



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
" ZARAGOZA "

IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE INDUCTORES
A LA FORMACION DE RECEPTORES PARA Fe Y C3
EN ORGANOS MURINOS Y SUERO Y ORINA HUMANA.

TESIS

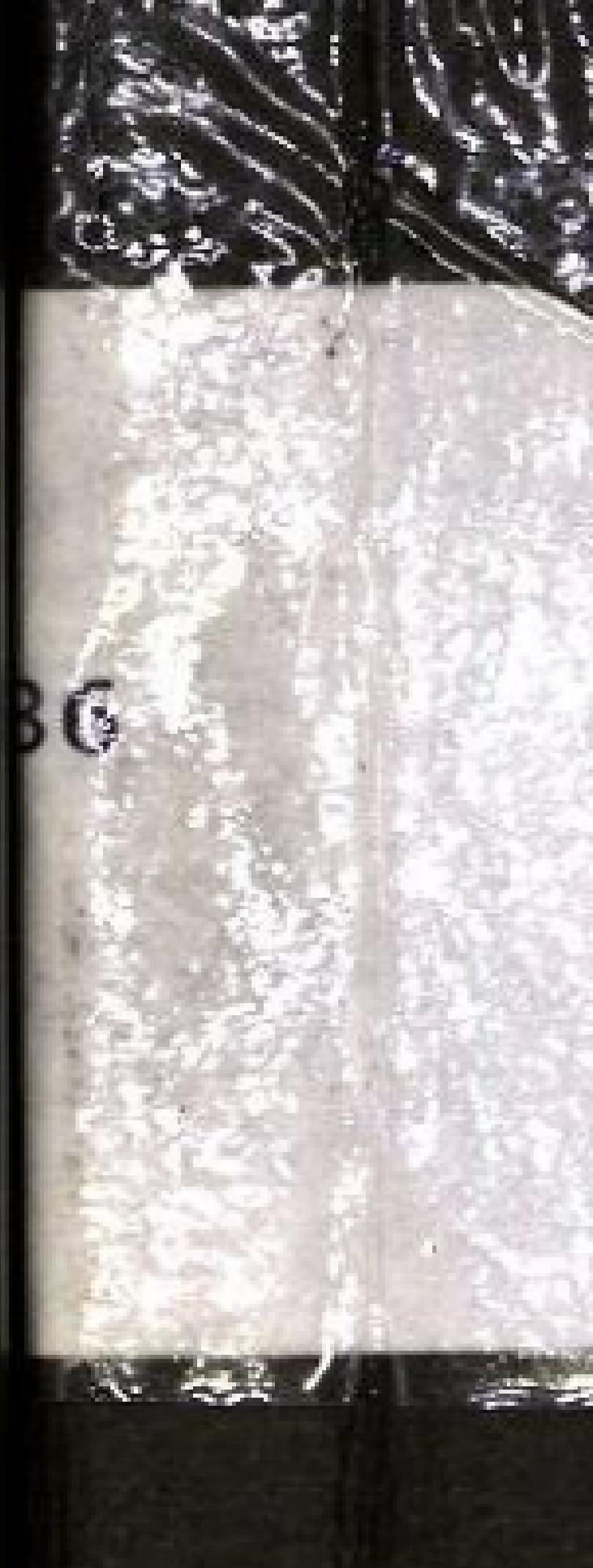
Que para obtener el Titulo de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presentan

MIGUEL ANGEL ARCIGA GRANADOS
T. ALEJANDRO FRAGOSO JIMENEZ

MEXICO, D. F.

1983



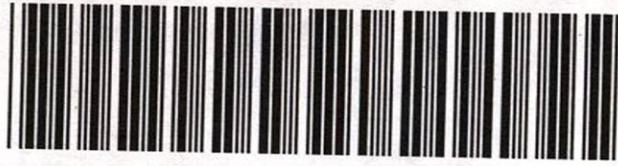
T

QR18

.7

A7

c.1



1080075096



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

Oliver

**IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE INDUCTORES
A LA FORMACION DE RECEPTORES PARA Fc Y C3
EN ORGANOS MURINOS Y SUERO Y ORINA HUMANA.**

TESIS

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a n

**MIGUEL ANGEL ARCIGA GRANADOS
T. ALEJANDRO FRAGOSO JIMENEZ**



MEXICO, D. F.

