavaron tres veces con SSBH. De las células obtenidas de esta manera aproximadamente el 80% son macrófagos; y el resto son granulocitos y linfocitos (65). Para eliminar éstas últimas, las células peritoneales se resuspendieron en medio de cultivo, se ajustaron a 2×10^6 células/ml y se adicionaron a tubos de vidrio de fondo plano (1.0 ml/tubo) para permitir adhesión de los macrófagos por incubación a 37°C en atmosfera húmeda y con una mezcla de aire (95%) y CO_2 (5%) durante 3 horas. Después de este tiempo, las células no adheridas se eliminaron mediante lavado exhaustivo con SSBH, quedando las células adherentes constituidas en un 95% por macrófagos, de acuerdo a la observación microscópica. En algunos tubos se colocó en el fondo un cubreobjetos con la finalidad de observar y comprobar mediante microscopía la adhesión de macrófagos y la fagocitosis de eritrocitos como control del índice fagocítico obtenido con eritrocitos marcados con ^{51}Cr .

Ensayo de fagocitosis. Eritrocitos marcados y tratados o sin tratar con enzimas se suspendieron en 450 μl de medio de cultivo al que se agregó 50 μl del suero utilizado o alguna de las fracciones del suero obtenidas por cromatografía, según las condiciones experimentales. La suspensión se agregó al cultivo de macrófagos. En los casos en los que no se empleó suero se adicionó suplemento de suero, como sustituto. Esta mezcla

se dejó incubar durante 45 minutos en condiciones de cultivo. Pasado este tiempo, se eliminaron las células no adheridas o no fagocitadas por los macrófagos mediante lavado cuidadoso y exhaustivo con SSBH. Después de esto, a los tubos con eritrocitos marcados con ^{51}Cr se les agregó 500 μl de NaOH, 0.5 N, para desprender las células del fondo del tubo, una alícuota de 100 μl de esta mezcla, se utilizó para medir la radioactividad (cuentas por minuto, c.p.m.) en un contador de radiaciones gamma (Packard). Se determinó, además, el número de c.p.m. emitidas por una cantidad conocida de eritrocitos; esto permitió calcular el número de c.p.m. que corresponde a cada eritrocito, con lo cual se pudo calcular el número de eritrocitos adheridos y fagocitados por macrófagos, conociendo el número de macrófagos por tubo. El índice fagocítico se expresó como el número de eritrocitos fagocitados por 100 macrófagos viables.

A los tubos con eritrocitos no marcados y que contenían un cubreobjetos en el fondo, después de remover la solución de SSBH, se les adicionó, 500 μl de metanol absoluto (Merck) y después de 12 horas se realizó la tinción de Giemsa (66).

Obtención de anticuerpos anti-eritrocito de ratón en conejo.

A conejos Nueva Zelanda (adultos jóvenes), se inoculó por vía intravenosa 0.5 ml de una suspensión de eritrocitos de ratón al 2%, una vez por semana durante un mes. Al cabo de este tiempo se sangró por punción de la vena marginal de la oreja, se permitió la coagulación y se extrajo el suero con una pipeta de transferencia. Para conocer la cantidad de anticuerpos en el suero de conejo, se utilizó el método de hemaglutinación (67). Esta reacción inmunológica se efectúa al combinar antígenos particulados con sus anticuerpos específicos. Esta es considerada como una reacción de alta sensibilidad pero no permite la cuantificación exacta de anticuerpos; los resultados se expresan en función de la mayor dilución del suero que permite la observación de un aglutinado; a esta dilución se denomina título del suero. Se utilizó el método de la microtitulación en placas (Falcon) haciendo diluciones seriadas del suero con SSBH. A cada pozo se agregó 50 μl de suero a la dilución correspondiente y 50 μl de una suspensión al 2% de eritrocitos de ratón. En un suero

se detectó un título de 1:260,000, lo que permitió ser considerado como suero hiperimmune; éste fue utilizado para los experimentos en los que se trató a los eritrocitos con anticuerpos.

Purificación de gamma-globulinas de conejo anti-eritrocito de ratón. Se obtuvo suero hiperimmune de conejo (50 ml), y se le adicionó un volumen igual de PBS para diluir las proteínas. Las gamma globulinas se precipitaron con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, al 33% de saturación, según el método de Porter (69). La mezcla se dejó agitando a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente se centrifugó a 2000 r.p.m. por 10 minutos resuspendiendo en el volumen inicial con PBS pH 7.2. Este procedimiento se repitió 3 veces y por fin se dializó por 24 horas para eliminar el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se determinó la concentración de proteínas por el método del reactivo de Folin (68).

Fragmentación enzimática de las gamma-globulinas. Para obtener fragmentos de anticuerpos se utilizó el método de Porter (69) empleando una solución de gamma-globulinas de conejo anti-eritrocito de ratón (6.5 mg/ml) que se incubó en presencia de 25 μg de papaína (Merck) adicionada con 0.12 mg de cisteína y 17.07 mg de EDTA (tetra-acetato de etilendiamina), por 16 horas a 37°C en baño María. La reacción se detuvo por adición de acetato fenil-mercurico (Merck) 1.5 mg y se dializó contra buffer de acetatos 0.01 M por 24 horas.

Cromatografía de intercambio iónico para separar Fc de Fab. En este tipo de cromatografía se necesita de una matriz insoluble a la cual los grupos cargados han sido covalentemente unidos. Los grupos cargados están asociados con los iones contrarios. Estos iones contrarios pueden ser reversiblemente cambiados con otros iones de la misma carga sin alterar la matriz. En este tipo de cromatografía las moléculas del soluto son separadas en base a las diferencias de comportamiento ácido-base. Los intercambiadores pueden ser catiónicos o aniónicos. En este procedimiento de separación de fragmentos de anticuerpos se usó como matriz Carboxi Metil-Celulosa (CMC) de acuerdo al método descrito por Porter y Edelmann (69). Esta se empacó en una columna de 1.5 x 50 cm y se le agregó 10 ml de la mezcla de fragmentos obtenida por digestión papainica. Se

eluyó con un gradiente de acetato de sodio de 0.01 a 0.5 M, pH 5.5. Se obtuvieron fracciones de 5.0 ml y se monitoreo con un registrador LKB. El fragmento Fab (fragmento de la región amino terminal de los anticuerpos y que contiene el sitio de unión con el antígeno) se obtuvo en el primer pico y se determinó su actividad ensayando la inhibición de la hemaglutinación con suero completo. Las fracciones restantes, conteniendo los demás fragmentos de las inmunoglobulinas (Fc), no fueron utilizadas.

Adsorción del suero o fracciones de inmunoglobulinas. La eliminación de los anticuerpos (o sus fracciones con actividad para unirse al antígeno, Fab) dirigidos contra determinantes antigénicos de componentes celulares, se realizó mediante adsorción incubando células y suero. Las células hepáticas, esplénicas o renales de ratón utilizadas para adsorber suero de conejo anti-eritrocito de ratón fueron obtenidos mediante la disociación del órgano respectivo a través de una malla fina de acero inoxidable. Las células en suspensión fueron sometidas a choque osmótico con agua destilada esteril para eliminar a los eritrocitos contaminantes. El paquete celular obtenido por centrifugación con SSBH se mezcló volúmen a volúmen con el suero previamente inactivado a 56°C por 30 minutos y se dejó incubar por 1 hora, con agitación intermitente a temperatura ambiente. Después de la adsorción, el suero se separó del paquete por centrifugación a 300 × g durante 10 minutos.

La adsorción de sueros con eritrocitos fue también volúmen a volúmen a 4°C con agitación durante 24 horas. El suero se separó por centrifugación a 150 × g por 15 minutos.

RESULTADOS.

Determinación de la actividad específica del ^{51}Cr necesaria

para el marcado de eritrocitos. Para determinar las condiciones adecuadas en las que debería llevarse a cabo el registro de fagocitosis se procedió a establecer la cantidad de ^{51}Cr que se adicionaría a los eritrocitos para obtener una marca adecuada, estas células fueron incubadas (al 10% en SSBH) con diferentes concentraciones de $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ (cromato de sodio). Así se pudo apreciar la cantidad de marca que incorporan y detienen los eritrocitos ante distintas actividades específicas del isótopo. En la fig. 1 se aprecia esta variación y permite observar que la cantidad de marca tanto en los eritrocitos de camero como en los de ratón esta en relación lineal con la actividad específica usada en microuries por ml ($\mu\text{Ci/ml}$).

Para determinar la cantidad de ^{51}Cr que se emplearía en los experimentos se consideró, entonces, que ésta debería ser lo suficientemente alta como para que al ser detectada permitiera evaluaciones estadísticas, y a su vez no representara un gasto excesivo de material radiactivo. La cantidad escogida bajo este criterio, fue de $20 \mu\text{Ci}/2 \times 10^7$ eritrocitos (1.0 ml).

Estas células no sufrieron cambios tóxicos visibles ante tal concentración de $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$.

Determinación del tiempo óptimo de incubación para la fagocitosis

Células peritoneales adherentes de ratón (1×10^6 por tubo) fueron incubadas por distintos lapsos de tiempo con 2×10^7 eritrocitos de camero en presencia de SFT adsorbido e inactivado. Al cabo de cada incubación se determino el índice fagocítico (i.f.) y se estableció así el tiempo necesario para permitir la máxima fagocitosis. La fig. 2 muestra la variación del i.f. en el tiempo, si se permite la interacción de las células fagocíticas con eritrocitos heterólogos en sistema de cultivo de células. Aunque el índice fagocítico era ligeramente mayor a las 2 horas de incubación, la diferencia no fue estadísticamente significativa en relación promedio de la primera hora.

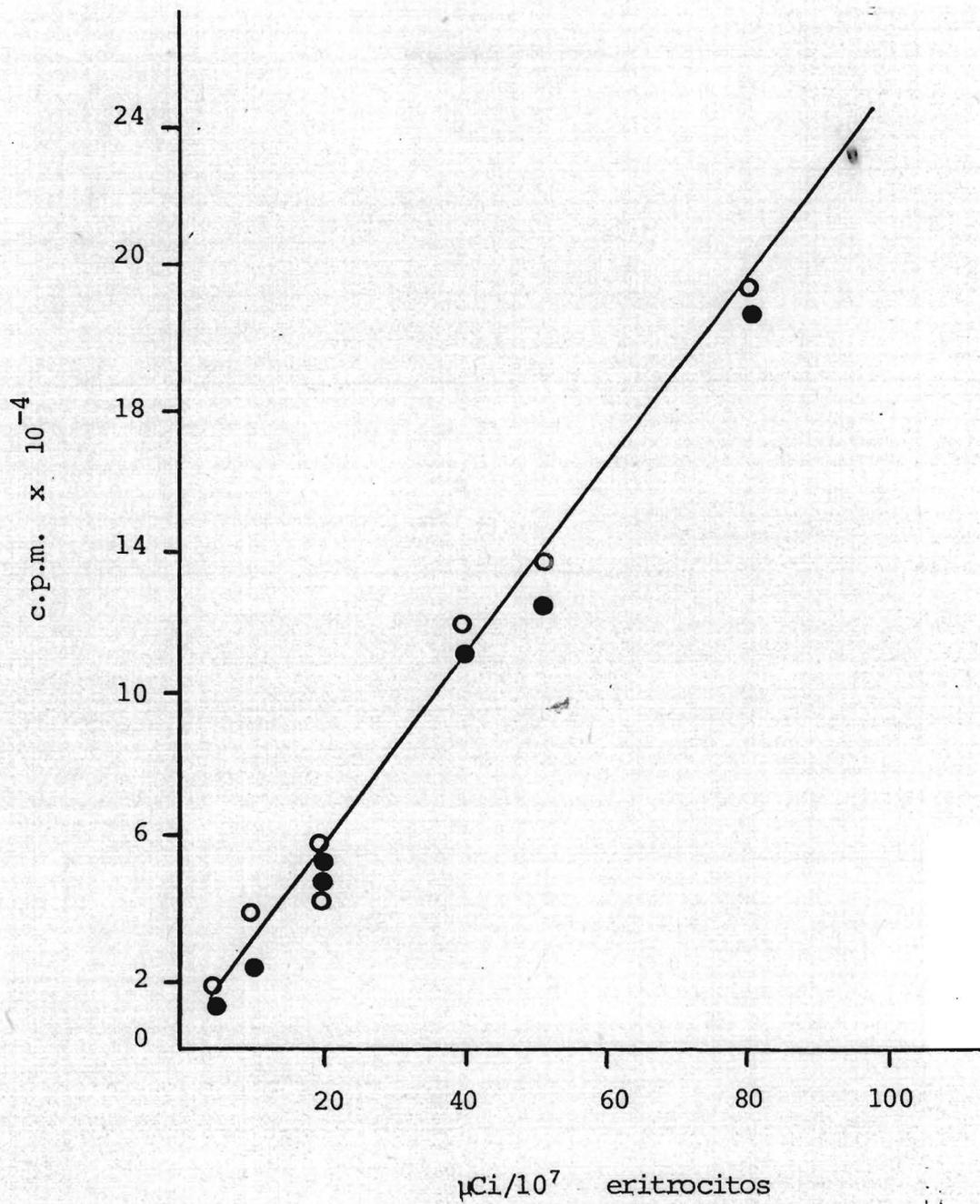


Figura 1. Determinación de la variación en la cantidad de marca incorporada a eritrocitos de carnero (●) o de ratón (○) en relación con la actividad específica de ^{51}Cr ($\mu\text{Ci}/\text{ml}$) usada. La concentración que se utilizó en los subsiguientes experimentos fue de $20 \mu\text{Ci}/\text{ml}$.

