

115
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO IN VITRO DEL TETRAPEPTIDO TUFTSINA (L-TREONIL_L-LISIL_
L-PROLIL_L-ARGININA) EN LA CAPACIDAD FAGOCITICA DE LEUCOCITOS
POLIMORFONUCLEARES DE RECIEN NACIDOS PEQUEÑOS PARA SU
EDAD GESTACIONAL

TESIS

Que para obtener el título de

Biólogo

Presenta:

Carlos Llorens Cruset

MEXICO, D. F.

1991

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
Inmunidad.....	3
Las células fagocíticas.....	4
Mediaciones celulares del sistema inmune.....	5
Inmunoglobulinas.....	6
Fagocitosis.....	7
Características inmunológicas del recién nacido pequeño para su edad gestacional.....	11
Tuftsin.....	12
Reducción de nitroazul de tetrazolio por células polimorfonucleares.....	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	18
HIPOTESIS.....	18
MATERIAL Y METODO.....	19

Separación de células polimorfonucleares.....	20
Estandarización de procedimientos.....	22
Determinación de concentración y tiempo óptimo de incubación con tuftsina para células polimorfonucleares de adulto.....	22
Análisis de la actividad biológica de la tuftsina en células de adulto.....	23
Tratamientos dados a las células polimorfonucleares de recién nacidos.....	24
Reducción de nitroazul de tetrazolio por células PMN de recién nacidos.....	25
Justificación del análisis estadístico.....	25
RESULTADOS.....	26
Resultados de la determinación de concentración y tiempo óptimo de incubación con tuftsina para células polimorfonucleares de adulto.....	26
Resultados del análisis de la actividad biológica de la tuftsina en células polimorfonucleares de adulto..	28
Resultados obtenidos de los distintos tratamientos dados a células polimorfonucleares de recién nacidos.	30
DISCUSION.....	38
CONCLUSION.....	40
COMPROMISO ETICO.....	41

RESUMEN

El tetrapéptido turtsina, se presenta como una auténtica entidad biológica cuya principal función es la activación de células fagocíticas como macrófagos y polimorfonucleares (PMN). Este péptido utiliza como acarreador a la molécula de gamaglobulina (IgG) leucocítica ubicándose en la región Fc del dominio CH2 de la cadena pesada entre los residuos 289 y 292.

El objetivo de esta tesis fue determinar la actividad de la turtsina sintética sobre células PMN de recién nacidos pequeños para su edad gestacional, ya que se ha demostrado que en estos niños la actividad de las células fagocíticas está disminuida en relación con la actividad presentada por las células PMN de niños de peso adecuado para su edad gestacional.

Para tal efecto, se empleó un análisis in vitro de reducción de nitroazul de tetrazolio. Se aislaron células polimorfonucleares tanto de niños recién nacidos pequeños para su edad gestacional como de recién nacidos de peso adecuado a su edad gestacional. Ambos grupos de trabajo fueron sujetos a diversos tratamientos con el fin de determinar la actividad basal del metabolismo oxidativo y la capacidad de activación de este por la turtsina sintética. Se logró definir la concentración y tiempo óptimo de incubación para este modelo de estimulación.

Los resultados obtenidos en los experimentos, muestran que las células polimorfonucleares de recién nacidos pequeños para su edad gestacional presentan una disminución en su capacidad de reducción del nitroazul de tetrazolio en relación a las células de los recién nacidos de peso adecuado para su edad gestacional. Se observaron cambios notables en las células de ambos grupos al ser incubadas con tuftsina sintética, estos fueron cuantificados através de la reducción del nitroazul de tetrazolio que nos indicó de manera directa las variaciones en el metabolismo oxidativo ocurridas en las células tratadas. Las modificaciones producidas por la tuftsina sintética sobre los polimorfonucleares de los recién nacidos pequeños para su edad gestacional se presentan en un incremento significativo de la actividad metabólica logrando rangos semejantes a los observados en las células control de los recién nacidos de peso adecuado para su edad gestacional.

En los resultados se puede observar que la estimulación de células polimorfonucleares con tuftsina sintética incrementa notablemente la reducción de nitroazul de tetrazolio y sugiere que la baja actividad de las células de recién nacidos pequeños para su edad gestacional no se relaciona con alguna deficiencia celular, sino que apunta hacia la posibilidad de una baja concentración de tuftsina sérica.

INTRODUCCION

INMUNIDAD

El término de inmunidad se refirió inicialmente a la resistencia de los individuos frente a las infecciones microbianas. Actualmente, esta definición engloba al conjunto de reacciones dirigidas a la eliminación de partículas extrañas; por extensión, se designa así al conjunto de factores humorales y celulares, específicos o no, de la sustancia introducida, que protegen al organismo contra las agresiones infecciosas y parasitarias y contra proliferaciones malignas (Stites, 1983)

La respuesta inmunológica no siempre tiene un papel favorable; pueden provocar reacciones de hipersensibilidad, como es la anafilaxia o bien procesos autoinmunes. El común denominador de las principales reacciones inmunológicas es la alta especificidad que poseen para los antígenos. Estas sustancias son capaces de inducir una respuesta específica involucrando anticuerpos y/o células.

Los anticuerpos son aquellas sustancias producidas por la penetración de un antígeno y que son capaces de ligar de manera específica con él. Se trata de inmunoglobulinas plasmáticas, de ellas se conocen cinco clases diferentes en estructura molecular y función: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

El anticuerpo tiene por objetivo principal el de unirse al antígeno correspondiente formando un inmunocomplejo.

El complemento es un sistema enzimático complejo de proteínas plasmáticas que, una vez activadas y eventualmente fijadas a los complejos antígeno-anticuerpo, son capaces de provocar a su vez la activación de diversas células fagocíticas (Bach, 1981).

El polimorfismo de la respuesta inmune está en los tipos celulares responsables de una gran variedad de respuestas, con intervención de anticuerpos, mediadores químicos y células dotadas de capacidades citotóxicas y fagocíticas (Prokopowitz, 1975).

LAS CELULAS FAGOCITICAS.

Las células fagocíticas se definen por su aptitud a ingerir y, en condiciones óptimas, digerir partículas vivas o inertes. Comprenden básicamente a los macrófagos, monocitos y polimorfonucleares (PMN). Estas células representan el elemento esencial del sistema reticuloendotelial.

Todas ellas poseen un origen común, en la médula ósea, bajo la forma de células madre hematopoyéticas y de células madre mieloides.

Los polimorfonucleares, originados de los mielocitos, solo viven durante pocos días, estas células tienen un aspecto característico, fácilmente reconocible, por el núcleo polilobulado que presentan; en cambio los macrófagos - y aún más los monocitos - no siempre son fácilmente distinguibles del resto de células mononucleadas de tamaño grande (Pabst, 1980).

La fagocitosis representa la principal función de las células anteriormente mencionadas, en breve :

A diferencia de la pinocitosis, que se define como la captación de partículas de diámetro inferior a 10 nm. observada en muchos tipos celulares, la fagocitosis es exclusiva de las células fagocitarias (Stabinsky, 1980).

Se desarrolla en tres fases. La primera es la adhesión, que está favorecida por la presencia de anticuerpos del tipo IgG citofílicos en la superficie de la partícula a ingerir, anticuerpos para los que los fagocitos poseen receptores específicos en la membrana. La siguiente fase es la ingestión y, finalmente, según el estado funcional de la célula y la naturaleza de la partícula, ésta puede ser digerida previa fusión de lisosomas a la vacuola fagocitaria y acción de las enzimas lisosomales, o puede persistir y multiplicarse en el interior celular. Esta última eventualidad puede ser causa de infecciones latentes o crónicas (Cline y Leher, 1978).

MEDIACIONES CELULARES DEL SISTEMA INMUNE.

Las reacciones inmunológicas se efectúan por intervención de diversas células además de las fagocitarias, se sabe que los macrófagos sintetizan moléculas de comunicación como el interferón y determinados factores del complemento (Friedman, 1979), también intervienen en las reacciones inmunológicas como células presentadoras de antígeno a las

células T y B (Loor, 1977), pueden tener funciones citotóxicas frente a tumores o injertos y realizar una determinada función en la cicatrización (Bach, 1981).