1983

T
92186
• 77
A7

CON TODO MI CARIÑO A MI MADRE Y AMIGA,
POR TODOS LOS APOYOS Y ESFUERZOS QUE
SIEMPRE ME HA BRINDADO PARA EL BENEFI-
CIO Y FORMACION DE MI PERSONALIDAD.



A MI HERMANO POR COMPARTIR MIS
FRACASOS Y ALEGRÍAS:

A MI ABUELITA ESPERANZA POR
SUS CUIDADOS Y ESMEROS PARA
CONMIGO.

A LA MEMORIA DE MI ABUELITO VICENTE Y
TIO RUBEN, POR EL EJEMPLO DE CONFIANZA
Y DIGNIDAD QUE SIEMPRE ME INCULCARON.

A MIS TIOS, PRIMOS Y AMIGOS
POR LA CONFIANZA QUE HAN -
DEMOSTRADO TENERME.

CON CARIÑO A TODOS MIS MAESTROS, POR DARMEN
PARTE DE SUS CONOCIMIENTOS Y AYUDARME A -
CULMINAR UNA DE LAS ETAPAS MAS IMPORTANTES
DE MI VIDA.

CON ESPECIAL GRATITUD AL Dr. BENNY WEISS,
QUE SIN SU VALIOSO ASESORAMIENTO NO HU-
BIERA SIDO POSIBLE LA FINALIZACION DE-
ESTE TRABAJO.

AL Dr. MARIO CALCAGNO POR LA AYUDA
PRESTADA A LA REALIZACION DE ESTA
INVESTIGACION.

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL LA-
BORATORIO DE DIFERENCIACION CELULAR Y CAN--
CER, EN LA ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PRO
FESIONALES "ZARAGOZA" BAJO LA DIRECCION DEL
Dr. BENNY WEISS STEIDER.

INDICE

Capítulo I

INTRODUCCION

EL SISTEMA INMUNE

INMUNOGLOBULINAS

EL SISTEMA DE COMPLEMENTO

DIFERENCIACION CELULAR

RECEPTORES DE MEMBRANA

Capítulo II

FUNDAMENTACION DEL TEMA

Capítulo III

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Capítulo IV

OBJETIVOS

Capítulo V

HIPOTESIS

Capítulo VI

MATERIALES Y METODOS

Capítulo VII

RESULTADOS

Capítulo VIII

DISCUSION

Capítulo IX

APENDICE

BIBLIOGRAFIA

Capítulo I

INTRODUCCION

En forma general; se puede obtener un cultivo de células separando un fragmento de tejido en sus componentes celulares, por lo general con ayuda de tripsina, después de extraer esta, la suspensión se coloca en un recipiente de vidrio, o plástico de fondo plano (caja de petri o tubos de ensaye) junto con un medio líquido (por ejemplo el medio ideado por Eagle) que contiene los iones requeridos a concentraciones isosmóticas, un número de aminoácidos, vitaminas y un suero animal (6). El bicarbonato suele emplearse como un tampón en equilibrio con el CO_2 del aire, situado por encima del medio.

De esta forma el cultivo de tejidos se ha convertido en una técnica ideal para resolver muchos de los problemas relacionados con los mecanismos de inmunidad, así como para seguir el comportamiento de las células en cultivo (7).

Mediante la técnica de cultivo de clonación celular realizada in vitro (8), ha sido posible obtener el aislamiento de las líneas celulares individuales de los tejidos linfoide y hematopoyético, así como la diferenciación de varias categorías de células precursoras de estos tejidos (8). El cultivo de tejido hematopoyético provee nuevas oportunidades para el estudio experimental de los factores que determinan la dirección de la diferenciación de los precursores hematopoyéticos así como la cinética de este tejido.

Hoy en día gran número de manifestaciones de inmunidad pueden ser provocadas con éxito (9). Algunas de las reacciones inmunológicas que no han sido plenamente explicadas requieren análisis por medio de cultivo de tejidos in vitro (10). Por ejemplo, el problema de interacción entre las células de los tejidos, o bien el mecanismo de las fases sucesivas de la respuesta inmune.

EL SISTEMA INMUNE

EL SISTEMA INMUNE

Las respuestas inmunológicas son procesos adaptativos extraordinariamente versátiles, que dan lugar a que los animales produzcan - proteínas reactivas específicas como respuesta al estímulo que presentar las innumerables moléculas orgánicas y las macromoléculas.- Al parecer, esta capacidad es de adquisición relativamente reciente, ya que este tipo de respuesta aparece tan solo en los vertebrados, en los que resulta indispensable para la supervivencia: estos mecanismos constituyen el principal medio de defensa, tanto frente a - los microorganismos y a los virus patógenos, como frente a las propias células del huésped que presenta una degeneración maligna (11, 12, 13).