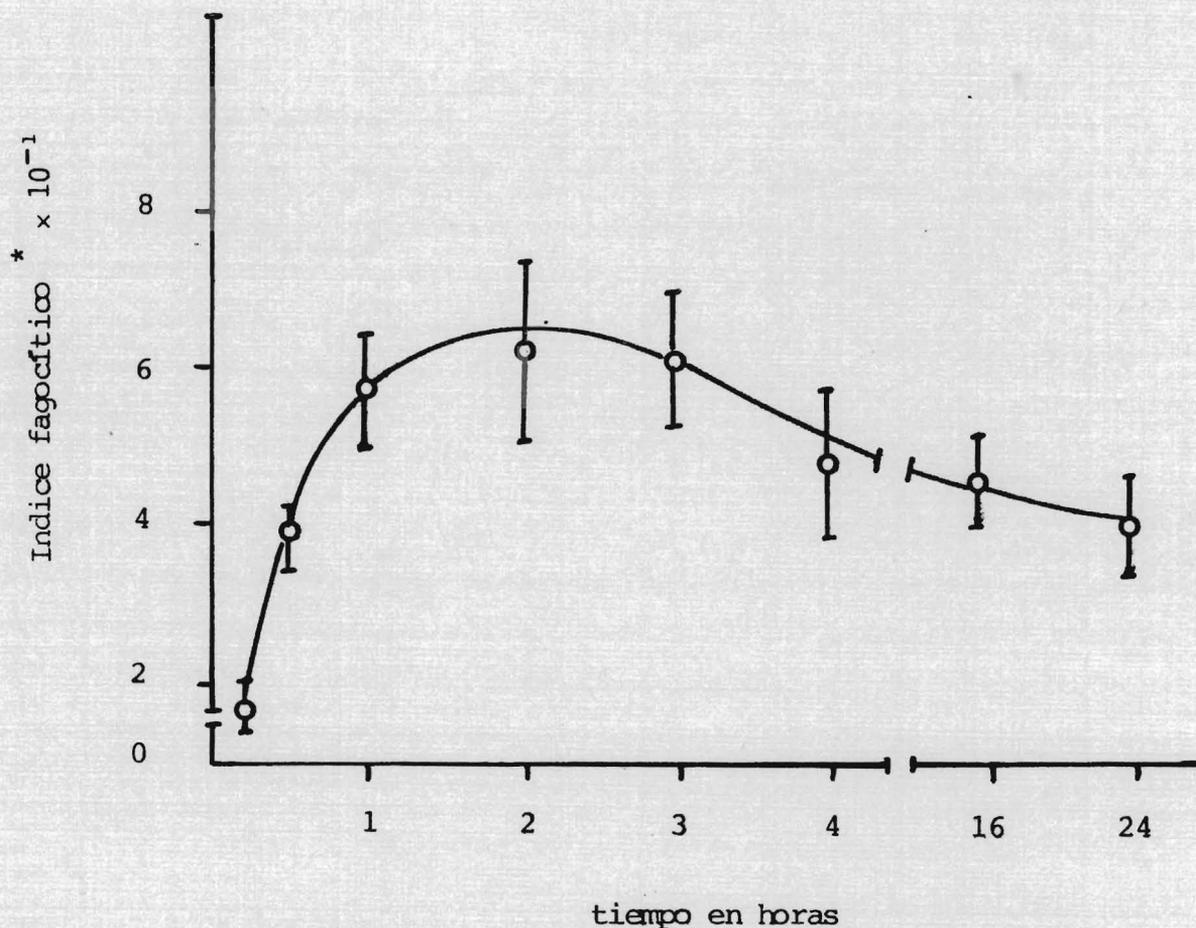


Figura 2. Fagocitosis de eritrocitos de carnero por macrófagos de ratón, a diferentes períodos de tiempo de incubación en condiciones de cultivo. Se observa que a las dos horas de incubación se alcanza el mayor índice fagocítico (* I. f = número de globulos rojos de diferentes especies adheridos o fagocitados por 100 macrófagos). Sin embargo, no hay diferencia estadística con la primera hora, por lo cual se determinó que una hora era tiempo suficiente para examinar la fagocitosis.

Deteminación de la relación óptima macrófago-eritrocito

(MØ/e) para permitir el grado más alto de fagocitosis. Distintas cantidades de eritrocitos fueron incubados con una misma cantidad de macrófagos (MØ). La fig. 3 muestra que el mejor índice fagocítico se puede alcanzar a partir de la relación MØ/ e de 1/10.

Fagocitosis de eritrocitos de diferentes especies. La fagocitosis de células xenogénicas por parte de macrófagos normales en ausencia de anticuerpos es un hecho múltiples veces reportado (28,70,71,72). En este experimento se examinó comparativamente la fagocitosis de células rojas de diferentes mamíferos, por macrófagos peritoneales de ratón en la monocapa, en presencia de SFT adsorbido e inactivado. En la fig. 4 se apreciaban las diferencias al observarse microscópicamente. Estas se representan graficamente en la fig. 5. En los experimentos control (MØ y eritrocitos de ratón) la fagocitosis no fue la esperada por los macrófagos en porcentajes casi similares a la de ciertas células xenogénicas como hamster y rata y ligeramente menor en burro. Considerando que este resultado no es compatible con lo que se espera que ocurra *in vivo*, se agregó al cultivo suero autólogo con la intención de semejar las condiciones *in vivo*. La fig. 6 presenta el índice fagocítico de eritrocitos de diferentes especies (incluyendo ratón) por macrófagos normales de ratón (MNR) en presencia o ausencia de suero normal de ratón (SNR); cuando éste no se añadió al cultivo se utilizó suplemento de suero (SS) en la misma concentración. Aparentemente no existe correlación entre la magnitud de la fagocitosis y la distancia en la escala filogenética. La fagocitosis de células rojas xenogénicas es ligeramente mayor en presencia de suero que en su ausencia. La fagocitosis de eritrocitos autólogos es anulada por SNR. La diferencia se aprecia en la fotografía de la fig. 7. Las modificaciones que se producen en el índice fagocítico por presencia de diferentes concentraciones de SNR, suero fetal de ternera (SFT) y SS se aprecian en la fig. 8. Se observa la dependencia de la dosis para su actividad biológica. La fagocitosis de eritrocitos autólogos se incrementa cuando el SNR es diluido mientras que la dilución de SFT decrece levemente el índice fagocítico.

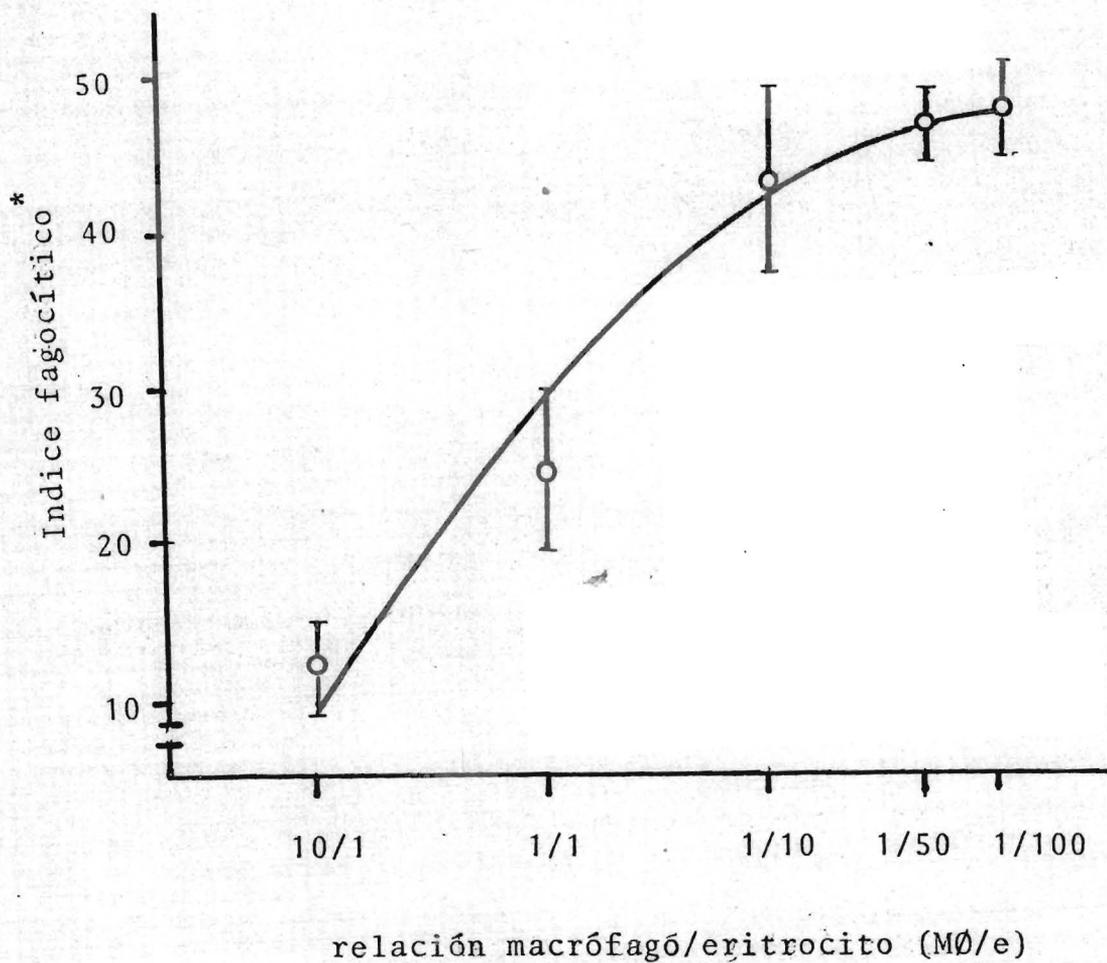
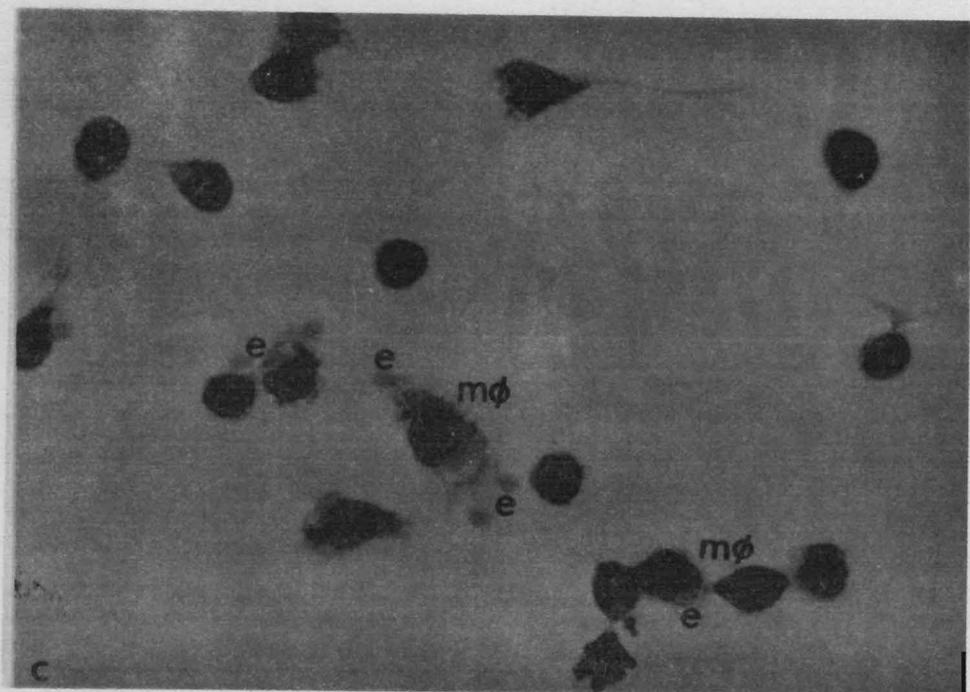
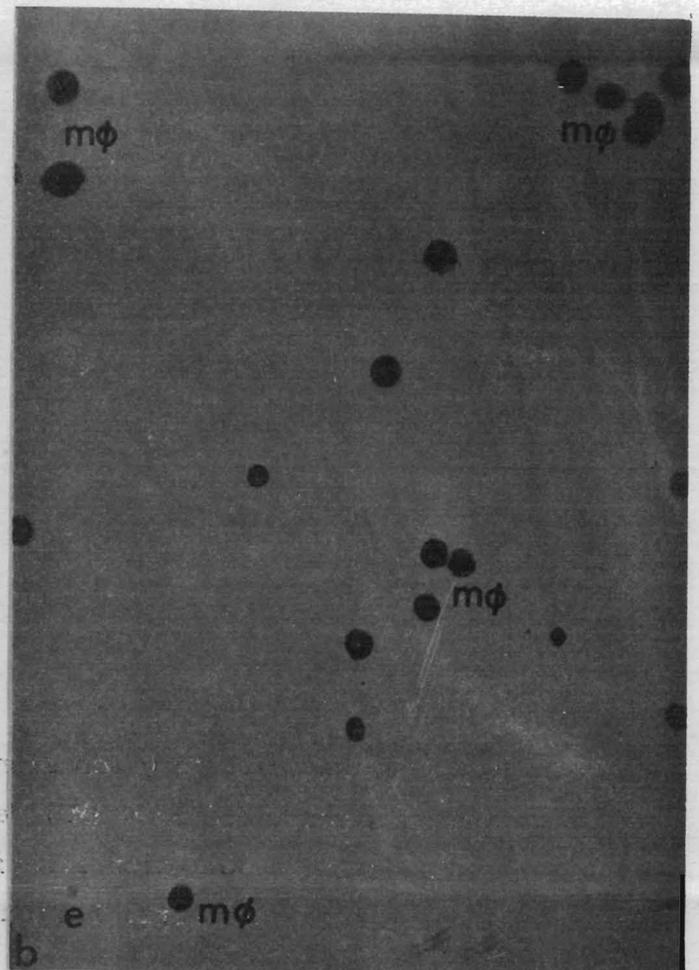
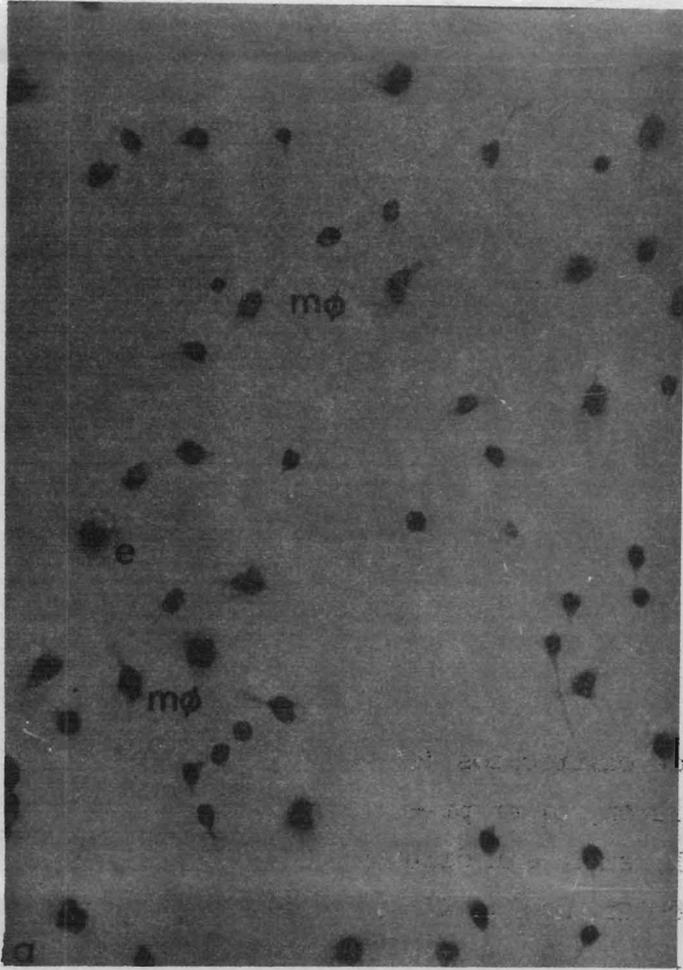


Figura 3. Variación del índice fagocítico cuando se incuban distintas cantidades de eritrocitos con una misma cantidad de macrófagos para determinar la relación óptima entre ambas células. Las cantidades de eritrocitos variaron en términos logarítmicos. La relación de 10 eritrocitos por cada macrófago (10:1) se usó en los siguientes experimentos.

Figura 4. Fagocitosis y adhesión de eritrocitos (e) homólogos por macrófagos (MØ) de ratón, a) en presencia de suero (dilución 1:10); b) suero sin diluir; c) en ausencia de suero. Tinción de Giemsa. (a 40 X, b y c 100 X).