Las células K (del inglés "killer") destruyen las células blanco sensibilizadas por anticuerpos tipo IgG a los que se fijan mediante sus receptores para la porción Fc (Lydyard, 1982). Las células NK (del inglés "natural killer" se definen por su capacidad de destruir in vitro a células tumorales viroinducidas mantenidas en cultivo, independientemente de la presencia de anticuerpos o complemento (Loor, 1977).

INMUNOGLOBULINAS.

La presencia de un antígeno dentro del organismo provoca la aparición de moléculas de naturaleza protéica que tienen la capacidad de unirse específicamente con este antígeno. Las proteínas dotadas de esta función de reconocimiento se conocen con el nombre de anticuerpos o inmunoglobulinas.

Las inmunoglobulinas son muy diversas, tanto por sus funciones como por su especificidad para el antígeno; pero todas presentan una estructura general común (Edelman, 1973; Bach, 1981).

Las moléculas de las inmunoglobulinas poseen regiones distintas, portadoras de las dos funciones que las caracterizan.

La función de reconocimiento se expresa en la región llamada variable, con capacidad de reconocer un número aparentemente ilimitado de antígenos distintos.

La función efectora, poco diversificada, se expresa en la región constante, y es independiente de la función de reconocimiento. se realiza de distintas maneras: por fijación del complemento, por transferencia placentaria o por opsonización (Edelman, 1973).

Esta dualidad funcional asociada al receptor Fc en células fagocíticas, es un eficiente mecanismo para la captura e ingestión de complejos antígeno-anticuerpo (Friedman, 1979)

FAGOCITOSIS

La función fagocítica de sistema monocito-macrófago se ha entendido como un proceso que consiste en englobar y destruir intracelularmente partículas y células identificadas como extrañas al organismo. En la acción de destrucción intracelular se genera un evento bioquímico descrito como estallido respiratorio, en este fenómeno se observa un incremento en el consumo de oxígeno y la activación de una oxidasa que reduce el oxígeno molecular hasta anión superóxido, el cual se transforma en peróxido de hidrógeno, que, junto con los contenidos enzimáticos de los lisosomas actúan juntos dentro del fagosoma para degradar los microorganismos ingeridos (Babior 1978).

Los leucocitos, neutrófilos y polimorfonucleares son células que se relacionan principalmente con la destrucción de los microorganismos cuya eficiencia depende de la evasión de la fagocitosis, estos patógenos al ser ingeridos por las células en cuestión, mueren. Los organismos de este tipo son considerados patógenos extracelulares cuyo prototipo es Streptococcus pneumoniae (Stites et al.1983).

Las células polimorfonucleares son las principales responsables del mantenimiento de las defensas normales contra microorganismos invasores. Los neutrófilos están capacitados para seleccionar, ingerir y destruir a la mayor parte de estos invasores, lo anterior requiere de una serie de eventos biológicos discretos y coordinados que implican la adherencia al endotelio, migración extravascular, migración dirigida hacia los cuerpos identificados como extraños, adherencia, fagocitosis, fusión de lisosomas con las vacuolas fagocíticas, descarga del contenido del lisosoma y estallido respiratorio (Baehner, 1976).

Función fagocítica del PMN.

1. Oponización: es el fenómeno de recubrimiento de una bacteria, virus, hongo u otra célula para poder ser identificada como extraña; las opsoninas pueden ser fracciones del complemento o inmunoglobulinas.

2.- Quimiotaxis: consiste en un movimiento dirigido que realiza el PMN para llegar al sitio donde se encuentra la sustancia químicamente atrayente.

3.- Endocitosis: es la acción mecánica por medio de la cual el PMN introduce en el citoplasma el cuerpo reconocido como extraño la endocitosis se caracteriza por la formación de una depresión en la superficie celular, depresión que se invagina en una cavidad en la que queda encerrado cierto volumen de medio extracelular con o sin partículas; esta cavidad se desprende de la superficie en forma de vesícula y pasa al interior de la célula a este cuerpo se le denomina fagosoma o vacuola fagocítica y su contenido permanece aislado del hialoplasma por la porción de membrana plasmática que se ha invaginado. Durante la formación de la vacuola fagocítica la NAD, enzima presente en la membrana, es interiorizada y se oxida a NADH lo cual inicia el proceso de degradación.

4.- Destrucción intracelular: una vez formada la vacuola fagocítica se inician en el citoplasma una serie de movimientos que traen como consecuencia la aproximación de lisosomas al fagosoma, se fusionan con él y vierten al interior su contenido enzimático, esta acción inicia los procesos de destrucción y digestión de la partícula o germen fagocitado.

Los procesos químicos que matan al germen fagocitado son de dos tipos: los oxígeno dependientes y los oxígeno independientes. Estos últimos implican principalmente cambios de pH, liberación de lisozima y lactoferrina.

Los procesos oxígeno dependientes se relacionan con importantes cambios metabólicos en la célula. Estas variaciones se caracterizan por un rápido incremento en el consumo de oxígeno que se denomina estallido respiratorio.

5.- Excreción: es un proceso que utiliza el PMN para eliminar los restos de la sustancia extraña y material enzimático utilizado para su destrucción.

Los anticuerpos juegan un importante papel dentro del fenómeno fagocítico, esto es claro puesto que el índice de depuración de microorganismos está íntimamente relacionado con la calidad del recubrimiento hecho por IgG.

En combinación con los anticuerpos de tipo IgG, los antígenos desarrollan un incremento en la capacidad de adherencia a los leucocitos PMN y macrófagos a partir de los receptores específicos para la región Fc presentes en su superficie celular. La fagocitosis o incorporación de células o microorganismos recubiertos por anticuerpos depende, en gran medida, de la afinidad que presenten los anticuerpos a los receptores para Fc en la superficie de la célula blanco o efectora (Wilkinson, 1980). A este fenómeno de recubrimiento se le denomina opsonización y de esta manera el proceso fagocítico se intensifica notablemente.

Las opsoninas termoestables son los anticuerpos y las termolábiles son el complemento. Su función es interactuar con los antígenos de membrana de los organismos invasores

para así hacerlos más atractivos a las células fagocíticas. Es importante mencionar que la virulencia de algunos patógenos se asocia directamente a su capacidad de evadir la fagocitosis por desconocimiento de antígenos de superficie (Stites et al.1983).

Los macrófagos y PMN, gracias a los receptores específicos para Fc presentes en la membrana pueden ser recubiertos con anticuerpos del tipo IgG leucofilica, lo cual les confiere una notable eficiencia para el reconocimiento y captura de patógenos. A las células así recubiertas se les denomina "armadas"(Fidalgo, 1967) Esta interacción anticuerpo-receptor implica una importante actividad biomolecular que se expresa cuando la partícula reconocida como no propia se adhiere a la superficie de la célula agilizando el estímulo fagocítico (Kabat et al.,1978).

CARACTERISTICAS INMUNOLOGICAS DEL RECIEN NACIDO PEQUEÑO PARA SU EDAD GESTACIONAL.

En el recién nacido pequeño para su edad gestacional se han reportado alteraciones de los órganos linfoides y en las células que participan en la respuesta inmunológica (Prokopowitz, 1975;Xanthou, 1985) Como una disminución en el número de linfocitos T en sangre periférica, debido a una inadecuada regulación tímica (Martinez-Cairo et al.,1985), el número de linfocitos B se observan disminuidos al compararse con los recién nacidos eutróficos (Martinez-Cairo

et al.,1977) y los niveles de IgG son significativamente más bajos que los encontrados en niños de peso adecuado para su edad gestacional (Constantopoulos,1983).

Las funciones de los PMN de los recién nacidos pequeños para su edad gestacional fueron estudiadas y valoradas por Chandra en 1979. Este autor estudió recién nacidos pequeños para su edad gestacional y los comparó con recién nacidos eutróficos, valorando las funciones de PMN y observó que la actividad opsonica del plasma, quimiotaxis, fagocitosis, metabolismo oxidativo y la destrucción intracelular era menor en los pequeños para su edad gestacional (Chandra,1975).

TUFTSINA

La tuftsina es un tetrapéptido que se localiza en la región Fc de la IgG leucofilica (Najjar et al. 1983). Se demostró por primera vez su acción estimulante de la actividad fagocítica en células PMN y macrófagos en 1967 (Najjar,1970). En 1970 se aisló y se caracterizó por primera vez su secuencia: L treonil - L lisil - L prolil - L arginina (Najjar,1983).