El sistema inmune es comparable en complejidad de sus funciones al sistema nervioso. Ambos sistemas son órganos difusos que se dispersan a través de la mayoría de los tejidos corporales (14, 2).

El sistema inmune está constituido básicamente por linfocitos y moléculas de anticuerpos, cuya primera función es reconocer tanto moléculas extrañas como a las del propio organismo (15).

En el hombre el sistema inmune pesa aproximadamente 0.908 Kg y consiste de más o menos 1 trillón (10^{12}) de células llamadas linfocitos y cerca de 100 millones de trillones (10^{20}) de moléculas llamadas anticuerpos, los cuales son producidos y secretados por los linfocitos. Las células y moléculas del sistema inmune, reaccionan en la mayoría de los tejidos a través del torrente sanguíneo, entrando a los tejidos por la penetración de las paredes de los capilares, - para que una vez realizada su función regresen de la misma forma al sistema vascular, o al propio sistema linfático (Figura 1).

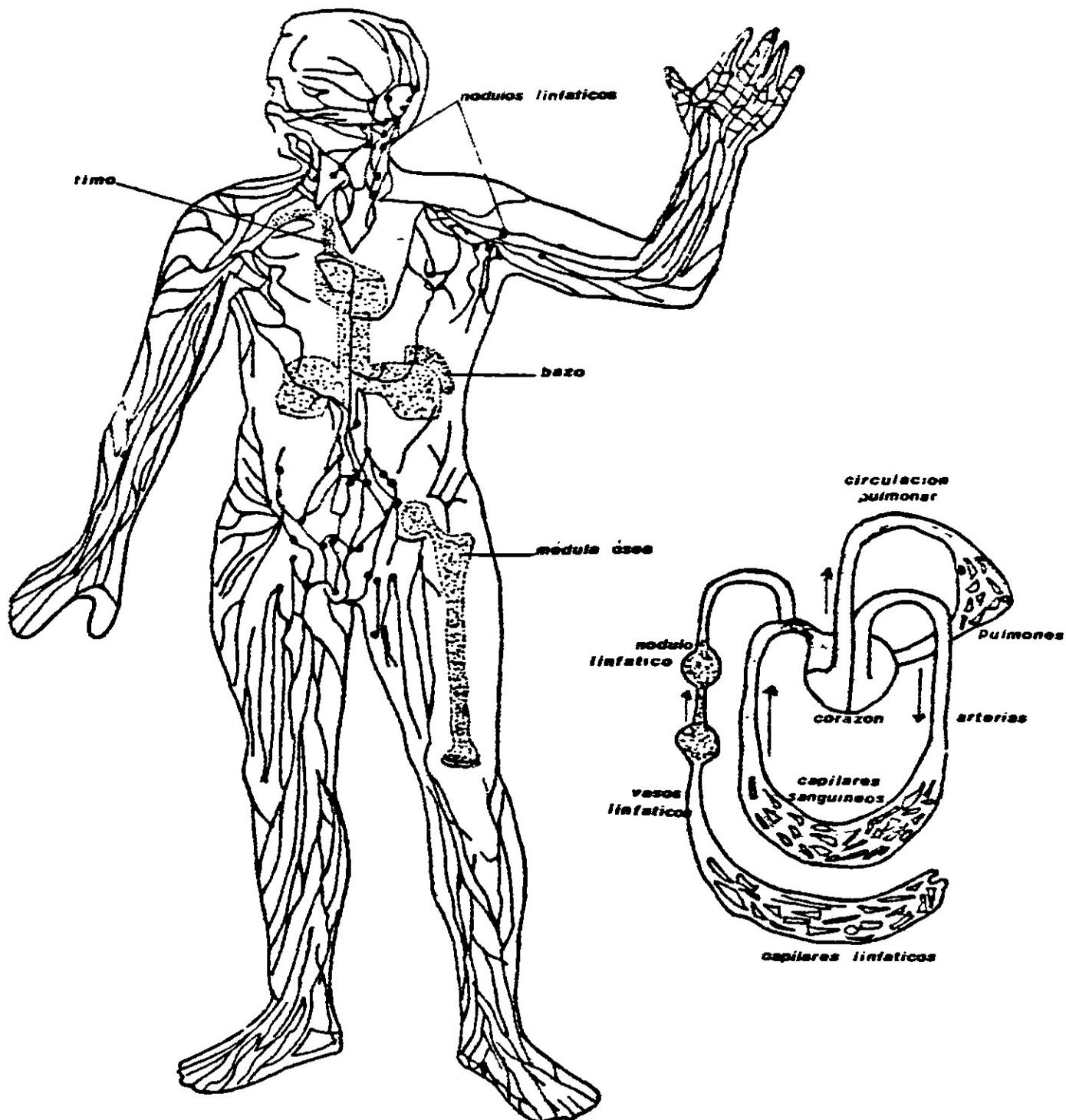


FIGURA 1: REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LOS PRINCIPALES ORGANOS QUE SE RELACIONAN CON EL SISTEMA INMUNE (IZQUIERDA). Y LA RELACION EXISTENTE ENTRE LOS VASOS SANGUINEOS Y LINFATICOS POR LOS QUE ENTRAN Y SALEN LAS CELULAS Y ANTICUERPOS (DERECHA).

El árbol de vasos linfáticos colectan linfocitos y anticuerpos, - junto con otras células y moléculas, así como el fluido intersticial que baña todos los tejidos corporales para que de esta forma viertan sus contenidos de regreso al torrente sanguíneo por medio de las venas subclavias situadas atrás de las clavículas (16).

Los linfocitos se encuentran en altas concentraciones en los nodu los linfáticos y en los sitios donde son fabricados y procesados: la médula ósea, el timo y el bazo (6).

El sistema inmune esta sujeto a continuas altas y bajas, por ejemplo alrededor de cada media hora el cuerpo humano produce 10 millones de linfocitos nuevos y 1 millon de billones de nuevas moléculas de anticuerpos.

Esto podria ser de poca importancia si todos esos anticuerpos fueran iguales pero no es asi; millones de diferentes moléculas son requeridas para copiar el patron de reconocimiento (17).

Los patrones específicos que son reconocidos por los anticuerpos se llaman epitopos: parte sobre la superficie de grandes moléculas tales como proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos, todas aquellas moléculas que muestren epitopos son llamados antígenos (18).