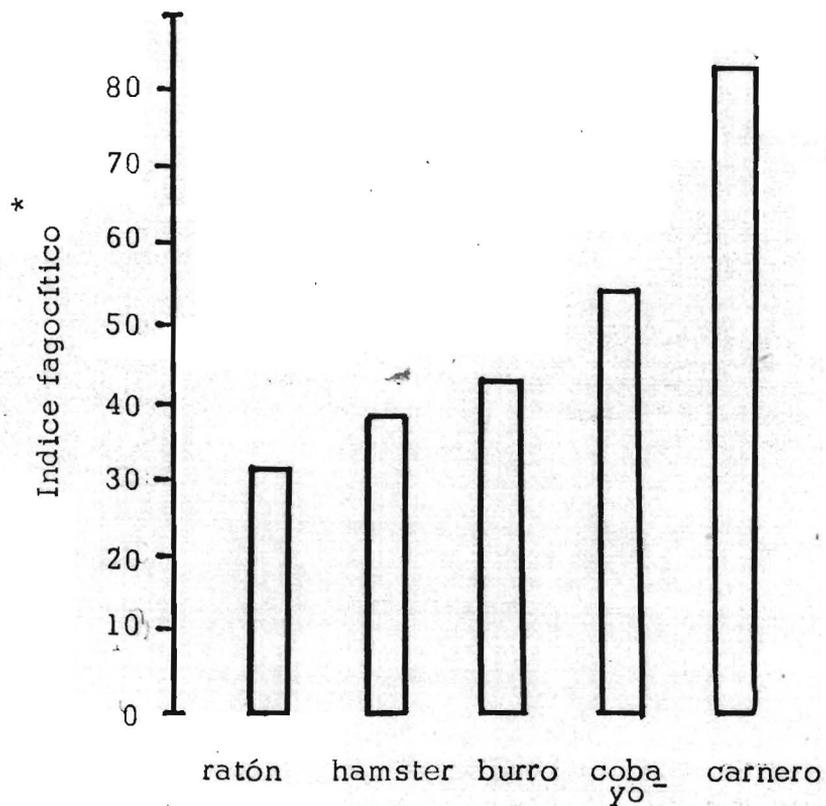


Figura 5. La fagocitosis y adhesión de eritrocitos de diferentes especies en presencia de suero fetal de ternera (SFT) inactivado (56°C , 30 min). El índice fagocítico se incrementa, aparentemente, en cierta relación con la distancia filogenética. En el control (macrófago y eritrocito de ratón) se observa fagocitosis lo cual no es compatible con lo que ocurre in vivo.

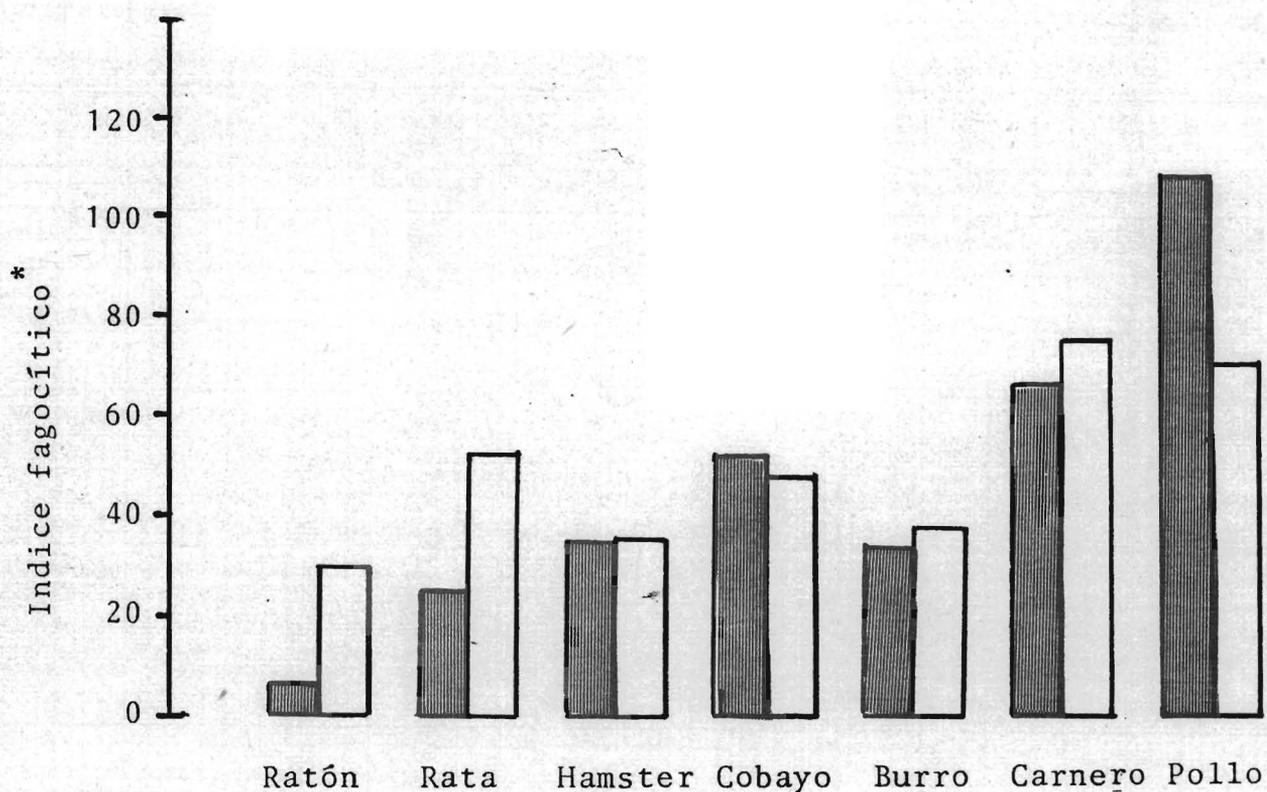
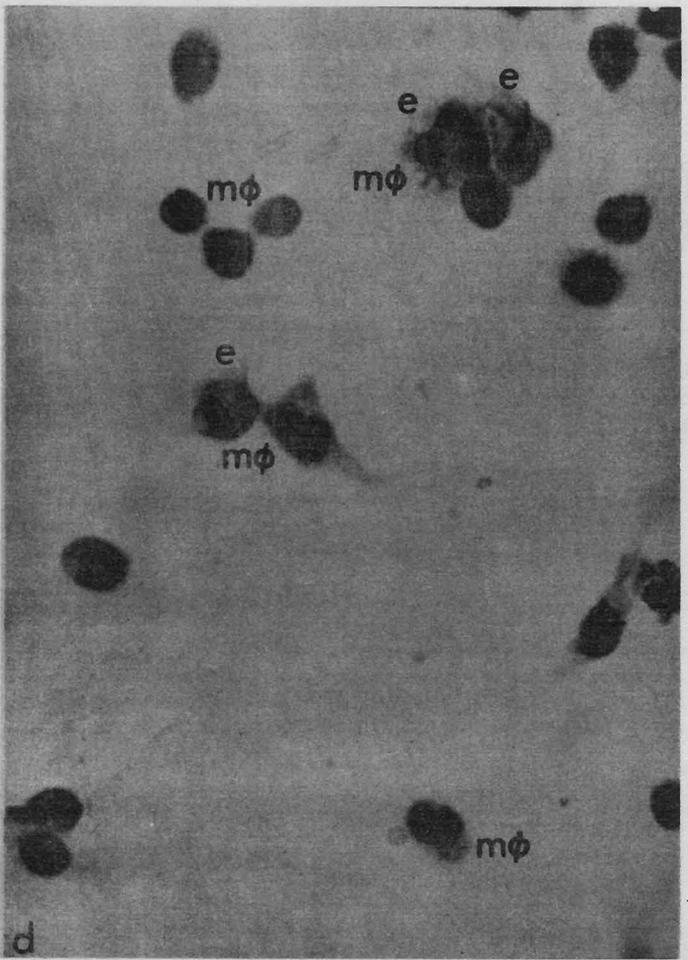
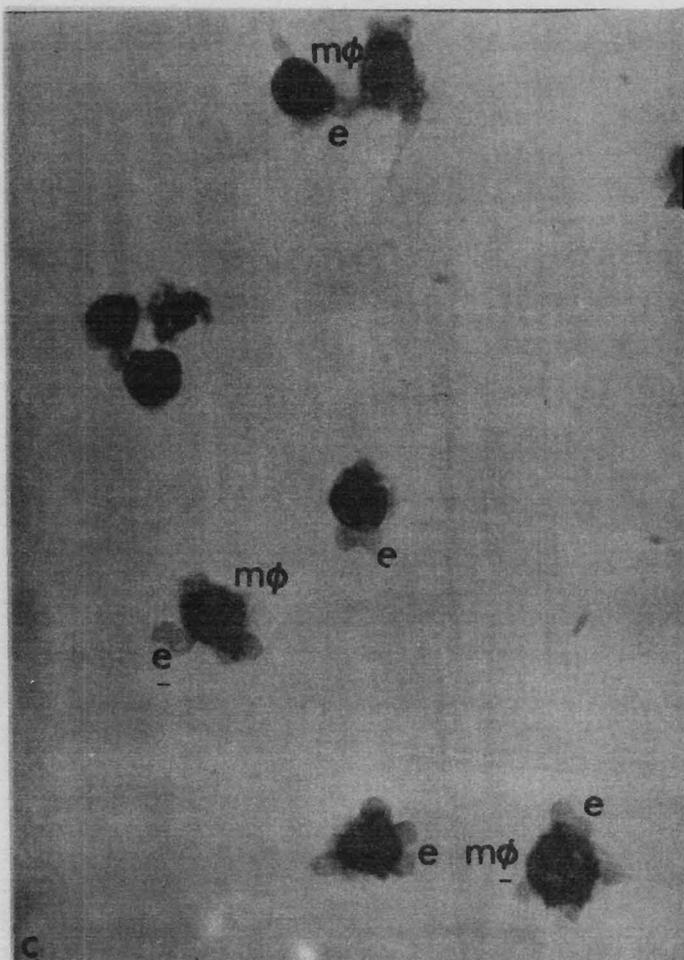
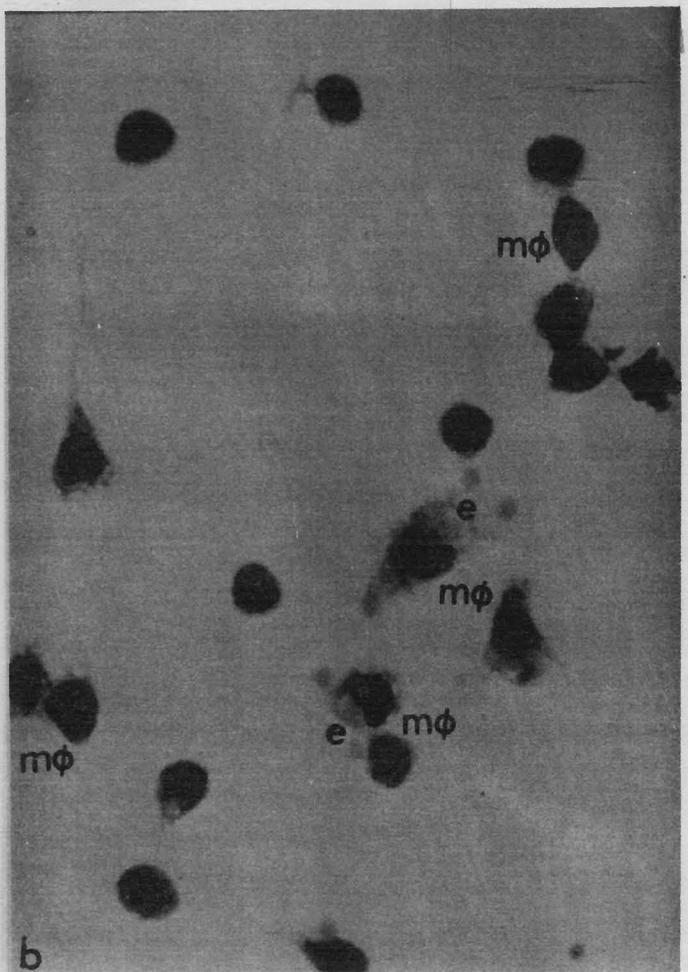
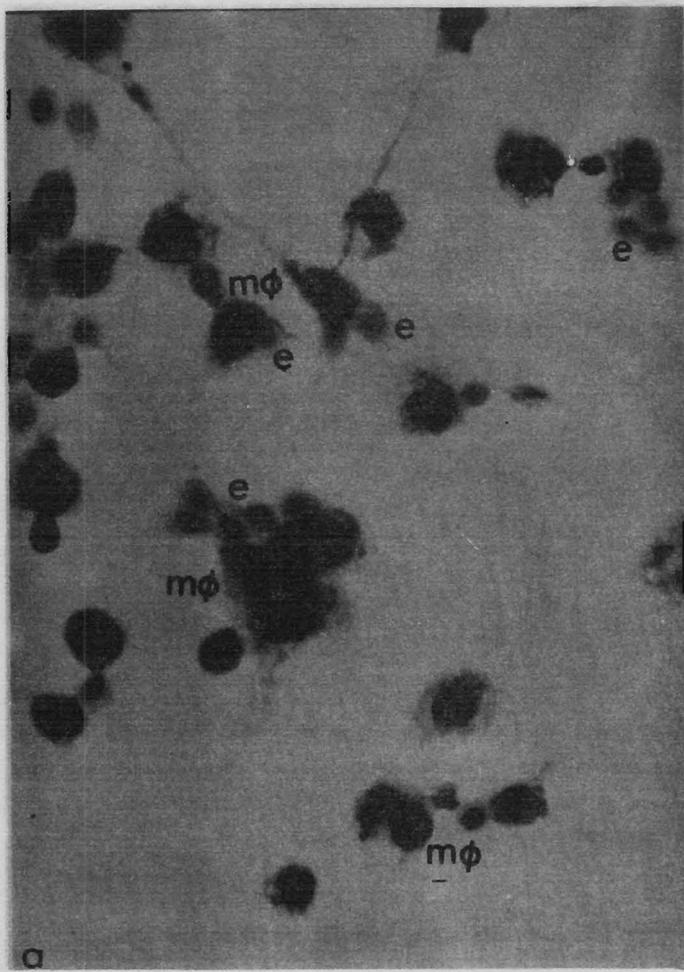


Figura 6. Fagocitosis y adhesión de eritrocitos de diferentes especies (incluyendo ratón) por macrófagos normales de ratón en presencia de suero normal de ratón (▨) o un suplemento libre de suero (□). Se observa que no existen variaciones en la magnitud de la fagocitosis heteróloga en presencia o ausencia de suero normal de ratón (SNR), en cambio la fagocitosis autóloga se reduce considerablemente en su presencia.

Figura 7. Adhesión y fagocitosis de eritrocitos (e) heterólogos por macrófagos (M Ø) de ratón normal. Eritrocitos de pollo (a), hamster (b), camero (c) y rata (d) en presencia de suero de ratón x 100.