La tuftsina se encuentra en el dominio CH2 de la cadena pesada de la IgG en los residuos 289 y 292 (Morgan,1982). Es liberada de la molécula transportadora por la acción de dos enzimas: una endocarboxipeptidasa de origen esplénico que rompe el enlace Arg-Glu (residuos 292-293), y la leucocininas presente en la membrana exterior de la célula

blanco, ésta interacciona con la treonina a nivel de los residuos 288-289 quedando liberada así la tuftsina de la molécula. En este momento el tetrapéptido es biológicamente activo (Nishioka, 1973; Najjar, 1980)

Se ha demostrado la existencia de receptores específicos para tuftsina en PMN, monocitos, linfocitos y macrófagos en un número que va de 50 a 100 mil dependiendo del tipo celular (Gottlieb, 1983; Amoscato, 1983).

Sólo considerando el efecto potenciador de la tuftsina sobre la fagocitosis, se postula como mecanismo de acción una interacción del tetrapéptido con su receptor específico (Amoscato, 1983) induciendo un proceso que involucra la activación de vías enzimáticas y cambios estructurales en el citoesqueleto, los que culminan con la endocitosis de la tuftsina (Bump y Najjar, 1984). Stabinsky, en 1980, estudiando células PMN activadas con tuftsina demostró que ésta libera el calcio intracelular, disminuyen los niveles relativos de AMPc e incrementa los de GMPc (Stabinsky, 1980).

La tuftsina estimula todas las funciones conocidas de las células fagocíticas (Babcock, 1983) al aumentar su actividad metabólica (Hisatsune, 1983).

Spirer reportó que las células PMN humanas aumentan la capacidad de reducción de nitroazul de tetrazolio al ser estimulados con tuftsina, sugiriendo que esta molécula induce la producción de peróxido de hidrógeno (Spirer, 1983). Además, en el mismo trabajo, se demostró que la tuftsina sintética estimula la fagocitosis y la

destrucción intracelular de Staphylococcus aureus y Candida albicans por células PMN y macrófagos de conejos albinos inmunodeprimidos cuando eran incubadas con tuftsina durante 90 minutos previos a la interacción con los microorganismos.

En el mismo trabajo se reporta que los macrófagos aumentaron la liberación de peróxido de hidrógeno hasta en un 30% al ser incubados con el tetrapéptido en concentraciones de 0.1 a 10 µg/ml, lo anterior sugiere que se incrementa la actividad bactericida de estas células .

Constantopoulos en 1983 cuantificó los valores séricos de tuftsina en niños recién nacidos a término y prematuros, no encontrando diferencia significativa al compararlo con los niveles séricos del tetrapéptido en un adulto sano; este autor consideró que el recién nacido se comporta como asplénico y por lo tanto su síntesis de gamaglobulina es mínima, sugiriendo que la tuftsina cuantificada en los dos grupos puede ser de origen materno.

En contraparte, se ha reportado que pequeños péptidos pueden actuar inhibiendo la actividad de macrófagos y PMN, tal es el caso del fragmento 1-3 tuftsina el cual al parecer liga con los receptores específicos para tuftsina pero no es interiorizado a la célula y no es capaz de activar las vías metabólicas. Al incubar macrófagos con esta sustancia los receptores para tuftsina se mantienen bloqueados impidiendo que el tetrapéptido ligue con el receptor (Sorokin et al. 1989).

REDUCCION DE NITROAZUL DE TETRAZOLIO POR CELULAS POLIMORFONUCLEARES.

La reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT) es una técnica que permite la medición de cambios en el metabolismo oxidativo, se utilizó primeramente con Entamoeba histolytica. La reducción de NBT se incrementaba cuando la amiba fagocitaba bacterias. Al parecer, este incremento obedece a perturbaciones de membrana que desencadenan el metabolismo oxidativo de éstas células (Segal, 1974).

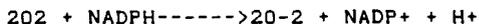
Observaciones hechas en leucocitos PMN (Spirer, 1983) demuestran que estas células son capaces de reducir el NBT haciéndolo virar de amarillo a NBT-formazán morado durante la fagocitosis de microesferas de poliestireno, la reacción que acontece en los fagosomas puede cuantificarse por espectrofotometría de la reducción del formazán leída a 540 nm. Esta reacción se asocia a la generación de peróxido de hidrógeno debida al estallido respiratorio de la célula, -reducción de oxígeno para formar superóxido y peróxido de hidrógeno- estos productos tienen propiedades bactericidas (Segal, 1974).

El estallido respiratorio se caracteriza por un aumento en el consumo de oxígeno y un incremento de la oxidación de la glucosa por la vía de la hexosa monofosfato, la glucosa es oxidada a CO₂ y a pentosa. El receptor de electrones es la enzima NADP que se oxida a NADPH. Durante estas

reacciones y como resultado de ellas se producen una serie de radicales con diversa actividad germicida. En este proceso, el oxígeno es reducido (Nathan, 1974).

Las principales reacciones bioquímicas que se generan durante este fenómeno son:

1.- Formación de superóxido. La reacción es la siguiente:



En este caso el O_2 recibe un electrón adicional.

El superóxido así formado, al alcanzar concentraciones determinadas es un bactericida eficaz.

2.- Formación de peróxido de hidrógeno. La reacción es la siguiente:



El peróxido de hidrógeno es un potente bactericida incluso a bajas concentraciones.

3.- Activación de halógenos. La presencia del peróxido de hidrógeno en el sistema provoca que el cloro y el yodo se activen formando hipohalógenos, los cuales tienen un acentuado poder bactericida. La reacción es la que sigue:

$H_2O_2 + \text{halógeno} + \text{mieloperoxidasa} \rightarrow \text{hipohalógeno} + H_2O$
(Babior, 1978).

La función fisiológica del estallido respiratorio es la producción de radicales libres que destruyen organismos invasores. El intervalo de blancos naturales es muy amplio. Si el blanco es pequeño es englobado y destruido en el

interior de la célula fagocítica, y si es grande la célula se une al cuerpo extraño y libera oxidantes al medio lo más próximo posible al invasor (Baehner, 1976).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las células PMN de los recién nacidos pequeños para su edad gestacional presentan una disminución en todas sus funciones, incluyendo la capacidad de reducción del nitroazul de tetrazolio, en comparación con las células PMN de recién nacidos con peso adecuado para su edad gestacional. Es probable, que esta deficiencia sea debida, entre otras causas, a una menor actividad de la tuftsina sérica. Por lo anterior nos pareció importante evaluar el papel inmunomodulador que juega este tetrapéptido sobre los leucocitos PMN de estos recién nacidos y determinar la concentración de tuftsina sintética necesaria para que estas células se comporten de manera normal en un modelo in vitro.

OBJETIVO GENERAL.

El objetivo general de este trabajo fué determinar el efecto de la tuftsina sintética (Sygma Chemicals Inc.) en el metabolismo oxidativo de células PMN de recién nacidos pequeños para su edad gestacional, para poder evaluar los cambios metabólicos en relación con las células de recién nacidos de peso adecuado para su edad gestacional.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

Los objetivos específicos de esta tesis fueron los siguientes:

1.- Comparar la reducción de NBT por células PMN de recién nacidos pequeños para su edad gestacional y en recién nacidos con peso adecuado a su edad gestacional incubados en solución de Hank.

2.- comparar la reducción de NBT por PMN de recién nacidos pequeños para su edad gestacional y recién nacidos con peso adecuado a su edad gestacional incubados con tuftsina sintética.

3.- comparar la reducción de NBT por PMN de recién nacidos pequeños para su edad gestacional y recién nacidos con peso adecuado a su edad gestacional incubados con el inhibidor de receptores 1-3 tuftsina (Sygma Chemicals Inc.).

HIPOTESIS.

De acuerdo con los antecedentes, podemos suponer que:

1.- Las células PMN de recién nacido pequeño deben presentar una disminución en su capacidad de reducir NBT en comparación con las células de recién nacido de peso adecuado.

2.- En las células incubadas con tuftsina sintética se incrementará la capacidad de reducción de NBT.

3.- Las células incubadas con el fragmento 1-3 tuftsina y suero homólogo se espera que presenten una disminución en la capacidad de reducir NBT.