Además de los linfocitos y moléculas de anticuerpos, el sistema inmune cuenta con fagocitos mononucleares y polimorfonucleares. Dentro de los mononucleares se encuentra el monocito circulante, el cual es una célula proveniente de la médula ósea con una vida aproximada de 8 horas que se fija a los tejidos y que ha diferencia de los polimorfonucleares no mueren una vez que deja la circulación sino que estos maduran a macrófagos (histiocitos) en los tejidos, macrófagos alveolares en los pulmones, células de Kupfer en el hígado y macrófagos en el bazo, ganglios linfáticos y otros sitios.

Su papel principal es el de controlar microorganismos los cuales son

capaces de sobrevivir intracelularmente y contra los cuales los polimorfonucleares son inefectivos. Los monocitos pueden servir de ayuda a los polimorfonucleares en las infecciones agudas; pero aquellos fagocitan mucho menos eficientemente y carecen de muchos de los sistemas bactericidas potentes de los polimorfonucleares.- Los macrófagos son mucho mas eficientes en las infecciones cronicas (2,5,6).

Los mecanismos de defensa los podemos dividir en dos tipos: los no especificos y los especificos.

Los mecanismos no especificos se les conoce tambien como inmunidad innata, inmunidad natural o resistencia no especifica y son todos aquellos mecanismos con los que se nace. La inmensa mayoria de las infecciones son eliminadas aqui.

El mecanismo especifico es aquella inmunidad que adquirimos a través de la vida y se caracteriza por ser: especifica; es decir la inmunidad contra un germen es especifica de este, inducible; para que se genere la serie de efectores se requiere de la exposicion previa del germen en cuestion, presenta memoria; en la cual la inmnidad tiene la capacidad de reconocerlo cuando se le presenta por segunda ocasion y es transferible; por suero o por linfocitos.

La inmunidad adquirida se puede dividir en: activa y pasiva.

La inmunidad activa es aquella en que la serie de mecanismos de defensa son generados por el propio individuo y puede ser: natural; cuando con el contacto con el germen es en forma natural (padecer la enfermedad) e inducida; cuando se pone en contacto con el germen en cuestion en forma deliberada (vacunacion).