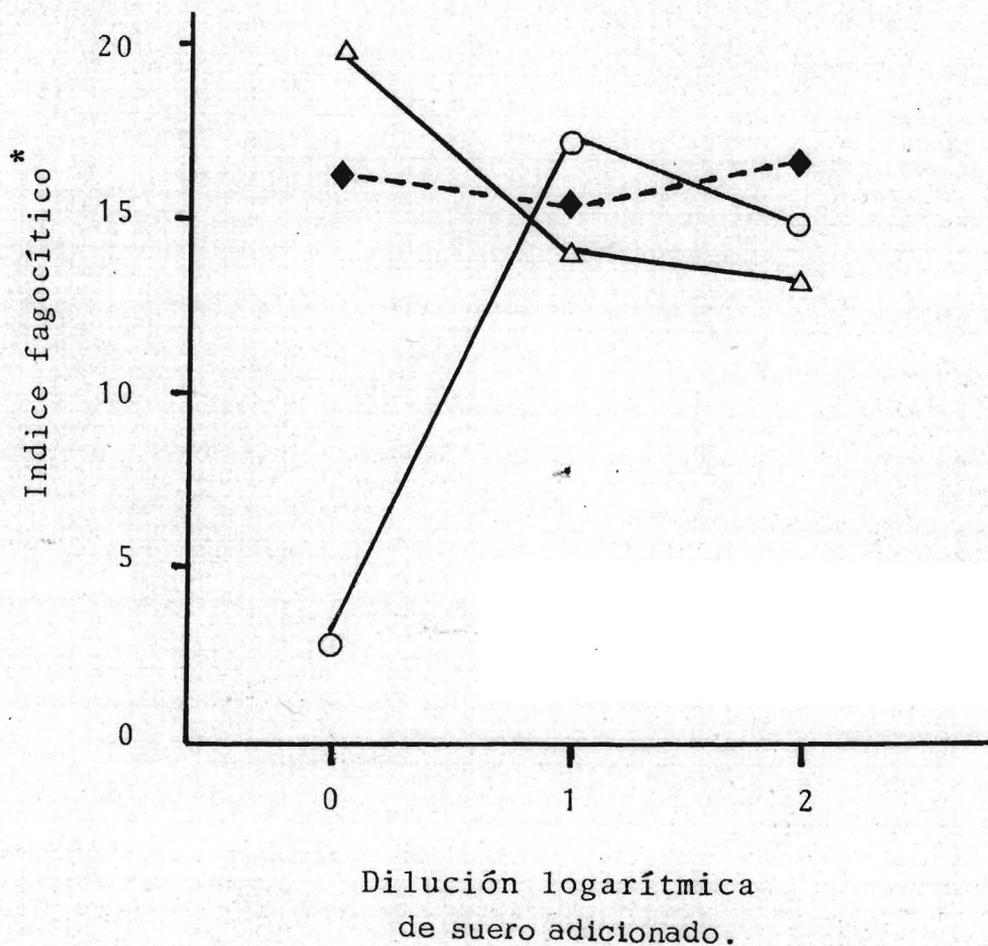


Figura 8. Fagocitosis de eritrocitos de ratón (ER) por macrófagos autólogos en presencia de diferentes concentraciones de SNR (●), SFT (△) o SS (◆). Se aprecia que el índice fagocítico se incrementa al diluir el SNR y que en presencia de SFT disminuye. La fracción más concentrada contiene 10% de SNR.

Tomando en cuenta que este resultado también podría ser la representación *in vivo* de la eliminación de células viejas por macrófagos, *in vivo* (22); se examinó la fagocitosis de eritrocitos murinos jóvenes y viejos en presencia o ausencia de suero homólogo. La fig. 9 presenta la fagocitosis de eritrocitos jóvenes y viejos separados por gradiente de sedimentación. Se observa que células viejas son fagocitadas en grandes cantidades aun en presencia de SNR. De ese modo, parece ser que el suero no previene la eliminación de eritrocitos viejos por macrófagos, en cambio, si previene la fagocitosis de eritrocitos jóvenes.

Para determinar las características de la fagocitosis autóloga en ausencia de suero homólogo se estudio la dependencia de cationes divalentes (Ca^{++} , Mg^{++}) adicionando EDTA a la monocapa. En la fig. 10 se aprecia que estos iones son necesarios para que se lleve a cabo tal fenómeno ya que la fagocitosis es inhibida en presencia de este agente quelante cuya alta afinidad por Ca^{++} es conocida (58).

Caracterización preliminar del factor sérico responsable de la prevención de la fagocitosis autóloga. Para determinar algunos aspectos de la naturaleza del factor responsable, se examinó la actividad de las fracciones obtenidas por diálisis del suero de ratón (cepa CDI). Tanto la fracción retenida como la difundida se probaron en su capacidad para prevenir la fagocitosis. Se encontró que la actividad se localiza en la fracción que difunde, aunque no en la medida encontrada en el suero completo (fig. 11). La fracción retenida aun conserva algo de esta capacidad ya que la fagocitosis es menor que la que ocurre en ausencia de suero.

En la fig. 12 se aprecia el efecto del SNR y las fracciones obtenidas por diálisis sobre la fagocitosis autóloga de eritrocitos envejecidos *in vitro*. Otra vez se demuestra que el suero total no protege a las células envejecidas de la depuración por macrófagos. También se aprecia que el fluido de la exodiálisis conservó la mayor parte de esta actividad y no así el suero dializado. En ausencia de suero se pudo observar otra vez que hay fagocitosis tanto de eritrocitos jóvenes como viejos. La mezcla de la exodiálisis y el suero dializado no reconstituyó su actividad completamente.

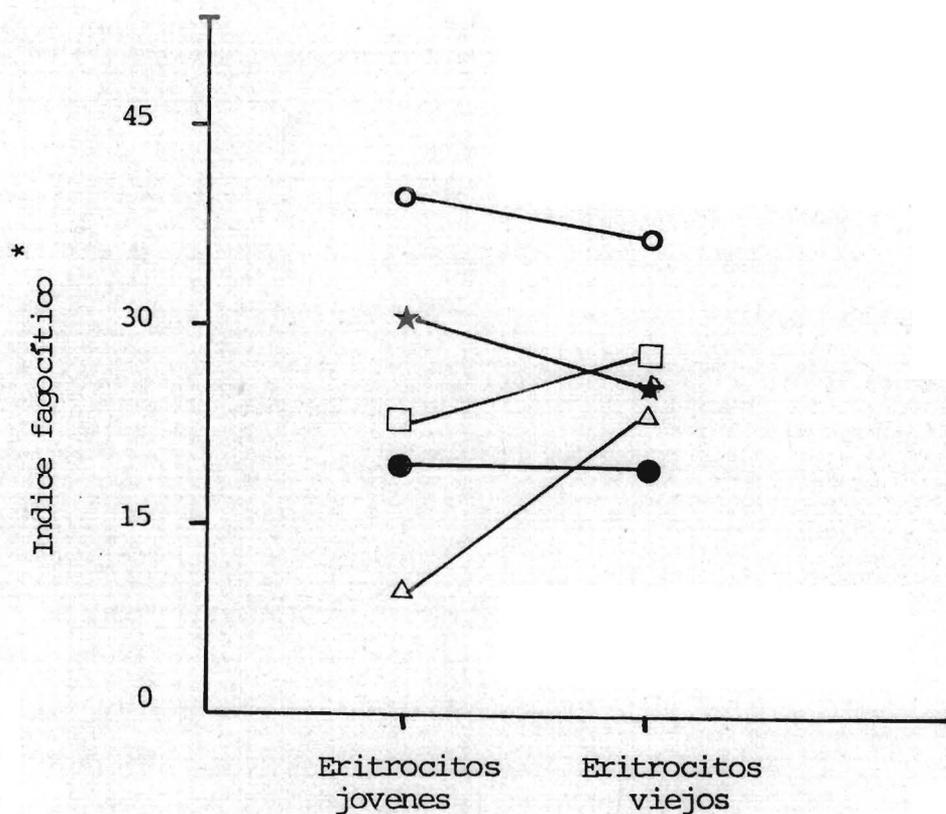


Figura 9. Fagocitosis y adhesión de eritrocitos autólogos viejos y jovenes (separados por gradiente de sedimentación) por macrófagos de ratón en presencia de suero autólogo (Δ) o SS (\star). Se demuestra que en el suero se encuentra un factor de protección para el reconocimiento de células propias, pero que no protege a células envejecidas. El factor es dializable, con peso molecular entre 5,000 a 10,000 k D, este mantiene su efecto protector en la adhesión y fagocitosis de eritrocitos jovenes de ratón (\square). El suero dializado (\circ) pierde esta actividad. La reunión de las dos anteriores (suero dializado + exodiálisis) no restituye totalmente su efecto (\bullet).

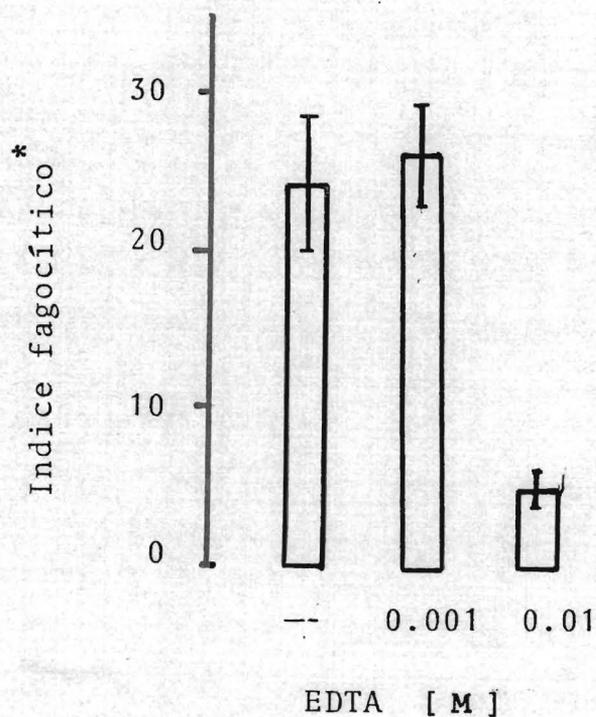


Figura 10. Fagocitosis de eritrocitos de ratón en ausencia de SNR y en presencia de diferentes concentraciones de EDTA. Se observa que éste tipo de adhesión es dependiente de cationes divalentes, pues al disminuir la concentración de éstos disminuye el índice fagocítico.

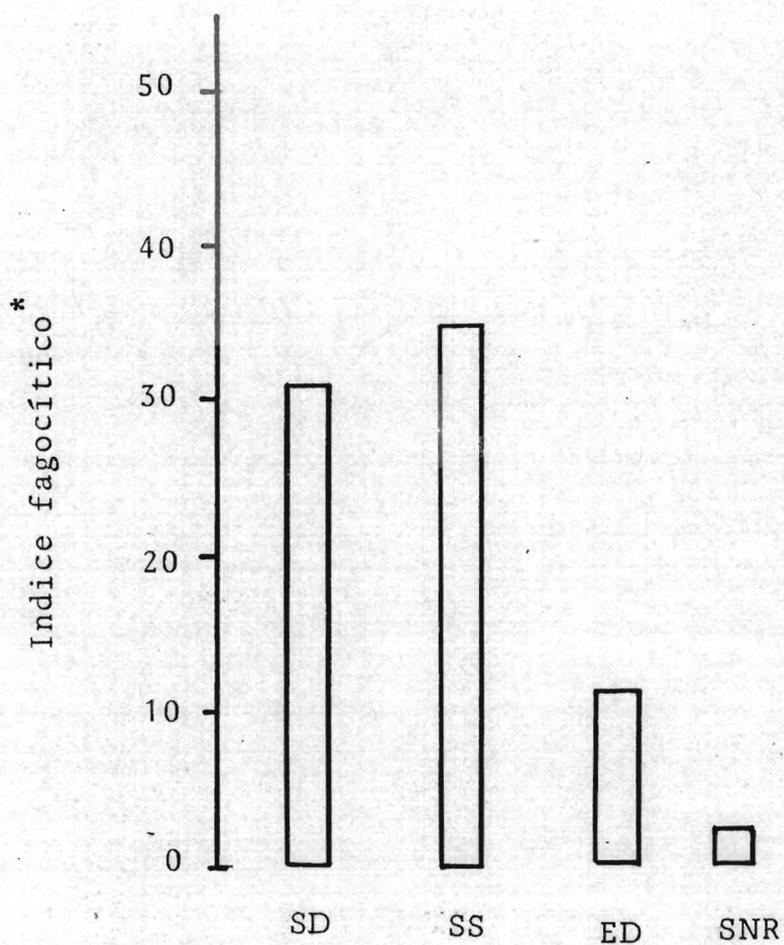


Figura 11. Fagocitosis autóloga en presencia de diferentes fracciones de suero. Cada fracción fue adicionada al 10%; S D = suero dializado; S S = suplemento libre de suero; E D = exodiálisis o difusado; S N R = suero normal de ratón.

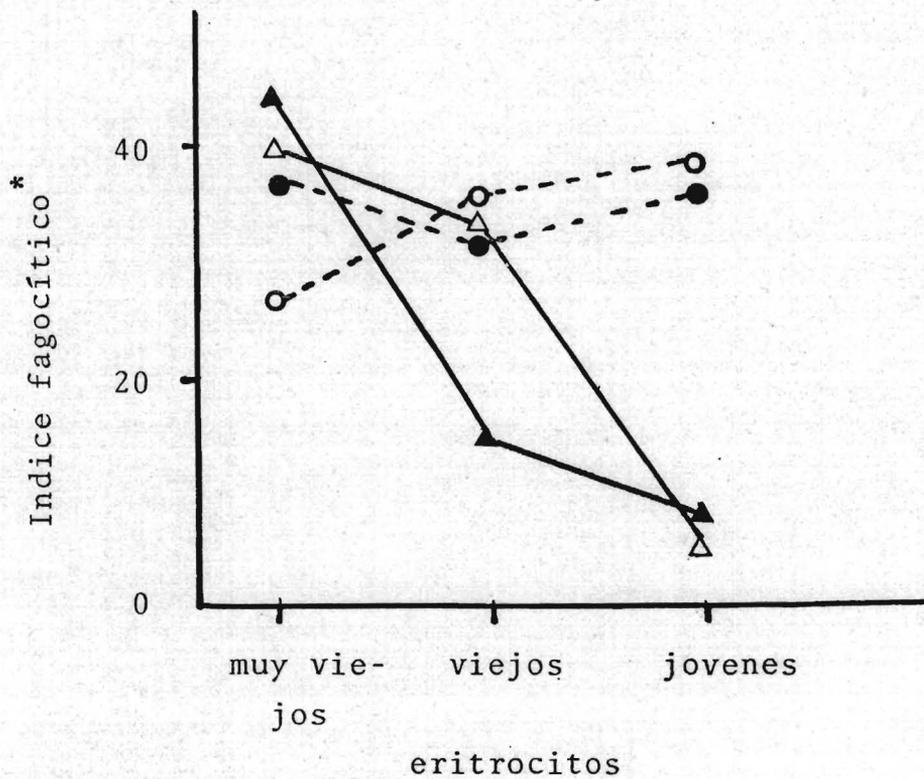


Figura 12. Fagocitosis de eritrocitos, frescos o envejecidos, por macrófagos de ratón en presencia o ausencia de suero y de sus fracciones. Se aprecia que eritrocitos muy viejos (2 meses), viejos (1 mes) y jóvenes (frescos) son fagocitados en presencia de suero autólogo (Δ) o exodiálisis (▲), en diferente magnitud. La fagocitosis en presencia de SS (●) o de suero dializado (○) se mantiene alta para todas las edades.