MATERIAL Y METODO.

Se estudiaron dos grupos de niños. El grupo 1 estuvo constituido por 12 niños recién nacidos pequeños para su edad gestacional y el grupo 2 estuvo formado por 13 niños recién nacidos eutróficos. Las células PMN de ambos grupos se obtuvieron de sangre proveniente del cordón umbilical.

Las células PMN se aislaron por gradiente de densidad y se incubaron en suero homólogo, solución de Hank, tuftsina sintética y fragmento 1-3 tuftsina. Se aplicó la prueba de reducción de NBT a cada uno de estos grupos; se empleó como partícula fagocítica Staphylococcus aureus.

Características de los donantes.

Los recién nacidos pequeños para su edad gestacional fueron hijos de madre toxémica leve, cardiópata o diabética que no recibió medicamentos en el último trimestre del embarazo.

El peso al nacer estuvo entre la percentila 3 y 10, su edad gestacional fué de 34 a 40 semanas por fecha de la última regla (Lubchenco, 1963).

Criterios de no inclusión.

Presencia de alguna infección en la madre, madres medicadas durante el último trimestre del embarazo. Niños cuya edad gestacional fué menor de 34 semanas o mayor de 40.

Criterios de exclusión.

Recién nacidos de término con enfermedad respiratoria, infección intrauterina, malformaciones congénitas o hipoxia.

SEPARACION DE CELULAS POLIMORFONUCLEARES.

La posibilidad de obtener poblaciones puras de células mononucleares y PMN es un paso importante para la investigación de reacciones relacionadas con el sistema inmune. La eficiencia de la separación de células sanguíneas por la técnica descrita por Ferrante y modificada por nosotros (método ficoll-hypaque) depende de la concentración de ficoll y la densidad del medio (Ferrante, 1980). Los mejores resultados se obtuvieron en un medio de separación cuya concentración de ficoll fue del 8.2% y la densidad de 1.076 gr/ml (esta densidad es inferior a la propuesta por Ferrante). El procedimiento de separación fue exitoso llevado a cabo a temperatura ambiente. Se usó siempre sangre fresca. La sangre de la muestra se heparinizó a razón de 25 UI/ml.

Las células aisladas de este modo mantienen sus funciones inmunológicas hasta 2.5 horas pero ya no por 6 horas. Si no pueden trabajarse las muestras de inmediato conviene conservarlas a temperatura ambiente (Ferrante, 1980).

Procedimiento:

Se tomaron 10 ml. de la sangre contenida en el cordón umbilical en un tubo estéril previamente heparinizado, se mezclaron suavemente con el fin de evitar la coagulación. La muestra así tratada se diluyó en proporción 1:1 con solución salina estéril pH 7.2 .

En otros dos tubos se depositaron 3 ml. de la solución ficoll-hypaque estéril - densidad 1.076 -. En estos hubo de vertirse, con mucho cuidado de no romper la interfase, la totalidad de la muestra diluida. Se centrifugó a 2500 rpm durante 30 minutos. Se retiró el sobrenadante y la interfase de linfocitos. El botón se resuspendió en 2 ml. de solución salina estéril pH 7.2 se añadieron 2 ml. de dextran estéril al 3%, se mezcló todo perfectamente con suavidad dejándose reposar durante 20 minutos a 37° C. Se recuperó el sobrenadante, constituido principalmente por PMN, y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón en 3 ml. de cloruro de amonio estéril al 0.85% durante 10 minutos, se centrifugó de nuevo a 1500 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y el botón se resuspendió en 1 ml. de solución de Hank esreril pH 7.2.

Conteo de las células PMN obtenidas.

Las células del resuspendido final son en mayor parte, PMN. Para conocer el número que se tiene, se tomaron 10 µl. y se mezclaron con 90 µl. de solución de Turk, con esta

suspensión se llenó la cámara de Neubauer, se contaron las células y el número obtenido se multiplicó por 1×10^6 para estimar el número de células por ml.

Viabilidad de células PMN.

Al vial que contiene la suspensión anterior se añadieron 10 μ l. de azul de tripan y se mezclaron perfectamente. Se llenó la cámara de Neubauer y se contaron 100 células al azar. Las células muertas adquieren una coloración azul intenso. Así se obtuvo el porcentaje de células vivas.

Pureza de la suspensión de células PMN.

En la preparación anterior se contaron 100 células al azar. Contemplando otras células sanguíneas. De este total fue posible obtener el porcentaje de células PMN.

ESTANDARIZACION DE PROCEDIMIENTOS.

La estandarización de las técnicas se llevó a cabo utilizando células PMN de adulto. Estas se obtuvieron de muestras provenientes del banco de sangre del Hospital Infantil de México.

DETERMINACION DE CONCENTRACION Y TIEMPO OPTIMO DE INCUBACION CON TUFTSINA PARA CELULAS POLIMORFONUCLEARES DE ADULTO.

Las células PMN obtenidas de sangre periférica de adulto, se lavaron con solución de Hank pH 7.2, y se incubaron a distintas concentraciones de tuftsina -de 5 a 30 μ g/ml-. se tomaron 2×10^6 células en 100 μ l que se resuspendieron en 500 μ l de solución de Hank se añadieron 4×10^6 UFC en 200 μ l de

Staphylococcus aureus como partícula fagocítica. Finalmente se agregaron 100 μ l de luminol (5-amino-2,3 dihidro-1,4 phtalazinedidona, Eastman Kodak Co., Rochesrer N.York.) Los sistemas así constituidos se pusieron en un contador de centelleo automático durante un tiempo de 120 minutos. Se utilizaron como control células incubadas con solución de Hank pH 7.2 .

Una vez determinados tiempo y concentración óptimos de incubación se procedió al análisis de la actividad metabólica provocada por la tuftsina en células PMN de adulto.

ANALISIS DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LA TUFTSINA EN CELULAS DE ADULTO.

Las células PMN se aislaron por gradiente de densidad con ficoll-hypaque-dextran, se incubaron 30 minutos en suero autólogo descomplementado al 10%, se lavaron con solución de Hank libre de rojo de fenol pH 7.2. Se resuspendieron 2×10^6 células en 500 μ l de solución de Hank pH 7.2. se agregaron 15 μ g de tuftsina (Sygma Chemicals Inc.) en 15 μ l, se incubaron 20 minutos a 37°C se agregaron 4×10^6 UFC en 200 μ l y se incubaron 25 minutos a 37°C . Como controles, en sistemas idénticos, se trataron los PMN con el fragmento inhibidor 1-3 tuftsina (15 μ g en 15 μ l 20 minutos) y solución de Hank pH 7.2. Se incubaron con 0.5 ml. de NBT al 0.1% en solución de Hank libre de rojo de fenol pH 7.2 y 4×10^6 UFC de Staphylococcus aureus en 200 μ l como partícula

fagocítica. Se incubaron 50 minutos a 37° C. Pasado este periodo se detuvo la reacción con 0.5 ml. de ácido clorhídrico 0.5 normal.

Se centrifugó a 1500 rpm. durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo en 1 ml. de dimetilsulfóxido. Se tomó lectura en espectrofotómetro a 540 nm.

TRATAMIENTOS DADOS A LAS CELULAS POLIMORFONUCLEARES DE RECIEN NACIDAS

Las células PMN empleadas en este proceso fueron tratadas de manera particular, lo cual les confirió ciertas características específicas.

Se formaron 6 grupos de trabajo:

- Grupo 1.- Las células PMN se incubaron en solución de Hank pH 7.2
- Grupo 2.- Las células PMN se incubaron en tuftsina sintética.
- Grupo 3.- Las células PMN se incubaron en inhibidor 1-3 tuftsina.
- Grupo 4.- Las células PMN se incubaron en suero autólogo descomplementado al 10% en solución de Hank pH 7.2.
- Grupo 5.- Las células PMN se incubaron en suero autólogo descomplementado al 10% en solución de Hank pH 7.2 más inhibidor 1-3 tuftsina.

Grupo 6.- Las células PMN se incubaron en suero autólogo descomplementado al 10% en solución de Hank más tuftsina.

REDUCCION DE NITROAZUL DE TETRAZOLIO POR CELULAS POLIMORFONUCLEARES DE RECIEN NACIDOS.