La inmunidad adquirida pasiva es aquella en que se le son transferidos al individuo los mecanismos de defensa y puede ser también natural; paso por placenta o por calostro de los anticuerpos vía madre-feto, o madre-producto, y artificial; como la seroterapia.

Los seres vivos con capacidad de reconocimiento de lo propio y lo extraño, tienen una gran ventaja selectiva ya que en el momento en que aparezcan células aberrantes, estas normalmente serán eliminadas debido a que se le reconocería como extraña (19).

Se calcula que un adulto tiene aproximadamente 100 billones de células y que el recambio diario es de $1/20$. Por lo tanto la posibilidad de mutantes es alta y la aparición dentro de estas mutantes de células tumorales no se descarta; sin embargo normalmente no hay aparición de tumores, se propone al sistema inmune como el responsable de esto (Teoría de vigilancia inmunológica) (20).

Se le llama antígeno o inmunógeno a una sustancia que introducida en un animal induce una respuesta inmune detectable celular, humoral o en la mayoría de los casos ambas.

La gran mayoría de los antígenos son proteínas macromoleculares, aunque también a partir de polisacáridos, polímeros sintéticos y nucleoproteínas se pueden obtener anticuerpos.

Para que una molécula pueda ser inmunogénica debe cumplir con algunas características tales como: masa molecular mayor de 10,000, que sea extraña, que sea antigenica, que presente rigidez estructural; así como de la constitución genética del animal; dosis y vía de administración.

Los antígenos según su naturaleza química los podemos dividir en: naturales; son todos aquellos que se encuentran en la naturaleza como pólen, tierra, lana etc, sintéticos; elaborados por completo

en el laboratorio y artificiales; que son parcialmente elaborados - en el laboratorio.

Las sustancias conocidas como haptenos no son inmunogénicas pero - reaccionan de manera muy selectiva con el correspondiente anticuerpo y no con una multitud de otros anticuerpos inducidos por otros - antígenos.

Los antígenos pueden ser divididos en base a su destino en la respuesta inmune en: antígenos timo-dependientes; aquellos que para que induzcan una respuesta inmune, requieren de la participación de células "T". Los antígenos timo-independientes; son aquellos en donde no es indispensable la participación de células "T".

Una vez que el antígeno alcanza el sistema linfático, es necesario una serie de interacciones celulares (linfocito-macrófago) para que se induzca adecuadamente una respuesta inmune.

El macrófago juega un papel central, en la inducción de una respuesta inmune con respecto a la presentación del antígeno. Esta célula es la responsable de fagocitar el antígeno, procesarlo y presentarlo - de una manera adecuada a los linfocitos (células que dan origen a - los mediadores de la respuesta inmune).

Si un antígeno timo-dependiente llega directamente a un linfocito - "B" este es bloqueado y no produce anticuerpos; pero si el antígeno es timo-independiente, este será capaz de producir una fuerte -- respuesta produciendo anticuerpos. El hecho de que el antígeno timo-independiente (antígeno polimerizado) sea capaz de producir anticuerpos, tal vez se pueda explicar mediante la presentación del antígeno en forma polimerizada (forma de presentación del antígeno por el macrófago al linfocito "B") (Figura 2).