El fluido difusible (peso molecular menor de 10,000) fue fraccionado por filtración en una columna de Sephadex G-25. En la fig. 13 se muestra el patrón de elución. Al probar la actividad de las fracciones, se encontró que la fracción excluida (peso molecular mayor de 5.000) fue capaz de inhibir el fenómeno de fagocitosis autóloga. Sin embargo, esta fracción (M), aún después de ser concentrada por liofilización, no ejerció un efecto más potente que el del suero completo (fig. 14). En el pico N obtenido en la elución también se detectó cierta actividad preventiva de la fagocitosis. En cambio con la fracción O presenta un índice fagocítico aun mayor que el control sin suero.

Como el suero fue obtenido de animales de una cepa abierta, se examinó la posibilidad de que en éstos existan anticuerpos contra isoantígenos eritrocitarios (grupos sanguíneos) los cuales podrían actuar como opsoninas o como bloqueadores del reconocimiento. Para esto, se exploró la posibilidad de una hemaglutinación cruzada entre los sueros y los eritrocitos de 12 ratones escogidos al azar, de diferente camada pero de la misma edad realizando todas las combinaciones posibles. No se detectó ningún título en los sueros examinados. Lo anterior sugiere que factores séricos tales como aglutininas u opsoninas no intervienen en el reconocimiento por macrófagos y la actividad de lo que denominamos SNR no es por interferencia del reconocimiento por la presencia de los llamados anticuerpos "naturales".

En todos los experimentos subsiguientes destinados a determinar la naturaleza del marcador de "lo propio" en la superficie de los eritrocitos se utilizó el SNR para semejar las condiciones *in vivo*.

Comprobación de la actividad de los anticuerpos y fracciones anti-eritrocito. Al suero obtenido de los conejos inmunizados con eritrocitos de ratón se le determinó el título por medio de la microhemaglutinación. La tabla 1 muestra que este suero tiene características de suero hiperinmune con título de 1:1024. Por otro lado se determinó el título de este suero después de haber sido adsorbido con células hepáticas, esplénicas y renales (de ratón) para eliminar anticuerpos dirigidos contra antígenos comunes a varios tejidos (homotípicos) o contra antígenos de especie. La eficiencia de adsorción se demostró por hemaglutinación comparando los

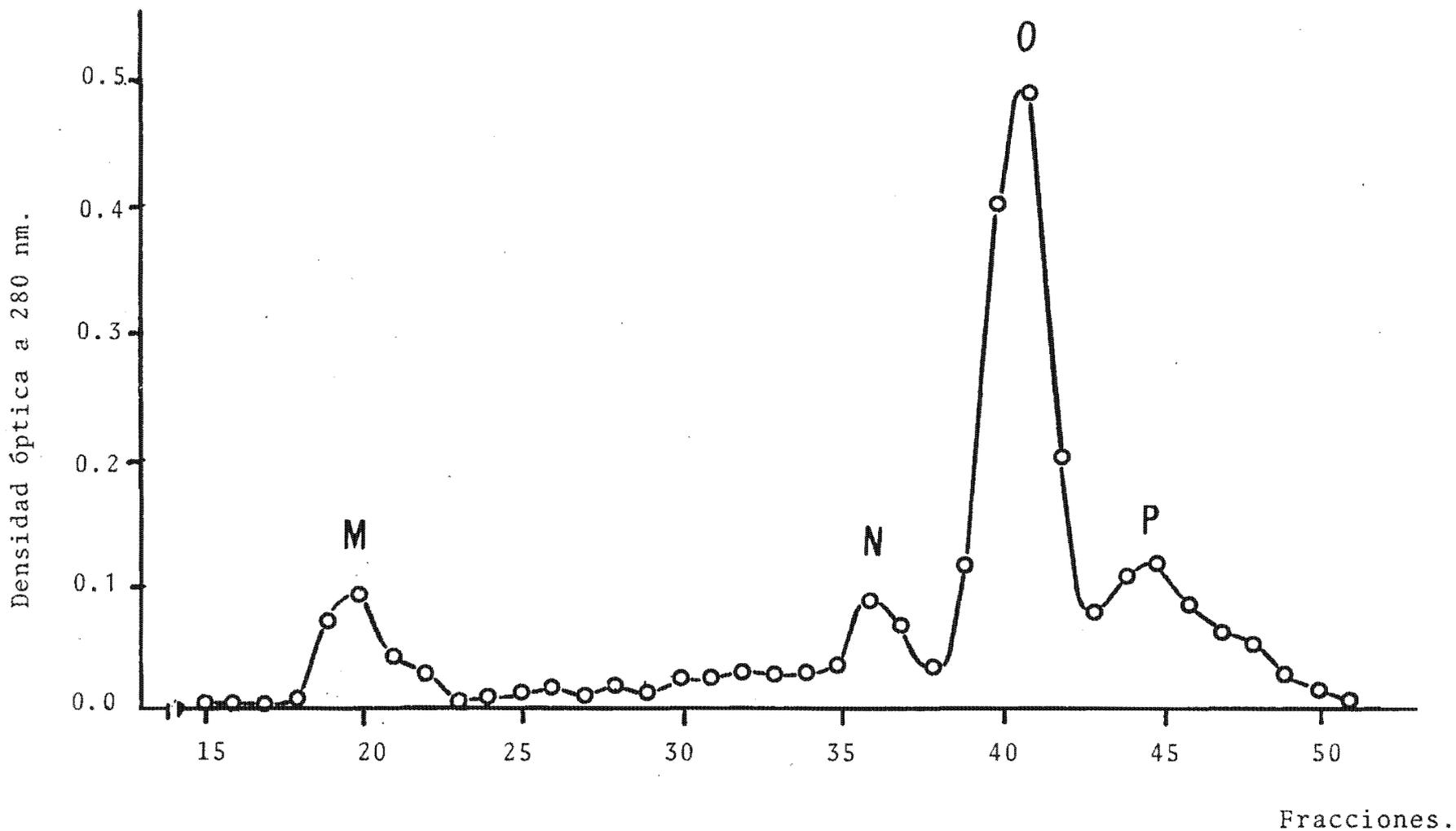


Figura 13. Perfil de elución obtenido de la filtración de la exodíalisis de SNR (ED) por sephadex G-25. Se aprecian 4 picos a los que se les denominó M, N, O y P. El pico M fue obtenido en el volumen de exclusión.

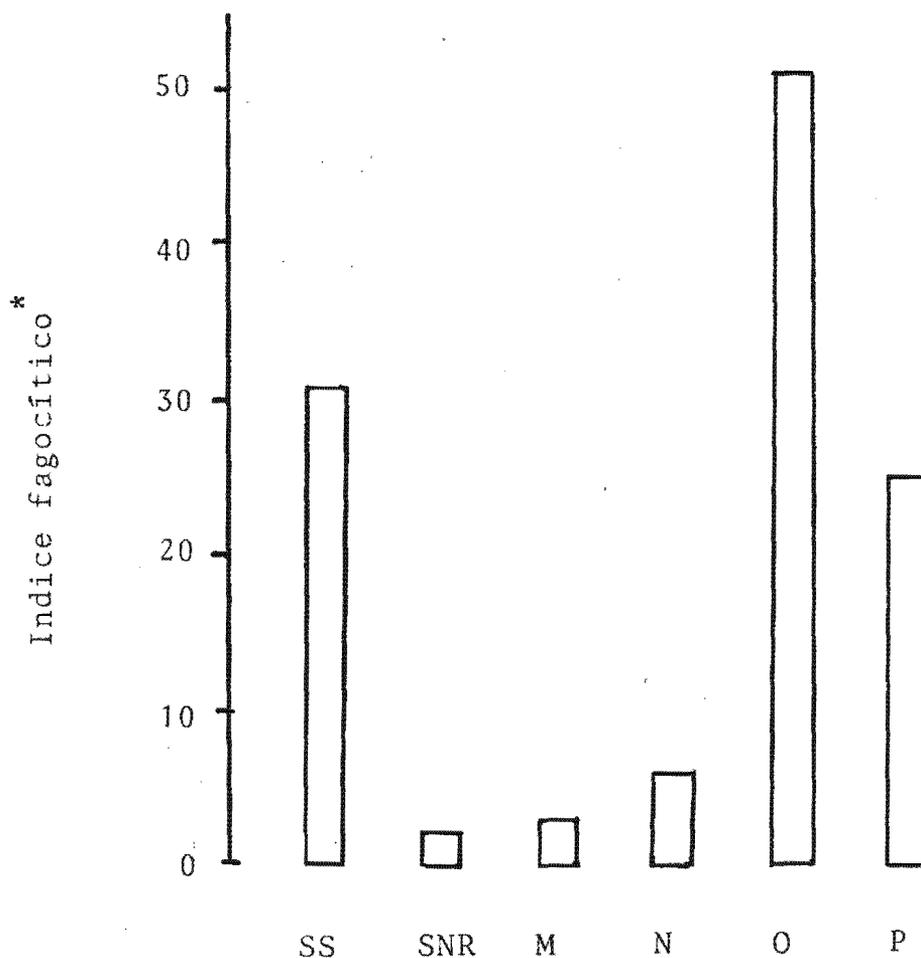


Figura 14. Fagocitosis de eritrocitos autólogos en presencia de diferentes fracciones (M, N, O y P) obtenidas por filtración de ED en sephadex G-25. Se observa que en la fracción M se encuentra el factor protector del reconocimiento ya que el I.F. se compara con el obtenido en presencia de SNR. En cambio en ausencia de suero y con las fracciones O y P la fagocitosis se incrementa. La escasa fagocitosis en presencia del pico N puede deberse a contaminación de M.

T A B L A 1

EFEECTO DE LA ADSORCION DEL SUERO DE CONEJO ANTI-GRR
CON HEPATOCITOS DE RATON.

	<u>Título anti-GRR*</u>	<u>log₂ del título</u>
Suero total	1:1024	10
Suero adsorbido	1:128	7

* El título se determinó por microhemaglutinación

títulos entre el suero completo y el suero adsorbido. La tabla 2 muestra que este suero posee tanto anticuerpos dirigidos contra determinantes antigénicos específicos presentes en eritrocitos como dirigidos contra otros antígenos presentes también en las células hepáticas y esplénicas, ya que en el suero adsorbido se aprecia una disminución significativa del título en comparación con el suero completo. A partir de este suero se obtuvieron gammaglobulina por precipitación de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ las cuales fueron sometidas a digestión papáinica para obtener fragmentos Fab parte de la molécula del anticuerpo que contiene el sitio activo por lo que tiene capacidad para unirse al antígeno pero no aglutina porque es monovalente (69) y Fc (parte de la molécula que no contiene el sitio para el antígeno pero conserva algunas otras actividades biológicas como la citofilia) (49). Estos se separaron por cromatografía de intercambio iónico en CMC en cuyo perfil de elución (fig. 15), se observa la presencia de tres picos de los cuales el pico I fue probado para determinar la presencia de fragmento Fab. Para esto se hizo el ensayo de microhemaglutinación y, como se muestra en la tabla 3, este pico no mostro actividad hemaglutinante en cambio sí era capaz de inhibir la hemaglutinación por anticuerpos completos, si previamente era incubado con los eritrocitos. Asimismo, el Fab adsorbido era capaz de disminuir el título tanto del suero total como del adsorbido con células homólogas de distintos tejidos. Lo anterior muestra la existencia de fragmentos Fab con actividad de ligando contra eritrocitos pero con incapacidad para aglutinar, lo que a su vez demuestra su monovalencia y su carencia de actividad como opsonina.

Fagocitosis de eritrocitos homólogos "ferrados" con anticuerpos o Fab anti-eritrocitos de ratón. Con el propósito de interferir con el reconocimiento de los eritrocitos por parte de los macrófagos se procedió a utilizar anticuerpos capaces de reaccionar con estructuras de la superficie de los eritrocitos que a su vez son compartidas por las demás células del organismo, ante la posibilidad de que estas pudieran corresponder al marcador de reconocimiento de "lo propio".

Los eritrocitos fueron incubados con anticuerpos anti-eritrocito obtenidos en conejo. La fig. 16 muestra que al bloquear el marcador con los an

T A B L A 2

Actividad anti-GRR del suero inmune y de las fracciones de Ig obtenidas por digestión con papaína y separación con CMC^a.

	<u>log₂ del título^b</u>	
	<u>no adsorbido</u>	<u>adsorbido^c</u>
suero total	10	7
fracción I	(-)	-
fracción II	(-)	-
fracción III	1	-

- a) el perfil de elución de estas fracciones se aprecia en la fig. 15
- b) el título se determinó por microhemaglutinación
- c) la adsorción fue hecha por incubación con esplenocitos y hepatocitos de ratón normal.

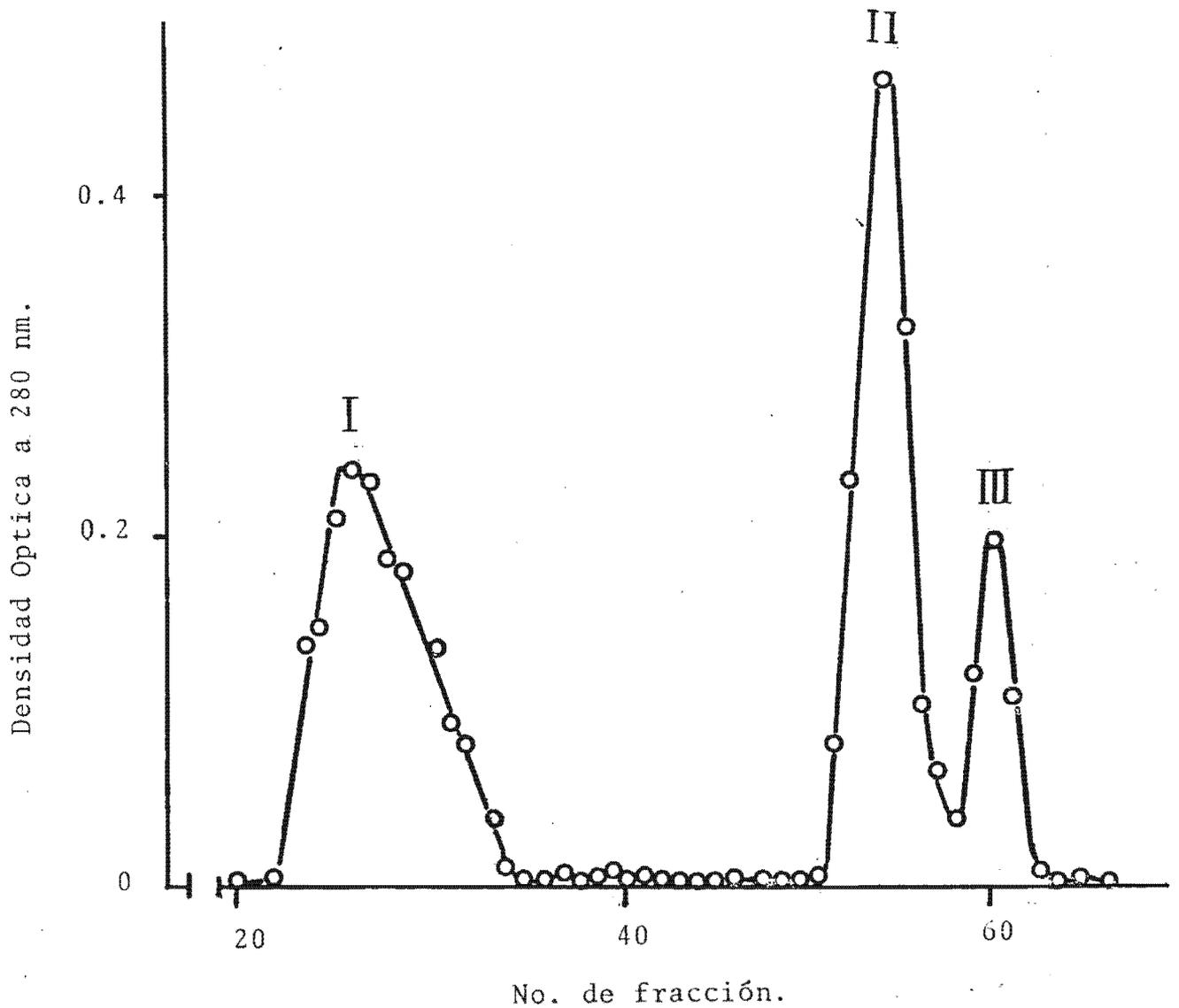


Figura 15. Perfil de elución de γ globulinas de suero de conejo anti-ratón que fueron sometidas a digestión papaínica pasadas por una columna de carboxi-metil celulosa. La elución se realizó con un gradiente de 0.01-0.5 M pH 5.5. Los picos fueron probados para examinar su actividad por microhemaglutinación.