Las células PMN sujetas a los distintos tratamientos se ajustaron a una concentración de 2×10^6 células en 100 μ l. Se incubaron con 0.5 ml. de NBT al 0.1% en solución de Hank libre de rojo de fenol pH 7.2 y 4×10^6 UFC de Staphylococcus aureus en 200 μ l. Se incubaron 50 minutos a 37°C. Pasado este período se detuvo la reacción con 0.5 ml. de ácido clorhídrico 0.5 normal.

Se centrifugó a 1500 rpm. durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo en 1 ml. de dimetilsulfóxido. Se tomó lectura en espectrofotómetro a 540 nm.

El control fue establecido en un tubo que contuvo solo dimetilsulfóxido.

JUSTIFICACION DEL ANALISIS ESTADISTICO.

Para demostrar la normalidad de la distribución de los datos, se hicieron varias pruebas de ajuste, las cuales no fueron significativas, sin embargo la prueba de Kolmogorov-Smirnov mostró tendencia al ajuste en la mayoría de las variables, por lo cual se permite hacer un análisis de

varianza cuyos resultados estadísticos son indicativos de los procesos observados en los experimentos y además para complementar dicho análisis se desarrolló un análisis múltiple de rangos por mínimos cuadrados.

RESULTADOS.

Los resultados mostraron, de acuerdo a lo esperado, que tanto las células de adulto como las de recién nacido de peso adecuado y pequeño para su edad gestacional presentaron un notable incremento en su actividad metabólica al ser incubadas con tuftsina sintética. Este incremento fue cuantificado de manera objetiva determinando la reducción de NBT por los distintos grupos de trabajo. El empleo del inhibidor 1-3 tuftsina permitió evaluar el papel de IgG leucocítica en este proceso.

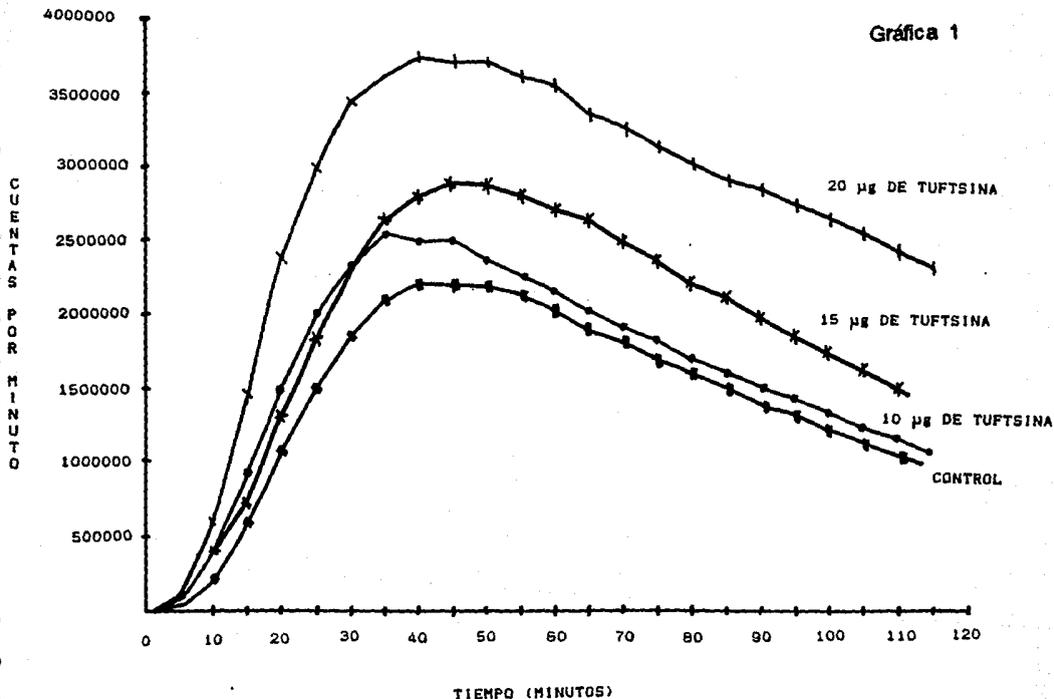
RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE CONCENTRACION Y TIEMPO OPTIMO DE INCUBACION CON TUFTSINA PARA CELULAS POLIMORFONUCLEARES DE ADULTO.

Las lecturas obtenidas con el contador de centelleo se graficaron, cuentas por minuto (CPM) vs tiempo (T), lo cual permitió determinar el comportamiento de las células incubadas a diversas concentraciones de tuftsina en un tiempo dado, obteniendo de tal forma la máxima actividad metabólica provocada por la tuftsina sintética. Como control se utilizaron células incubadas en solución de Hank pH 7.2 .

Los resultados obtenidos se observan en la gráfica siguiente:

COMPORTAMIENTO DE CELULAS PHN DE ADULTO INCUBADAS A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE TUFTSINA

Gráfica 1



RESULTADOS DEL ANALISIS DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LA TUFTSINA EN CELULAS POLIMORFONUCLEARES DE ADULTO.

La actividad biológica producida por la tuftsina sintética sobre las células PMN de adultos fue determinada a partir del metabolismo oxidativo de éstas cuantificado mediante la reducción de nitroazul de tetrazolio (Sygma Chemicals Inc.). Los datos obtenidos (tabla 1) fueron tratados estadísticamente con el fin de determinar si existía un comportamiento diferente entre los distintos grupos experimentales. Las pruebas de reducción de NBT por células PMN realizadas muestran que los grupos de trabajo se comportan de manera distinta.

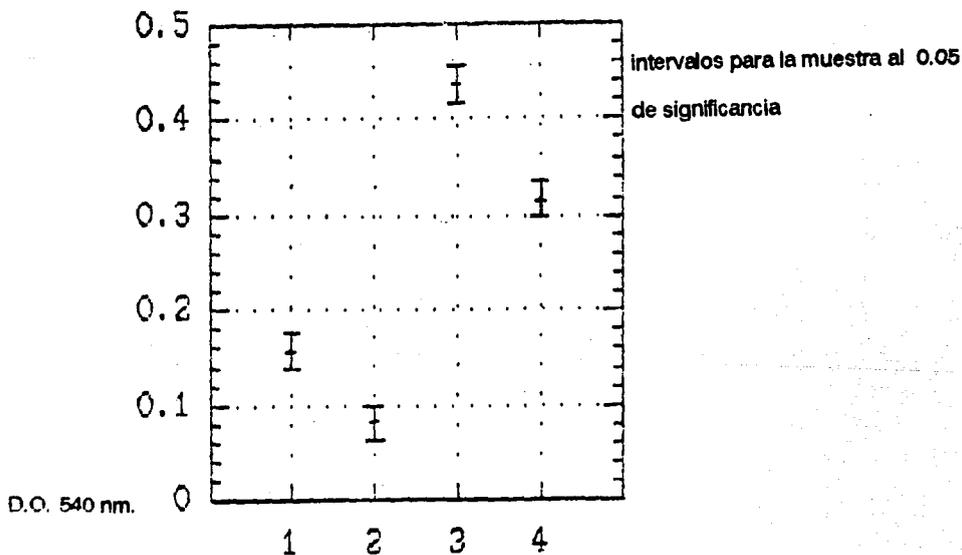
REDUCCION DE NBT POR CELULAS PMN DE ADULTO (TABLA 1)

NO ARMADOS + TUFTSINA	NO ARMADOS SIN TUFTSINA	ARMADOS SIN TUFTSINA	ARMADOS +TUFTSINA
.15	.11	.32	.39
.17	.08	.32	.46
.14	.06	.3	.42
.16	.08	.33	.45
.17	.08	.31	.46

Para todos los casos la incubación fue con 15 µg/ml.de tuftsina para 2×10^6 células PMN. El tiempo total de incubación fue de 50 minutos y la lectura se tomó a 540 n.m.

El análisis estadístico de estos resultados mostró diferencias significativas ($P < 0.0001$ con un valor de $F = 3.24$ a $.05$ de significancia y $3/16$ grados de libertad) entre los distintos tratamientos dados, lo cual sugiere un efecto de la tuftsina, la IgG leucofilica y el fragmento 1-3 tuftsina sobre las células PMN de adulto. Estas diferencias que pueden apreciarse en la gráfica siguiente sugieren que la metodología empleada es eficiente.

Tratamientos dados a células PMN de adulto .

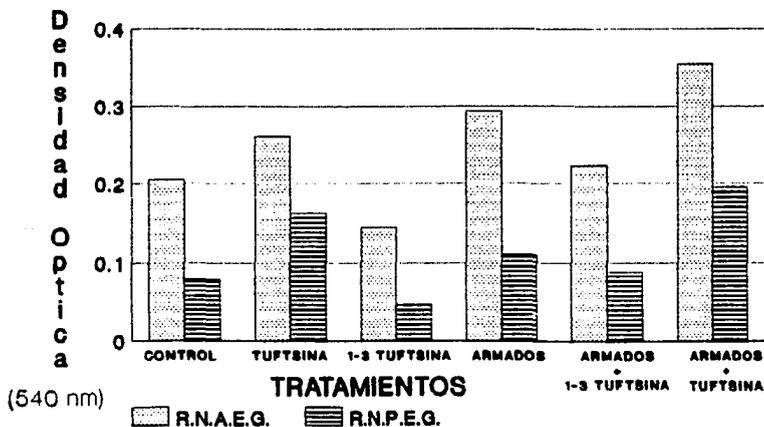


- 1.- PMN + Tuftsina, 2.- PMN Control,
3.- PMN Armados + Tuftsina, 4.- PMN Armados

RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS DADOS A CELULAS POLIMORFONUCLEARES DE RECIEN NACIDOS.

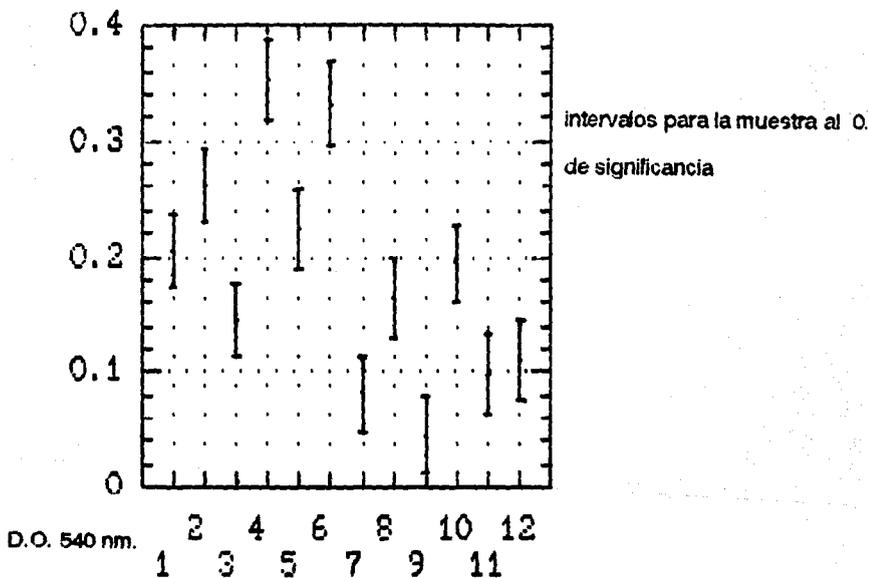
Tanto la actividad metabólica basal como La actividad producida por la tuftsina sintética sobre las células PMN de recién nacidos fue determinada a partir del metabolismo oxidativo de éstas cuantificado mediante la reducción de nitroazul de tetrazolio. A continuación se muestran los comportamientos observados en los distintos grupos experimentales. Las pruebas de reducción de NBT por células PMN realizadas muestran que los grupos de trabajo se comportan de manera distinta como se observa en la grafica siguiente:

Comparacion de los diversos tratamientos efectuados.



El análisis estadístico de los datos obtenidos en los distintos tratamientos dados a las células PMN tanto de RNPEG como de RNPAEG mostró que son significativamente distintos ($P < 0.001$ con un valor de $F = 30.74$ a $.05$ de significancia y 11 grados de libertad). Las diferencias entre grupos se muestran gráficamente en la siguiente gráfica.

Tratamientos dados a células PMN de recién nacidos



- 1.- RNAEG Control, 2.- RNAEG + Tuftsin, 3.- RNAEG + 1-3 Tuftsin,
 4.- RNAEG Armado + Tuftsin, 5.- RNAEG Armados + 1-3 Tuftsin,
 6.- RNAEG Armado, 7.- RNPEG Control, 8.- RNPEG + Tuftsin,
 9.- RNPEG + 1-3 Tuftsin, 10.- RNPEG Armado + Tuftsin, 11.- RNPEG
 Armado + 1-3 Tuftsin, 12.- RNPEG Armado.

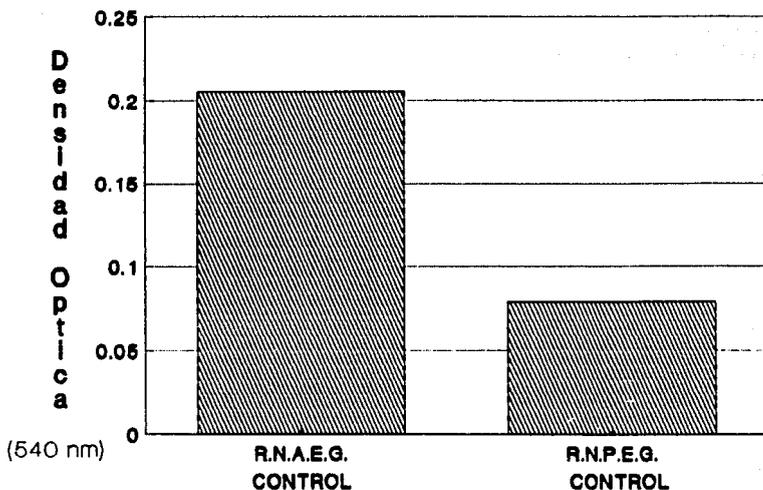
Para determinar las diferencias y similitudes encontradas entre los diversos tratamientos efectuados y para se desarrolló un análisis múltiple de rangos el cual arrojó los siguientes resultados:

GRUPO/TRATAMIENTO	n	MEDIA INTERVALOS	GRUPOS HOMOGENEOS
		D.O. 540 nm	
RNPEG			
+ 1-3 TUFTSINA	12	0.461	*
RNPEG CONTROL	12	0.810	**
RNPEG ARMADO			
+ 1-3 TUFTSINA	11	0.980	*
RNPEG ARMADO	12	0.110	**
RNPAEG			
+ 1-3 TUFTSINA	13	0.145	**
RNPEG			
+ TUFTSINA	12	0.163	**
RNPEG ARMADO			
+ TUFTSINA	12	0.194	**
RNPAEG CONTROL	13	0.205	**
RNPAEG ARMADO			
+1-3 TUFTSINA	11	0.223	**
RNPAEG			
+ TUFTSINA	13	0.260	*
RNPAEG ARMADO	12	0.330	*
+ TUFTSINA	12	0.351	*

Los diversos comportamientos observados en la tabla anterior indican que los tratamientos aplicados a las células les confieren características particulares.

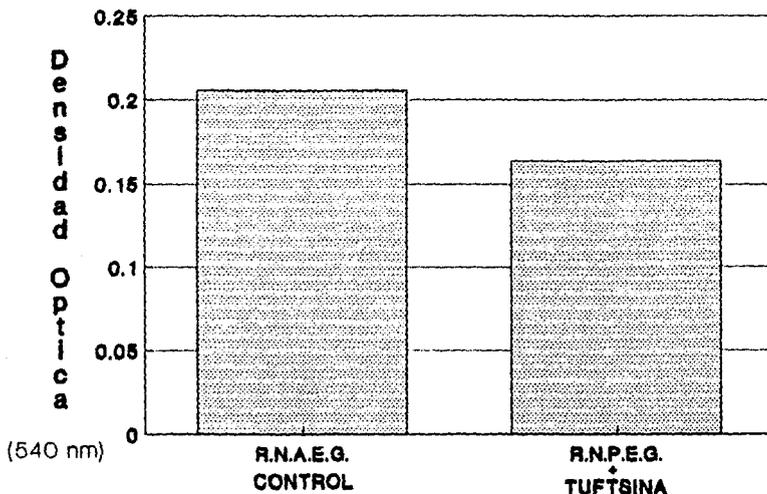
Los grupos control se establecieron con células PMN de recién nacidos con peso adecuado a su edad gestacional (RNAEG) y de recién nacidos pequeños para su edad gestacional (RNPEG) incubados en solución de Hank libre de rojo de fenol pH 7.2. La diferencia en la reducción de NBT se aprecia en la gráfica siguiente:

Comparación de la actividad de PMN R.N.A.E.G. Vs. PMN R.N.P.E.G.