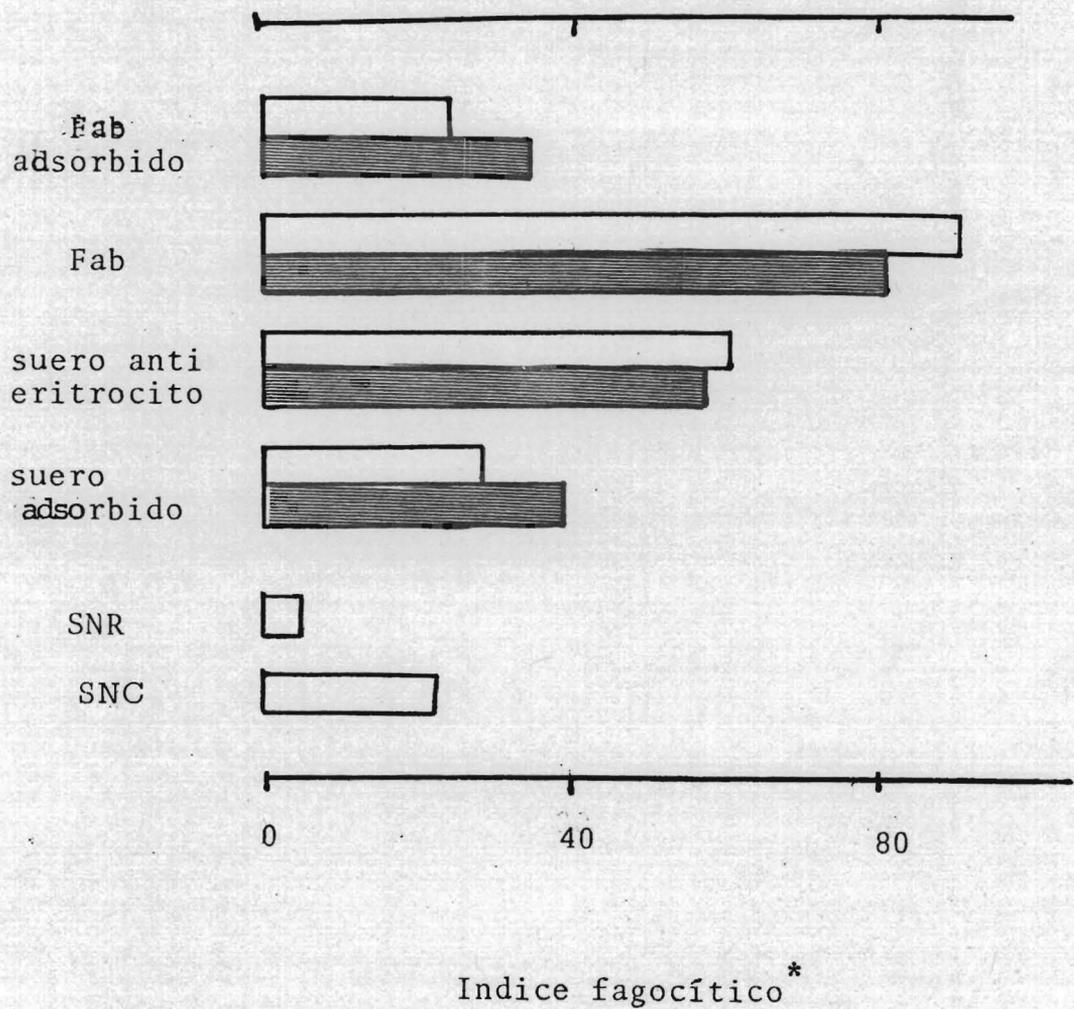


Figura 16. Fagocitosis de eritrocitos de ratón en presencia de inmunoglobulinas obtenidas de suero de conejo anti-eritrocito de ratón. El índice fagocítico se determinó en presencia (□) o ausencia de SNR (▨); SNC = suero normal de conejo.

T A B L A 3

Determinación de la actividad de Fab (I): capacidad de inhibición de la hemaglutinación de GRR por suero de conejo anti-GRR.

log₂ del título anti-GRR en presencia de:

SNR	PBS	Fab I	
		no adsorbido	adsorbido ^a
no adsorbido	10 ^b	5	7
adsorbido	7	4	4

^a La adsorción se realizó mediante incubación con un paquete (0.5 ml) de hepatocitos de ratón.

^b El título se determinó por microhemaglutinación.

ticuerpos se desencadena el proceso fagocítico, lo que refleja una incapacidad de reconocimiento como eritrocitos propios. Sin embargo, este resultado podría deberse a la interacción entre los receptores para Fc en el macrófago (49), y los eritrocitos opsonizados con los anticuerpos específicos, sin mediar ninguna señal o marcador bloqueado. Esta posibilidad pudo excluirse ya que también se observó este efecto cuando se utilizó el fragmento Fab para bloquear tal marcador sin que ocurra el fenómeno de opsonización al no existir Fc en el sistema.

Si los anticuerpos bloquean el reconocimiento de un marcador de "lo propio", esta señal debe necesariamente estar también ubicada en otras células (todas). Por tanto, si el suero de conejo anti-eritrocito es adsorbido con células de otros órganos se retiran los anticuerpos dirigidos contra las estructuras comunes a las células de una especie, entre ellos el marcador. La fig. 16 muestra que la fagocitosis en presencia de suero o Fab adsorbido (los cuales tienen actividad anti-eritrocito) es mínima comparada con la observada con anticuerpos o Fab no adsorbidos.

Efectos de la actividad de diferentes enzimas sobre eritrocitos en la fagocitosis homóloga. Para poder comprobar que el mecanismo de reconocimiento esta mediado por la existencia de una molécula que funciona como marcador de lo propio en la superficie de las células se procedió a tratar a los eritrocitos con diferentes enzimas con la intención de eliminar o alterar el marcador de reconocimiento. Los eritrocitos sometidos a digestión con papaína, tripsina, α -amilasa, pronasa y neuraminidasa, se incubaron con macrófagos en presencia o ausencia de suero homólogo y se determinó el índice fagocítico. La fig. 17 muestra que en presencia de papaína se obtiene una alta fagocitosis aunque también son fagocitados los eritrocitos con α -amilasa y sialidasa. El tratamiento con pronasa no resulto en fagocitosis notable. Lo anterior sugiere que la molécula en cuestión podría ser de naturaleza glicoproteica.

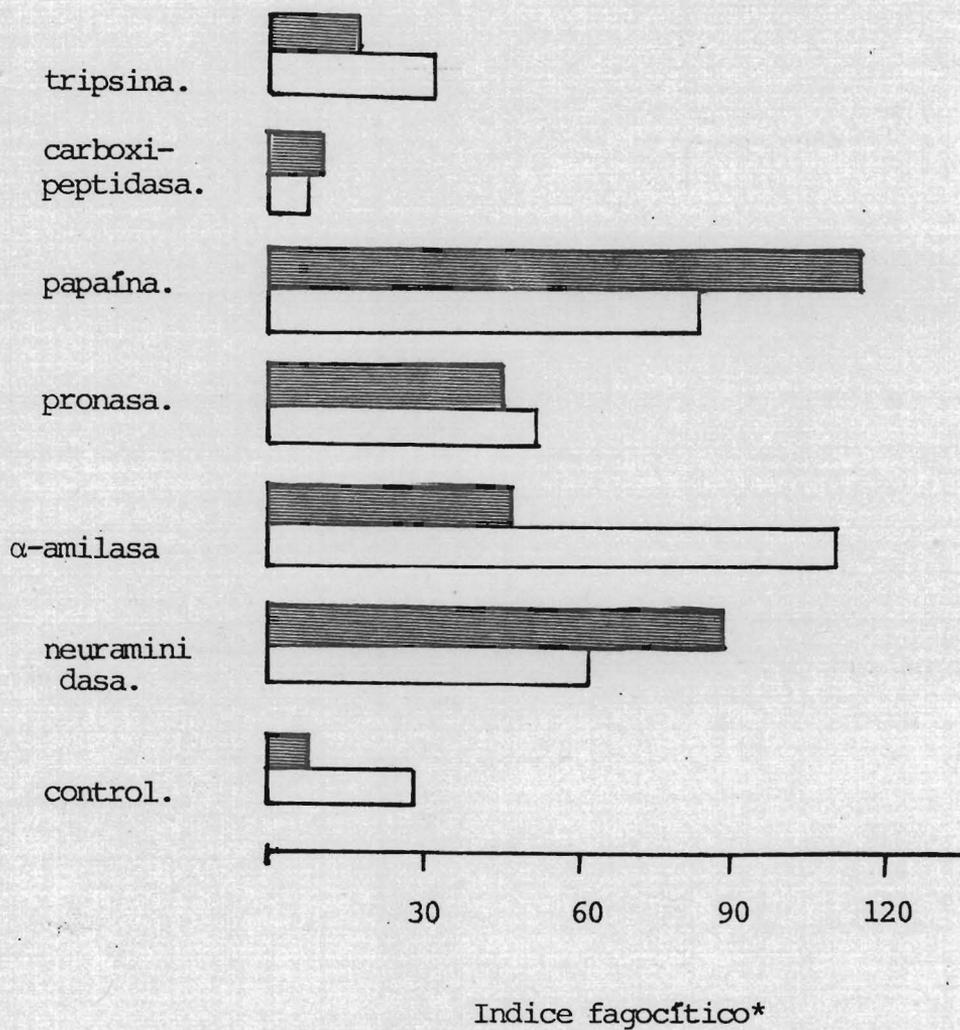


Figura 17. Efecto de la incubación de eritrocitos de ratón con diferentes enzimas, en la fagocitosis autóloga, en presencia (▨) o ausencia (□) de suero autólogo (SNR). La digestión fue realizada por incubación con varias enzimas y las concentraciones usadas fueron previamente reportadas en el tratamiento de eritrocitos.

DISCUSION.

Ningún mecanismo propuesto hasta hoy para explicar el fenómeno de reconocimiento ha sido ampliamente aceptado. Los datos más relevantes y consistentes son aquellos relacionados con la existencia de arreglos moleculares de carbohidratos por un lado y enzimas y receptores que los reconocen por otro (10). Estas interacciones carbohidrato-receptor han sido estudiadas en los sistemas de adhesión (4), en el reconocimiento histotípico (6), xenogénico (8), en la morfogénesis (9), en la histiogénesis (5) y en la agregación de colonias (15). En el caso de reconocimiento propio-extraño las interacciones carbohidrato-receptor han sido propuestas en trabajos aislados (21) y de manera no muy consistente. En sí, el modelo de reconocimiento a través de receptores, en este tipo de discriminación, no ha tenido éxito porque tal planteamiento debía traer consigo la probabilidad de una infinita cantidad de diferentes receptores para reconocer lo extraño ya que el evento consecuente es el atrapamiento del material no propio por parte de las células encargadas de tal discriminación. De hecho, el reconocimiento efectuado por parte del aparato inmune implica la presencia de receptores específicos para moléculas extrañas, pero cada linfocito posee receptores con una sola especificidad, en cambio cada macrófago puede atrapar cualquier partícula extraña.

La posibilidad de la existencia de receptores para componentes propios sin que esto derive en el atrapamiento obliga a plantear simultáneamente la existencia de mecanismos que impliquen al mismo tiempo: el reconocimiento (interacción receptor-marcador) y la separación e inafectibilidad de la célula propia, reconocida como tal, por parte de la célula fagocítica.

Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la posibilidad de la existencia de receptores. Sin embargo, todo indica que el reconocimiento no solo implica relaciones entre componentes celulares de superficie sino que además existen factores solubles que intervienen en este proceso. Hasta ahora los factores solubles que han sido propuestos como parte del reconocimiento fueron los anticuerpos (43). Sin embargo, tratándose del reconocimiento no inmune (antes del establecimiento de una respuesta inmu

ne) esta posibilidad debe ser descartada. Los resultados iniciales en este trabajo mostraron que para que los componentes propios sean reconocidos como tales, se requiere, además, un factor que está presente en el suero, el cual es de bajo peso molecular ya que puede atravesar membranas de diálisis pero se excluye por filtración en G-25 lo que indica que este material tiene un peso entre 5,000 y 10,000 Daltons. Sin embargo, parte de la actividad protectora del suero se conserva en el material no difusible. Esto puede deberse a que tal factor pueda, en parte, estar unido a otras moléculas, de igual o diferente naturaleza lo que podría interferir con su difusibilidad y explicaría a su vez su presencia en el material dializado. También subsiste la posibilidad de que su presencia en el líquido retenido sea por la falta de una diálisis exhaustiva. Aunque no se hicieron experimentos para determinar la naturaleza de este factor, dado su peso molecular, la posibilidad de que sean anticuerpos puede ser excluida. Su papel parece el de coadyuvar con el adecuado reconocimiento por parte del macrófago. No sabemos si esta molécula interactúa con alguna estructura en el macrófago o en la célula blanco, y sea así un puente entre ambas células.

Sin embargo, aunque en ausencia de este factor se incrementa la fagocitosis autóloga, no todos los eritrocitos son atrapados ni todos los macrófagos ejercen esta función. Esto podría deberse a que existen diferentes subpoblaciones de células fagocíticas, algunas con la capacidad de ejercer este papel y que a éstas se restrinja la capacidad de discriminación. Por otro lado debe considerarse que la observación de la fagocitosis fue al cabo de un tiempo muy corto (1 hora) de modo que existe la posibilidad de que no sea el tiempo suficiente para que todos los eritrocitos sean fagocitados.