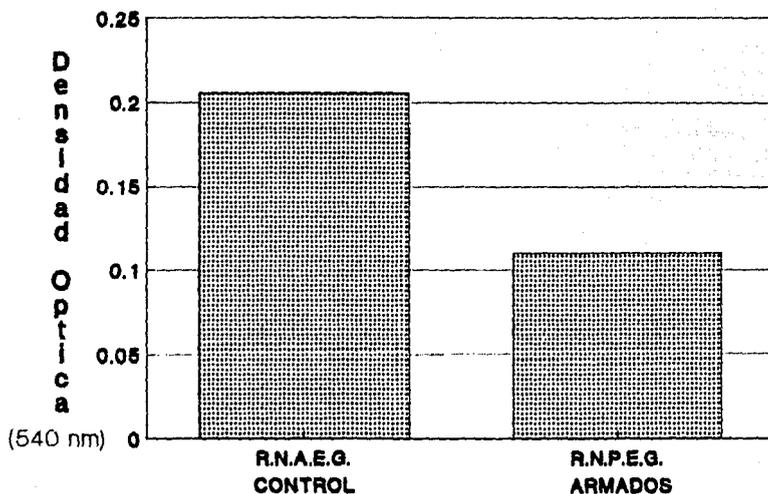
La actividad metabólica de las células PMN de recién nacidos de peso adecuado para su edad gestacional y la de células de recién nacidos pequeños para su edad gestacional incubadas con tuftsina se compara en la gráfica siguiente:

Comparacion de la actividad de PMN Control Vs. PMN de RNPEG incubados con Tuftsina.



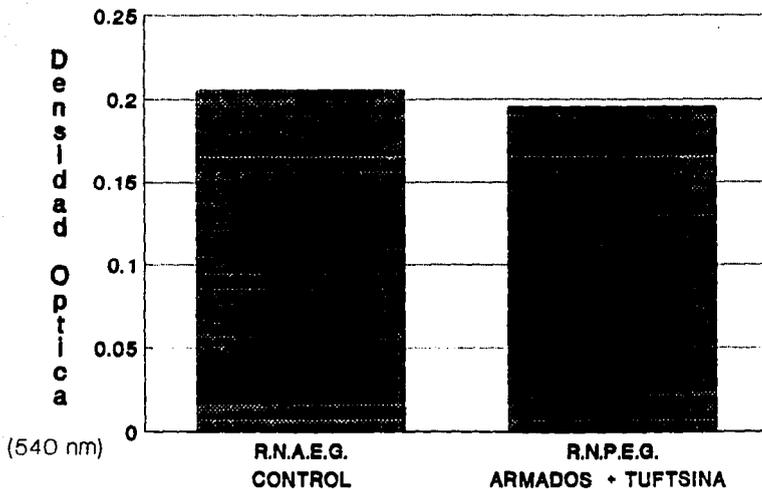
La actividad metabólica de las células PMN de recién nacidos de peso adecuado para su edad gestacional y la de células de recién nacidos pequeños para su edad gestacional "armadas" se puede observar en la siguiente:

Comparacion de la actividad de PMN R.N.A.E.G. Vs. PMN R.N.P.E.G. ARMADOS



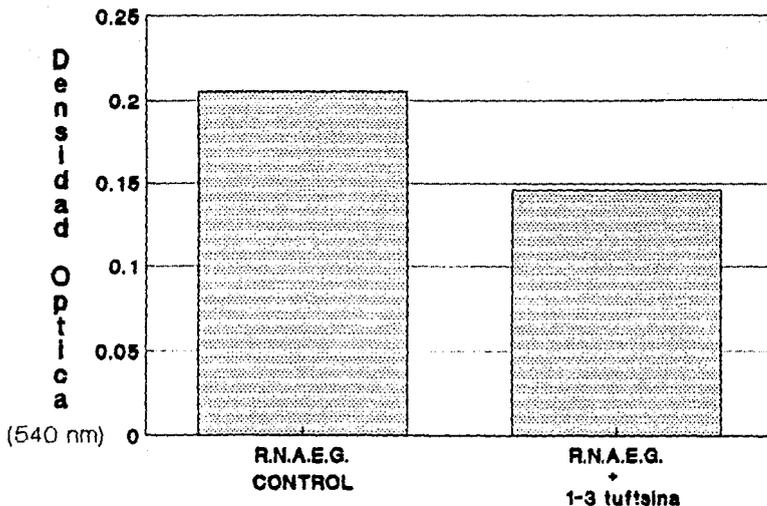
La actividad metabólica de las células PMN de recién nacidos de peso adecuado para su edad gestacional y la de células de recién nacidos pequeños para su edad gestacional "armadas" e incubadas con tuftsina se muestra en la gráfica siguiente:

**Comparacion de la actividad de
PMN R.N.A.E.G. Vs. PMN R.N.P.E.G.
ARMADOS MAS TUFTSINA.**



La actividad inmunomoduladora de la tuftsina fue valorada bloqueando los receptores de membrana específicos para el tetrapéptido con el fragmento 1-3 tuftsina. Estableciendo a las células de recién nacido adecuado a su edad gestacional (RNAEG) como control. El efecto del fragmento se observa en la comparación siguiente:

Comparacion de la actividad de PMN R.N.A.E.G. Vs. PMN R.N.A.E.G. + 1-3 Tuftsina



DISCUSION

Los resultados obtenidos demuestran que la tuftsina sintética posee, en experimentos in vitro, la capacidad de incrementar notoriamente el metabolismo oxidativo de los leucocitos PMN de los recién nacidos pequeños para su edad gestacional. La presencia del tetrapéptido en los sistemas de trabajo nos hace suponer que la deficiencia no está asociada al PMN, sino a una baja concentración plasmática de tuftsina. Debido a estos resultados se puede sugerir que la gamaglobulina linfocítica juega un importante papel en la fagocitosis hecha por PMN y en el proceso de estimulación de estas células. Esta molécula se ha reportado baja en el plasma de los recién nacidos pequeños para su edad gestacional (Constantopoulos, 1983), este hecho se relaciona con la disminución de las funciones celulares especialmente la de reconocimiento y fagocitosis de partículas extrañas; esto se observó al comparar el metabolismo oxidativo de células de recién nacidos de peso adecuado a su edad gestacional incubadas en solución de Hank (control) y aquellas que fueron tratadas con suero descomplementado.

Por otra parte en este trabajo se valoró la actividad de la tuftsina mediante la utilización del fragmento 1-3 tuftsina, que es un inhibidor de los receptores de membrana específicos para el tetrapéptido, se observó un notable decremento del metabolismo oxidativo de las células incubadas con el inhibidor (fragmento 1-3 tuftsina) en

comparación con aquellas que se mantuvieron en solución de Hank. El rol que juega la IgG leucofilica en la actividad fagocítica es claro ya que las células PMN recubiertas o "armadas" con esta molécula lograron una reducción del NBT mayor que los controles tanto en RNAEG como en RNPEG.

En principio se podía suponer que el grupo de células "armadas" e incubadas con tuftsina no serían aquellas que pudieran presentar un mayor incremento en el metabolismo oxidativo, ya que se ha reportado que en sistemas saturados con el tetrapéptido éste actúa como inhibidor de la fagocitosis (Najjar, 1982) sin embargo esto se observó a lo largo del trabajo lo cual posiblemente obedezca al margen dado en la concentración de tuftsina en los sistemas experimentales. La curva de la cinética de la tuftsina, elaborada con las lecturas del contador de centelleo, indicaron que el sistema puede cargar hasta 20 µg. de tuftsina sin que la actividad celular sea inhibida. El trabajo fue desarrollado empleando 15 µg. Tal vez la acción de la tuftsina presente en la IgG leucofilica aunada a la ventaja que adquiere la célula al estar recubierta (armada) puede ser el motivo de este comportamiento.