Los experimentos de fagocitosis con suero en diferentes diluciones demuestran que la actividad biológica del factor sérico es expresado a través de una relación lineal con la concentración. Sin embargo, a diluciones altas de suero disminuye la fagocitosis; esto probablemente es debido a la carencia de los factores nutricionales que brinda el suero(65).

Un dato indirecto nos sugiere la naturaleza polipeptídica de este

factor ya que absorbe la luz a 280 nm de longitud de onda y además se ti
ñe con colorantes para proteínas en la electrofóresis. Los datos sobre
la caracterización electrofóretica no se muestra ya que no se pudo lograr
repetitividad de resultados por problemas técnicos propios de la electro-
fóresis de péptidos de bajo peso molecular.

En los ensayos sin suero la presión oncótica y ciertos componentes nu-
tricionales fueron suplementados por un preparado rico en aminoácidos y en
expansores del medio (polivinil pirrolidona) llamado suplemento de sue-
ro (66). El suero fetal de ternera, usado aquí como factor nutricional y
de sobrevivencia celular, no parece contar con el factor inhibidor de la
fagocitosis homóloga, obviamente por su origen heterólogo. Sin embargo,
está claro que en ausencia de suero y suplemento, la fagocitosis también
puede ocurrir de acuerdo con lo reportado por Ravinovitch (51) quien deter-
minó que la fagocitosis heteróloga y homóloga con células alteradas, tam-
bién se llevaba a cabo en ausencia de suero. Lo anterior demuestra que
las células alteradas también podrían ser reconocidas en ausencia de fac-
tores séricos lo cual reduce el papel de éstos en la protección de célu-
las propias no modificadas.

De cualquier manera, los experimentos diseñados para examinar una
posible señal en los componentes propios contemplaron la necesidad de
utilizar el sistema completo, esto es, incluir el suero homólogo en la
fagocitosis *in vitro*. Habiendo establecido las condiciones que se requie-
ren para estudiar la fagocitosis homóloga en el sistema de cultivo de
células (lo cual incluyo la proporción macrófago eritrocito, cantidad
de marca y tiempos óptimos de fagocitosis, la presencia de suero, etc.),
se procedió a estudiar, en este modelo, el fenómeno de reconocimiento mi
diendo la fagocitosis como evento consecuente inmediato y como indicador
de reconocimiento y discriminación.

En este estudio se realizaron experimentos para examinar la posibi-
lidad de la existencia de una estructura que sirva como "señal" o "mar-
cador" presente en la superficie de las células autólogas y que les
permita ser reconocidas como componentes propios por parte de los macró-
fagos. Dos procedimientos fueron ensayados: a) la eliminación de la

señal y b) su enmascaramiento. Para el primer objetivo, las células blanco (eritrocitos) se sometieron a diversos tratamientos enzimáticos con la intención de digerir el componente involucrado en el reconocimiento. Los resultados muestran que la digestión con papaína, neuraminidasa y α -amilasa, resultan en una alta fagocitosis. Esto indicaría que la estructura involucrada cuenta con moléculas de naturaleza proteica y glicídica, y probablemente se trata de una glicoproteína. Sin embargo, el tratamiento con pronasa una proteasa inespecífica no resulta en fagocitosis, lo cual contradice la idea anterior. Una posibilidad conciliatoria es que el marcador sea de naturaleza glicoproteica, pero para que pueda llevarse a cabo la adhesión al macrófago se requiere la presencia, en la célula blanco, de algún componente proteico o de características similares, el cual habría sido eliminado por la pronasa por lo que no se hace evidente la actividad fagocítica. Por otro lado, la fagocitosis de eritrocitos papainizados es más acentuada en ausencia de suero al igual que lo que ocurrió con eritrocitos tratados con neuraminidasa. Esto sugiere que dicha enzima podría eliminar el sitio de acción del factor sérico descrito al inicio. El tratamiento con α -amilasa, en cambio, induce fagocitosis en ausencia del factor sérico; en presencia de éste último, la fagocitosis no es más del doble de la de los eritrocitos no tratados y en ausencia de suero. Esto permite inferir la posibilidad de que la acción enzimática, además de afectar al supuesto marcador, podría afectar a otras estructuras involucradas tales como el receptor para el factor sérico y/o a otros componentes necesarios para promover la adhesividad y la endocitosis por el macrófago.

Los resultados de los experimentos en los que se utilizó el sobrenadante de la incubación enzimática para inhibir la fagocitosis no permiten por el momento establecer explicaciones consistentes (datos no mostrados).

El objetivo de enmascarar al marcador haciendo uso de métodos inmunológicos arrojó información sugestiva sobre la existencia de la "señal" en cuestión. Los anticuerpos obtenidos en conejo contra estructuras de la superficie del eritrocito de ratón, al unirse a su antígeno e impedir la detección de la señal por parte del macrófago resulta en fagocitosis

lo cual indicaría que la señal sí fue bloqueada por los anticuerpos. Sin embargo, también este dato podría interpretarse como el reconocimiento de proteínas extrañas -las inmunoglobulinas de conejo en la superficie del eritrocito de ratón- por parte del macrófago. Para dilucidar este aspecto se adsorbió el suero de conejo anti-eritrocito de ratón con células de otros órganos (de ratón). Este procedimiento permitiría remover los anticuerpos específicos para la señal ya que el marcador de lo propio también debería estar presente en las demás células del organismo. Al remover estos anticuerpos del suero (remoción que fue demostrada por la disminución del título de anticuerpos anti-eritrocito en este suero) la reacción posterior con los eritrocitos dejaría descubierto el marcador permitiendo la unión de la Ig (de conejo) extraña con los antígenos propios del eritrocito. Los resultados muestran que en esta condición el proceso fagocítico disminuye, aunque no drásticamente, a pesar de estar el eritrocito rodeado de proteínas extrañas. Esto confirma la idea inicial.

La fagocitosis de los eritrocitos tratados con suero no adsorbido y la no eliminación total de la fagocitosis en la condición anterior podría también explicarse como la consecuencia de la instalación de un proceso de opsonización del eritrocito por el anticuerpo y su unión al macrófago a través de los receptores para Fc de Ig con que cuenta esta célula (45). Este argumento se refuerza por el hecho de que estos receptores no tienen restricción de especie (30). Para dilucidar este fenómeno se realizaron los experimentos con fragmentos de Ig anti-eritrocito de ratón, cuyo fragmento Fc fue eliminado por procedimientos enzimáticos pero quedó la capacidad de unirse al antígeno (lo que se probó por su capacidad inhibitoria de la hemaglutinación con anticuerpos completos). Los resultados indican que el Fab anti-eritrocito es capaz de bloquear la señal, lo que resulta en fagocitosis, mientras que si se remueven los Fab anti-marcador por adsorción y están presentes los Fab contra otras estructuras, la fagocitosis no se presenta (tabla I y II).

Los resultados anteriores se pueden considerar como evidencias a favor de la existencia de una señal o marcador en la superficie de las

células del organismo y posiblemente también en el macrófago (no se ha descrito fagocitosis entre macrófagos normales). Los procedimientos de enmascaramiento y de eliminación así lo sugieren. La naturaleza de esta molécula aun queda por dilucidarse. Maruta (59) en experimentos similares induce fagocitosis de eritrocitos opsonizados. Sin embargo, sus resultados se invalidan y no son concluyentes pues omitió los fragmentos de anticuerpo al no considerar la existencia de receptores para Fc heterólogos en macrófago. En el trabajo realizado aquí este paso fue considerado como primordial.

Las modificaciones químicas inducidas en las membranas celulares en algunos modelos experimentales (30, 51, 56) ha permitido establecer que la integridad estructural de la superficie de las células o partículas propias es un factor importante para que se efectúe el reconocimiento (45). Los autores no han presentado mecanismos por los cuales tales modificaciones inducen fagocitosis. En base a lo aquí descrito nosotros creemos que estos tratamientos (oxidación por peryodato, formación de enlaces cruzados por glutaraldehído, digestión enzimática con proteasas y glicosidasas, etc.) lo que hacen es provocar un deterioro de la estructura del marcador de lo propio. Algunos autores han propuesto que tales tratamientos inducirían simplemente un aumento en la adhesividad a través de interacciones no específicas tales como variaciones en la carga eléctrica, adquisición de grupos químicos reactivos o de regiones hidrofóbicas, entre otras (37, 40, 47). Sin embargo, para aceptar esta proposición debería asumirse que todas las células de un organismo tienen la misma carga y los organismos de otras especies tienen cargas diferentes lo cual no se apega estrictamente a lo real, ya que dentro de un organismo las distintas estirpes celulares tienen diferentes cargas y arreglos moleculares en superficie. Aunque podemos aceptar las variaciones de carga eléctrica esto solo haría sostenible la posibilidad de la existencia de arreglos espaciales moleculares que permitan diferentes ubicación y distribución de los grupos cargados, y como se recordara en párrafos anteriores, esta distribución podría ser modificada además por tratamiento químico. Como se puede observar esta proposición solo sería una pequeña variación a la hipótesis de una señal para lo propio, la cual incluiría grupos

químicos cargados.

Maruta y col (59), han sido los únicos que han planteado la posibilidad de un marcador para lo propio que puede ser reconocido por los macrófagos. Kolb (60), basado en estudios de autorosetas planteó la existencia de un receptor, en linfocitos, capaz de reaccionar con células propias, sin embargo, no le asignó una función en la vigilancia o en la discriminación xenogénica.

Un paso que permanece en la obscuridad es la explicación de la consecuencia negativa del reconocimiento; esto es, si el macrófago es capaz de detectar una estructura en la célula propia e interactúa o reacciona con ella, ¿Por que la consecuencia de esta interacción es la "no - fagocitosis" ?. Por el contrario, al no detectar el macrófago tal marcador no hay interacción receptor-marcador, entonces ¿como se explicaría que el siguiente evento sea la adhesión y la fagocitosis ?. Este conflicto se acentúa si consideramos lo propuesto por Griffin y col. (48) quien demuestra que no es suficiente la interacción entre la membrana del macrófago y la superficie de la partícula, para que el mecanismo endocítico ocurra en forma de "disparo", sino que éste ocurre como un proceso de cerrado de "cremallera", es decir, que deben existir multiples interacciones membrana-partícula entre la superficie interior del fagosoma y la superficie de las partículas fagocitable.

Para explicar ésta aparente paradoja se debera necesariamente invocar a aquellos procesos de reconocimiento que conducen a la separación de las células que se han reconocido. Un modelo bien estudiado es el de "transito", "desplazamiento" o "caminata" de ciertas estirpes celulares a lo largo de rutas celulares durante la embriogénesis (9,10), en donde estas células van reconociendo arreglos moleculares en la superficie de la célula que confirman la ruta y luego de interactuar se separan para permitir la migración. Esto se explica mediante la existencia de procesos enzimáticos durante el reconocimiento ya que la señal estaría constituida por un arreglo de carbohidratos y el receptor de reconocimiento sería una glicosil-transferasa que utiliza como sustrato una hexosa y como co-sustrato (específico) el arreglo al que le "pega" el monosacárido (4).

Terminada esta reacción la enzima se separa del producto, como ocurre en todos los procesos enzimáticos, y continúa con otra reacción pero en otro sitio. De esta manera, se concluye que no toda interacción a nivel de la superficie celular significa necesariamente la persistencia de la unión entre moléculas en reconocimiento, como parece ser lo factible en los modelos que implican adhesión. Por otra parte, si la consecuencia de la interacción entre las moléculas encargadas del reconocimiento fuese la endocitosis, debería postularse necesariamente que lo que se reconoce es una estructura extraña, lo cual, como se vio en párrafos anteriores parece ser espacialmente imposible.

Por otro lado, la explicación para la existencia del atrapamiento después de la detección de la ausencia de "la señal" solo sería factible si se asume la existencia de un *status* fisiológico de la fagocitosis, que solo sería inhibido cuando el macrófago detecta en una partícula o célula, la presencia del marcador (señal negativa). Esta afirmación se refuerza, en parte, por el hecho de que el "rasuramiento" con pronasa no induce fagocitosis posiblemente por falta, de sustratos de adhesión en la superficie de la célula blanco.

Así pues, los datos mostrados pueden ser considerados como evidencias a favor de la existencia de receptores para detectar un marcador de lo "propio" en el organismo. Este tipo de modelo podría ser también el que opere en el reconocimiento de los antígenos de histocompatibilidad (HLA, H2, etc) ya que en este sistema los linfocitos de un individuo reconocen a las células alogénicas por poseer estructuras que son codificadas por otro haplotipo (74). Aún no queda claro si el linfocito reconoce todos los demás haplotipos (más de 60 en humanos) o, reconoce únicamente a los propios, y la célula que no los posee la identifica como alogénica ejerciendo sobre ésta funciones de agresión. De ocurrir esto, se estaría demostrando la posibilidad de que este modelo de reconocimiento tal vez existe en la naturaleza con cierta frecuencia.

Se puede enfatizar que el reconocimiento a través de receptores para lo propio no parece ser un fenómeno "todo o nada". El macrófago no adhiere y fagocita en la misma magnitud a todas las células heterólogas. Existe cierta correlación con la distancia filogenética entre las

especies donadoras de las células enfrentadas. Si la hipótesis de la existencia de un marcador especie-específico es correcta, lo anterior se explicaría por la existencia de variaciones en la estructura de este marcador, las cuales serán mínimas en las especies cercanas y de mayores en la medida del alejamiento filogenético (mutaciones durante la evolución). También es posible que puedan ocurrir pequeñas variaciones dentro de la especie, lo cual explicaría la depuración aumentada de células alogénicas por macrófagos, sin mediar ningún fenómeno inmunológico. Todo lo anterior es compatible con la gran actividad fagocítica que desarrolla el macrófago en presencia de microorganismos, productos vegetales, y otros, en comparación con la baja actividad contra células de mamíferos, y así se pone en evidencia el papel defensivo y de vigilancia de esta estirpe celular. Es posible que todos los sistemas biológicos de reconocimiento propio-no propio tengan esta mecánica de funcionamiento: pensemos en los protozoarios y en los monocitos humanos.

CONCLUSIONES .

- En el reconocimiento autólogo se requiere de la presencia de suero homólogo o autólogo. El factor sérico responsable es un componente soluble de bajo peso molecular (5,000 a 10,000 kD).
- El tratamiento enzimático de la superficie eritrocitaria, promueve la fagocitosis autóloga.
- De la misma manera, el enmascaramiento por anticuerpos, promueve la fagocitosis autóloga.
- Los datos mostrados son considerados como evidencias a favor de la existencia de receptores en la superficie del macrófago, los cuales permiten detectar un marcador de "lo propio" en la superficie de las células autólogas.

REFERENCIAS .

1. Bell E. Molecular and cellular aspects of development. Ed. Harper A. Academic Press. 1968. pp - 78 - 91.
2. Frazier W. & L. Glaser. Surface components and cell recognition. Ann. Rev. Biochem. 1979. 48: 491 - 523.
3. Monroy A. The biochemistry of animal development. Edit. Webir R. Academic Press. 1965. 1: 48 - 55.
4. Pierce M., E. A. Turley & S. Roth. Cell surface glycosyltransferase activities. International Review of Cytology. 1980. 65: 26 - 33.
5. Jack L. & R. Tutz. A multicomponent model for specific cell adhesion. En: Cell and tissue interactions. Ed. J. W. Lash & M. M. Burger. Society of general Physiologists series. 1977. 32: 187 - 95.
6. Moscona A. A. & R. E. Husman. Biological and biochemical studies on embryonic cell-cell recognition. En: Cell and tissue interactions Edit. J.W. Lash & M. M. Burger. Society of general physiologists series. 1977. 32:173 - 186.
7. Nicolson G. L., C. R. Birdwell., K. W., Brunson., J. C. Robbins., G. Beattie. & I. J. Fidler. Cell interactions in the metastatic process: Some cell surface properties associated with successful blood-borne tumor spread. En: Cell and tissue interactions. Edit. J. W. Lash & M. M. Burger. Society of general physiologists series. 1977. 32: 225-241
8. Burger M. M. & J. Jumblatt. Membrane involment in cell-cell interactions: A two-component model system for cellular recognition that does not require live cells. En: Cell and tissue interactions. Edit. J. W. Lash. & M. M. Burger. Society of general physiologists series. 1977. 32: 155 - 172.
9. Hay D. E. Interactions Between the cell surface and extracellular matrix in corneal development. Eds. J. W. Lash & M. M. Burger. Society of General Physiologistis Series. 1977. 2: 115 - 138.

10. Roth S., B.D. Shur & R.A. Durr. Possible enzymatic basis for some cell recognition and migration phenomena in early embryogenesis. Eds. J. W. Lash & M. M. Burger. Society of General Physiologists Series. 1977. 2: 209 - 224.
11. Glaser L., R. Santala., D. I. Gottlieb & R. Merrek. Cell-cell recognition in the embryonal nervous system. Cell and tissue Interactions. Eds. J. W. Lash & M. M. Burger. Society of General Physiologists Series. 1977. 2: 197 - 208.
12. Weir D. M. & M. H. Ogmundsdottir. Non-specific recognition mechanisms by mononuclear phagocytes. Clin. Exp. Immunol 1977. 30: 323 - 329.
13. Kudo R. R. Protozoología. Compañía Editorial Continental, S. A. 1972. pp. 94 - 137.
14. Chavéz A., B. Sepúlveda., M. Segura., D. Corona & J. Díaz. Fases iniciales de la actividad patógena de Entamoeba histolytica sobre el hígado del hamster. I confrontación de trofozoitos con células hepáticas aisladas. Memorias de la Conferencia Internacional sobre amebiasis. 1976. pp. 470 - 4
15. Rosen D. S., P. L. Haywood & S. H. Barondes. Inhibition of intercellular adhesion in a cellular slime mould by univalente antibody against a cell-surface lectin. Nature 1976. 263: 425.
16. Odum P. E. Ecología. Edit Interamericana. 3a. edición. 1971 pp. 357 - 388.
17. Nolte W. A. Microbiología Odontológica. Edit. Interamericana. 1971 pp. pp. 164 - 177.
18. Drutz J. D. Inmunidad e infección. En: Manual de Inmunología Clínica. Eds. H.H. Fundenberg., P. D. Stites., J. L. Caldwell & J. V. Wells. 1978, pp. 199 - 213.
19. Hobart M. J. & I. McConnell. The immune system. A course on the molecular and cellular basis of immunity. Blackwell Scientific Publications. 3i th. Ed. 1978, pp. 93 - 130, 226 - 257.
20. Byers V. S. & A. S. Levin. Inmunología de los tumores. En: Manual de Inmunología Clínica. Eds. H. H. Fudenberg., P.D. Stites., J. L. Caldwell & J. V. Wells. 1978, pp. 267 - 287.

21. Choy Y. M., S. L. Wong. & C. Y. Lee. Changes in surface carbohydrates of erythrocytes during *in vivo* ageing. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1979, 91: 2: 410 - 415.
22. Knyszynski A., S. J. Leibovich & D. Danon. Phagocytosis of "old" red blood cell by macrophage from syngenic mice *in vitro*. Experimental Hematology. 1977, 5: 480 - 486.
23. Playfair. J. H. Immunology at a Glance. Blackwell Scientific Publications. 1979, pp. 3 - 7.
24. Stites D. P. & J. L. Caldwell. Filogenia y ontogenia de la respuesta inmunitaria. En: Manual de Inmunología Clínica. Eds. H. H. Fudenberg, P. D. Stites., J. L. Caldwell & J. V. Wells. 1978, pp. 123 - 137.
25. Goodman J. W. Inmunogenicidad y especificidad antigénicas. En: Manual de Inmunología Clínica. Eds. H. H. Fudenberg., P. D. Stites., J.L. Cadwell & J. V. Wells. 1978, pp. 32 - 41.
26. Hersey P. Macrophage effector function. An *in vitro* system of assessment. Transplatation. 1973. 45: 282 -290.
27. Perkins H. & M. R. Keonard. Specificity of phagocytosis as at may relate to antibody formation. J. Immunology. 1963, 90: 228 - 237.
28. Sano K. M. sugimoto., T. Yasuda., Y. Egashira & M. Yamada. Recognition of heterologous cells by macrophages. Microbiol. Immunol. 1980 24 (10): 957 - 967.
29. Cabilly S. & R. Gallily. Studies on the recognition of xenogenic cells by non-immune macrophages. Cell Immunol. 1977. 29: 54 - 65.
30. Czop K. J., T. Douglas. & K. F. Austen. Membrane Sialic acid on target particles modulates their phagocytosis by trypsin-sensitive mechanism on human monocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. 1978. 75: 3831 - 3835.
31. Rabinovitch M. The dissociation of the attachment and ingestion phases of phagocytosis by macrophages. Experimental Cell Research. 1967. 46: 19 - 28.
32. Knyszynki A., S. J. Kibovich. & D. Danon. Phagocytosis of red blood cells from Rauscher Leukemia virus - infect mice by macrophages from normal syngeneic mice. J. Reticuloendothel. Soc. 1978. 23: 243 - 251.

33. Benneti G. G. & M. B. Kay. Homeostatic removal of senescent murine erythrocytes by splenic macrophages. *Exp. Hematol.* 1981, 9: 297 - 307.
34. Leibovich S. J. & A. Knyszynski. *In vitro* recognition of "old" red blood cells by macrophages from syngeneic mice: characteristics of the macrophage red blood cell interaction. *J. Reticuloenthe Soc.* 1980, 27: 411 - 419.
35. Aminoff S., F. William. V. Bruegge., W. C. Bell., K. Sarpolis & R. Williams. Role of sialic acid in survival of erythrocytes in the circulation: Interaction of Neuraminidase treated and untreated erythrocytes with spleen and liver at the cellular level. *Proc. Natl. Acad.* 1977. 74: 1521 - 1524.
36. Steinman R. M. & Z. A. Cohn. The metabolism and physiology of the mononuclear phagocytes. *En: The inflammatory process.* Ed. B. W. Zweifach., L. Grant., & R. T. McCluskey. N. Y. Academic 2nd. ed. 1974. pp. 449 - 510.
37. Fabia F., J. C. Gattegno., J. C. Gluckman. & P. Cornillot. Effects of ageing, surface sialic acid and glycopeptides of erythrocytes on auto-rosettes in man. *Physiol. Chem.* 1978, 11: 295 - 301.
38. Lutz H. U. & J. Fehr. Total sialic acid content of glycoporphins during senescence of human red blood cells. *J. Biol. Chem.* 1979, 254: 11177 - 11178.
39. Kolb H., C. Schudt., V. Kolb-Bachopen. & H. A. Kolb. Cellular recognition by rat liver cells of neuraminidase-treated by erythrocytes. *Exp. Cell Res.* 1978, 113: 319 - 325.
40. Kolb H., A. Kriese., V. Kolb-Bachopen. & H.A.. Kolb. Possible mechanism of entrapment of neuraminidase-treated lymphocytes in the liver. *Cellular Immunol.* 1978, 40: 457 - 462.
41. Hubbard L., G. Wilson., G. Aswall. & H. Stukenbrok. An electron microscope autoradiografic study of the carbohydrate recognition systems in rat liver. *J. Cell Biol.* 1979. 83: 47 - 64.
42. Schlepper-Schafer J., Kolb-Bachofen V. & Kolb H. Analysis of lectin-dependent recognition of desialylated erythrocytes by kupffer cells. *Biochem. J.* 1980. 186: 827 - 831.

43. Kay B.M. Mechanism of removal of senescent cells by human macrophage *in situ*. Proc. Nat. Acad. Sci. 1975, 72: 3521 - 3525.
44. Khansari N. & H. H. Fudenberg. Phagocytosis of senescent erythrocytes by autologous monocytes: Requirement of membrane-specific autologous IgG for immune elimination of ageing red blood cells. Immunol. 1983, 78: 114 - 121.
45. Di Luzio N. R., R. McNamee., E. F. & C. J. Pisano. Macrophage recognition factor depletion after administration of particulate agents and leukemic cells. J. Reticuloendoth. Soc. 1972, 12: 314 - 323.
46. Bongrad P., C. Capo., A. M. Bénoliel. & R. Depieds. The recognition of homologous and heterologous erythrocytes by Guinea pig macrophages. Ann. Immunol. 1973, 124: 531 - 538.
47. Ravinovitch M. & M. Jo DeStefano. Particle recognition by cultivated macrophages. Immunol. 1973, 110: 695 - 701.
48. Griffin. F. M., J. A. Griffin. & S.C. Silvertein. Studies on the mechanism of phagocytosis. II. The interaction of macrophage with anti-immunoglobulin IgG-coat bone marrow-derived lymphocytes. J. Exp. Med. 1976, 144: 788 - 809.
49. Hood W. W. Immunology. Molecular recognition at cell surfaces. Eds. Benjamin Cummings. Publishing Company Inc. 1979. pp. 297 - 366.
50. Maruta H. & D. Mizuno. Selective recognition of various erythrocytes in endocytosis by mouse peritoneal macrophages. Nature New Biol. 1971, 234: 246 - 248.
51. Rabinovitch M. Attachment of modified erythrocytes to phagocytic cells in absence of serum. Proc. Soc. Exp. Biol. 1967, 124: 396 - 399.
52. Siegel I. Natural and antibody-induced adherence of Guinea pig phagocytic cells to autologous and heterologous thymocytes. Immunol. 1970, 105: 879 - 885.
53. Narenda G. M. Recognition of self and nonself: The crucial role of phagocytosis and lysosomal destruction of antigen. Med. Hypotheses. 1976. 2: 141 - 146.

54. Ishikawa Y. Studies on the cellular recognition mechanism: Effect of concanavalin on the phagocytosis of homologous red cells by peritoneal macrophage. *Acta Med.* 1971, 25: 577 - 595.
55. Gorczynski R. M., S. MacRae. & J.J. Jennings. A novel role for macrophage: antigen discrimination of distinct carbohydrate bonds. *Cell Immunol.* 1979. 45: 276 - 294.
56. Kolb H., C. Schudt., W. Kolb-Bachofen. & H. A. Kolb. Cellular recognition by rat liver cells of neuraminidase-treated erythrocytes *Exp. Cell Res.* 1978, 113: 319 - 325.
57. Adaira K. Structures and functions of the sugar chains of cell surface glycoproteins. *Cell Structure and Function.* 1979. 4: 169 - 181.
58. Stossell T. P. Phagocytosis: Recognition and ingestion. *Seminars in Hematol.* 1975. 12: 83 - 115.
59. Maruta H., A. M. A. El-Asfahani. & D. Mizuno. Selective recognition in erythrophagocytosis by mouse peritoneal macrophage. *Exp. Cell Research.* 1973. 80: 143 - 151.
60. Kolb H. A receptor for "self" on lymphocytes. *Immunology.* 1977, 33: 859 - 863.
61. Henkart, P. S., S. Humpreys. & T. Humpreys. Characterization of sponge aggregation factor: A unique proteoglycan complex. *Biochemistry.* 1973. 12: 3045 - 3050.
62. Bier O. *Bacteriologia e Immunologia.* Edit. Melhoramentos, Sao Pablo, Brasil. 2a. Ed. 1966. Cap. XL. p. 891.
63. O'Connell J. D., J. C. Caruso. & D.M. Sass. Separation of erythrocytes of different ages. *Clin. Chem.* 1965. 11: 771 - 781.
64. Davison E. The redistribution of red cells on centrifugation. *Acta Hemat.* 1960. 23: 92.
65. Stuart, A. E., J. A. Habeshan. & A. E. Davison. Phagocytosis *in vitro.* En: *Handbook of Experimental Immunology.* Weir D. M. Charper 31. Blackwell Scientific Publications. 3 ed. 1978. pp. 8.1 - 8.16.

66. Gabb M. H. & W. E. Latchem. Manual de soluciones de Laboratorio. Ed. Bellaterra. 1969. p . 86 . México, D.F.
67. Garvey S. J., Cremer E. N. & H. D. Sussdorf. Methods in immunology. A laboratory text of instruction and research. W.A. Benjamin Inc. Advance book program. Chap. VI; Hemagglutination. 1977. pp. 126-360.
68. Folin O. & V. Ciocatleu. On Tyrosine and tryptophane determinations in proteins. J. Biol. Chem. 1927. 73: 627.
69. Porter R. R. The hydrolysis of rabbit γ -globulina and antibodies with crystalline papain. Biochem. J. 1959. 73: 119.
70. Wolf A., R. K. Barfoot. & R. A. Johnson. Xenogenic recognition of tumor specific plasma membrane antigens derived from mouse lymphoma cells derived from mouse lymphoma cells. Immunology. 1972. 22: 485.
71. Hibbs J. B. Macrophage nonimmunologic recognition: Target cell factors related to contact inhibition. Science. 1973. 180: 868 - 870.
72. Lohmann Matthes. Macrophage cytotoxicity factor. A product of *in vitro* sensitized thymus-dependent cells. Eur. J. Immunol. 1973, 3: 56 - 58.
73. Brogan T. D. Mechanism of phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes. Immunology. 1966. 10: 137 - 147.
74. Schroit A. T. J. & R. Gallily. Macrophage phagocytic recognition sites: Demostration of selectivity by hetero and alloantisera. Immunology. 1977 33: 121 - 127.
75. Rodríguez L. M. Relación huésped-parásito mecanismo de patogenicidad de los microorganismos. Serie de Biología. Monografía No. 14 Programa regional de desarrollo científico y tecnológico, departamento de asuntos científicos. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington, D.C. 1975. pp. 11 - 20.
76. Humphreys T. Chemical dissolution and *in vitro* reconstruction of sponge cell adhesions: isolation and functional demonstration of the components involved. En: Molecular and cellular aspects of development. Bell E. Ed. Academic Press. 1968. pp. 78 - 91.

77. Bonner T. J. Evidence for the formation of cell aggregates by chemotaxis in the development of the slime mold Dictyostelium discoideum. En: Molecular and cellular aspects of development. Bell E. Ed. Academic Press. 1968. pp. 40 - 54..