La acción de la tuftsina en el incremento del metabolismo oxidativo de las células PMN de recién nacidos pequeños para su edad gestacional sugiere que éstas células no están disminuidas en sus funciones, sino que su eficiencia se encuentra supeditada a las concentraciones plasmáticas de tuftsina y por ende a la de IgG leucofilica.

CONCLUSION

El metabolismo oxidativo se cuantificó utilizando una técnica de reducción de azul de tetrazolio. El proceso de reducción fue claramente diferente en todos los grupos de trabajo. Los tratamientos aplicados a cada grupo les brindaron características particulares. Hubo diferencias significativas entre los recién nacidos de peso adecuado para su edad gestacional y los recién nacidos pequeños para su edad gestacional en solución de Hank, recién nacidos pequeños armados y recién nacidos adecuados incubados con el inhibidor 1-3 tuftsina. No se encontraron diferencias significativas entre los PMN de recién nacidos adecuados para su edad gestacional y los de recién nacidos pequeños para su edad gestacional incubados con tuftsina y "armados" y los incubados con tuftsina. La acción de la tuftsina en el incremento del metabolismo oxidativo de las células PMN de recién nacidos pequeños para su edad gestacional nos hace suponer que estas células no están disminuidas en sus funciones, sino que su eficiencia se encuentra sujeta a las concentraciones plasmáticas de tuftsina y por ende a la de IgG leucocítica.

COMPROMISO ETICO

La realizaci3n de este trabajo no afect3 la integridad de los ni1os ni puso en peligro su vida, no se interfiri3 ning3n tratamiento m3dico ya que la sangre se obtuvo del cord3n umbilical. A las madres de los ni1os se les explic3 claramente el objetivo del estudio y que el participar en 3l no les aportaría ning3n beneficio directo o indirecto. En los casos en que fu3 posible, se recab3 la aceptaci3n por escrito en una forma previamente elaborada, en la cual se resumían los objetivos de la investigaci3n y se aclaraba que ni ellas ni sus vástagos serían sujetos a represalias ni a beneficios por parte del hospital ni del cuerpo m3dico en caso de colaborar o no.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Amoscato, A.A. & P. Davies. (1963). Receptor mediated internalization of tuftsin. *Ann. New York Acad. Sci.* 419, 114-135.
- 2 Babior, B.M. (1978). Oxygen dependent microbial killing by phagocytes. *N. Eng. J. Med.* 81, 298 (12,13):659-668, 721, 725.
- 3 Bach, J.F. (1981). *Inmunologia*. Masson. pp.3-44, 89-110. Barcelona, España.
- 4 Baehner, R.L. & L.A. Boxer. (1976). The biochemical basis of nitroblue tetrazolium reduction in normal and chronic granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes. *Blood*, 48(2): 309-313.
- 5 Babcock, A. (1983). Effect of tuftsin on the migration, chemotaxis and differentiation of macrophages and granulocytes. *Ann. New York Acad. Sci.* 419, 64-74.
- 6 Bump N.J. and V. Najjar. (1984). Tuftsin (Thr-Lis-Pro-Arg) a natural modulator of macrophage activity: further studies. *Mol. and Cell. Biochem.* 63, 137-142.
- 7 Chandra, R.K. (1975). Fetal malnutrition and postnatal immunocompetence. *Am. J. Dis. Child.* 129, 450-454.
- 8 Cline, M.J. and Leher, R. (1978). Monocytes and macrophages: function and diseases. *Ann Intern. Med.* 88, 78-81.
- 9 Constantopoulos A. (1983). Congenital tuftsin deficiency. *Ann. New York Acad. Sci.* 419, 214-219.
- 10 Edelman G.M. (1973). Antibody structure and molecular immunology. *Science*. 180, 830-834.
- 11 Ferrante, A., Y. (1980). Thong. Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the hypaque-ficoll method. *Jour. Immunol. Meth.* 36, 109-117.
- 12 Fidalgo, B.V. (1967). Leucophilic gammaglobulin and the phagocytic activity of the polymorphonuclear leucocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 57, 957-964.
- 13 Friedman H. (1979). Subcellular factor in immunity. *Ann. New York Acad. Sci.* 332, 124-146.

- 14 Gottlieb, P. & Y. Stabinsky. (1983). Tuftsin receptors. Ann. New York Acad. Sci. 419, 93-106.
- 15 Hisatsune K. & S. Nozaky. (1983). A biochemical study of the phagocytic activities of tuftsin and its analogues. Ann. New York Acad. Sci. 419, 205-213.
- 16 Kabat E.A. (1978). Structural concepts in immunology and immunochemistry. 2a. ed., Holt, Rinehart & Winston. pp. 127-139. N. York.
- 17 Loor F. (1977). B and T cells in immune recognition. Wiley & sons. pp. 54-62, 141-154. N. York.
- 18 Lubchenco, L.O. Hansman, C. (1963). Intrauterine growth as estimates from live born birth weight date at 24-42 weeks of gestation. Pediatrics. 32, 793-800.
- 19 Lydyard, P.M. (1982). Characteristics and function of Fc receptor on human lymphocytes. Immunology. 47, (1): 217-224.
- 20 Martinez-Cairo, S. y López, M. (1977). Linfocitos T y B en sangre periférica del recién nacido desnutrido "in utero". Vol. Med. Hosp. Infant. 24, 393-396.
- 21 Martinez-Cairo, S. y Carmona, P. (1985). Actividad del factor químico sérico en niños recién nacidos desnutridos. Arch. Invest. Med. 16, 199-207.
- 22 Morgan, E.L. & T.E. Hugli. (1982). Isolation and identification of a biologically active peptide derived from the human IgG. Proc. Nat. Acad. Sci. 79, 5388-5391.
- 23 Najjar, V.A., K. Nishioka. (1970). Tuftsin a physiological phagocytosis stimulating peptide. Nature. 228, 672-674.
- 24 Najjar, V.A. (1980). Biochemistry and physiology of tuftsin. En The reticuloendothelial system. Sbarra A.J. and Straus. Plenum publishing Corp. pp. 45-71. New York.
- 25 Najjar, V.A. (1982). Cytophilic gammaglobulin and tuftsin. Surv. Immunol. Res. 1, 9-16.
- 26 Najjar, V.A. (1983). Tuftsin, a natural activator of phagocyte cells: an overview. Ann. New York Acad. Sci. 419, 1-11.
- 27 Nathan, D.G. (1974). NBT reduction by human phagocytes. New Eng. Jour. Med. 298, 680-684.
- 28 Nishioka, K., A. Constantopoulos. P.S. Satoh. (1973). Characteristics and isolation of the phagocytosis-stimulating peptide, tuftsin. Biochim. Biophys. Acta 310, 217-229.

- 29 Pabst, H.F. (1980). Ontogeny of the immune response as basis of childhood disease. *J.Ped.* 97, 519-534.
- 30 Prokopowitz, J. and Ziogro J. (1975). Bactericidal capacity of plasma and granulocytes in small for-dates newborns. *Acta Paed Acad Scient. Hung.* 16, 267-270.
- 31 Segal, A.W. (1974). Nitroblue tetrazolium test. *The Lancet.* Nov.23, 1248-1252.
- 32 Sorokin, S. and R.F. Hoyt. (1989). Nonimmune-mediated phagocytosis by "premedullary" lung macrophages: effects of concanavalin A, tuftsin, and macrophage inhibitory peptide. *The Anatom. Record.* 223, 55-61.
- 33 Spirer, Z., V. Zakuth. (1983). The effect of tuftsin on the nitroblue tetrazolium reduction of normal human polymorphonuclear leucocytes. *Jour. Clin. Inv.* 55, 198-200.
- 34 Stabinsky, Y. (1980). The phagocytosis stimulating peptide tuftsin. *Mol. Cell. Biochem.* 30, 165-170
- 35 Stites, D.P. (1983). *Inmunologia clinica. El manual moderno.* pp. 398-416. Mexico, D.F.
- 36 Wilkinson, P.C. (1980). Leukocyte locomotion and chemotaxis. *New Eng. J. Med.* 303, 203-210.
- 37 Xanthou, M. (1985). Immunologic deficiencies in small for dates neonates. *Acta Paed. Scan. Supp.* 319, 143-149.