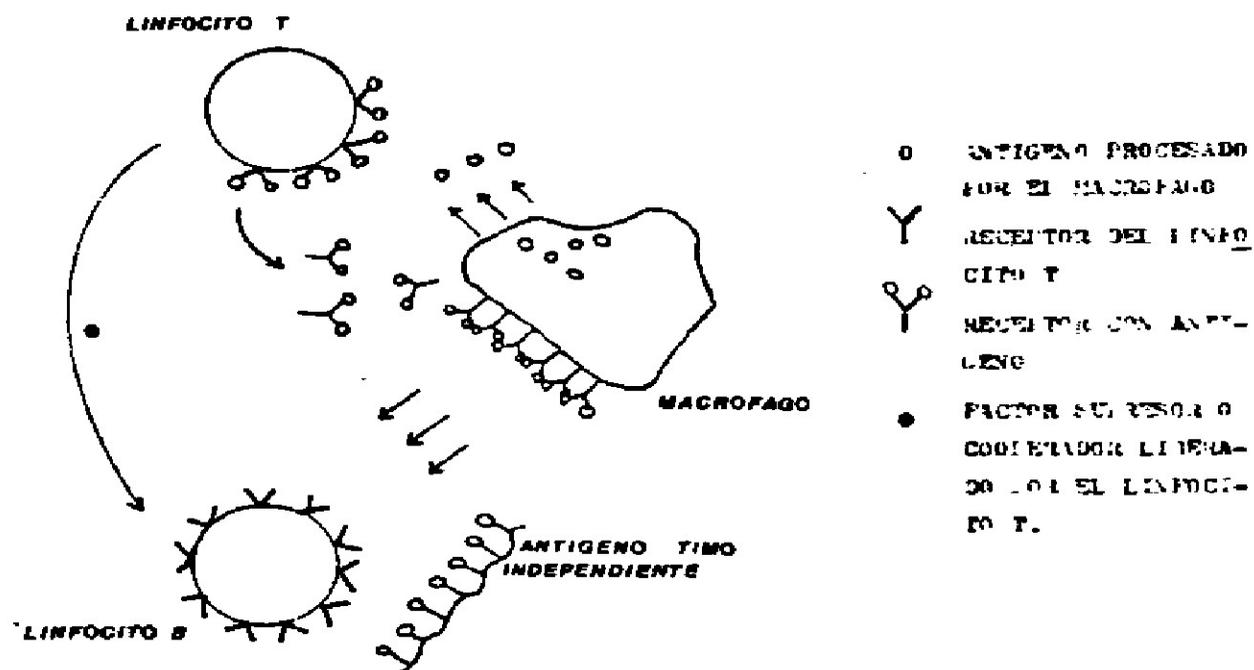


FIGURA 2: COOPERACION MACROFAGO-LINFOCITO, EN LA CUAL EL MACROFAGO PROCESA Y PRESENTA AL ANTIGENO DE MANERA ADECUADA A LOS LINFOCITOS.

Una vez que el linfocito "T" o "B" entra en contacto con el antígeno específico, en una forma adecuada, comienza una fase de proliferación que se le conoce como fase inductiva, dando origen a células de memoria y a células efectoras (Figura 3).

Las células de memoria son linfocitos pequeños que tienen una vida larga, que al ponerse en contacto por segunda vez con un antígeno específico se dividen dando origen a las células de memoria y a células efectoras.

La respuesta inmune humoral es muy importante en la eliminación de bacterias extracelulares, así como en la neutralización de toxinas; pero es ineficiente en la eliminación de bacterias intracelulares. En cambio la respuesta de tipo celular juega un papel muy importante en la eliminación de bacterias de tipo intracelular, así como también en el rechazo de trasplantes y tumores.

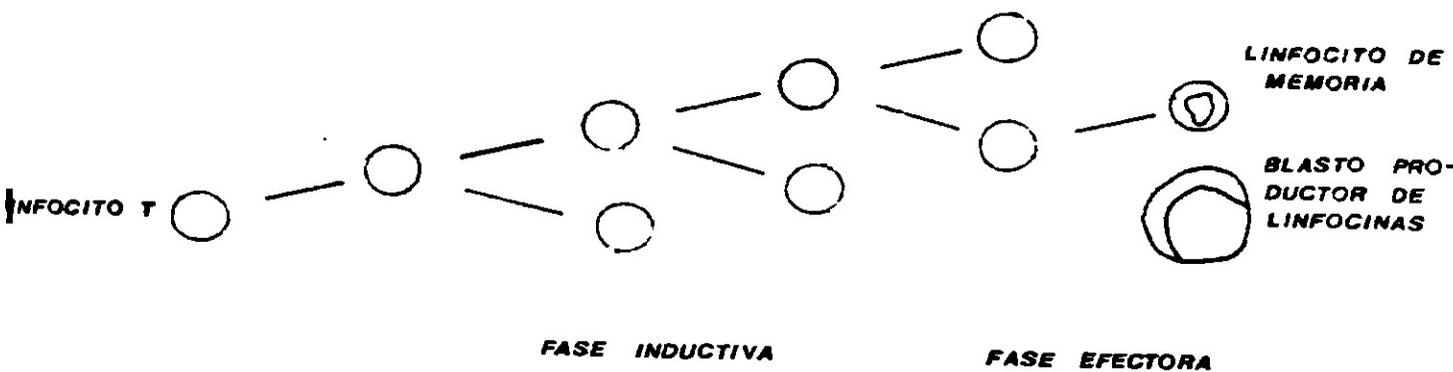
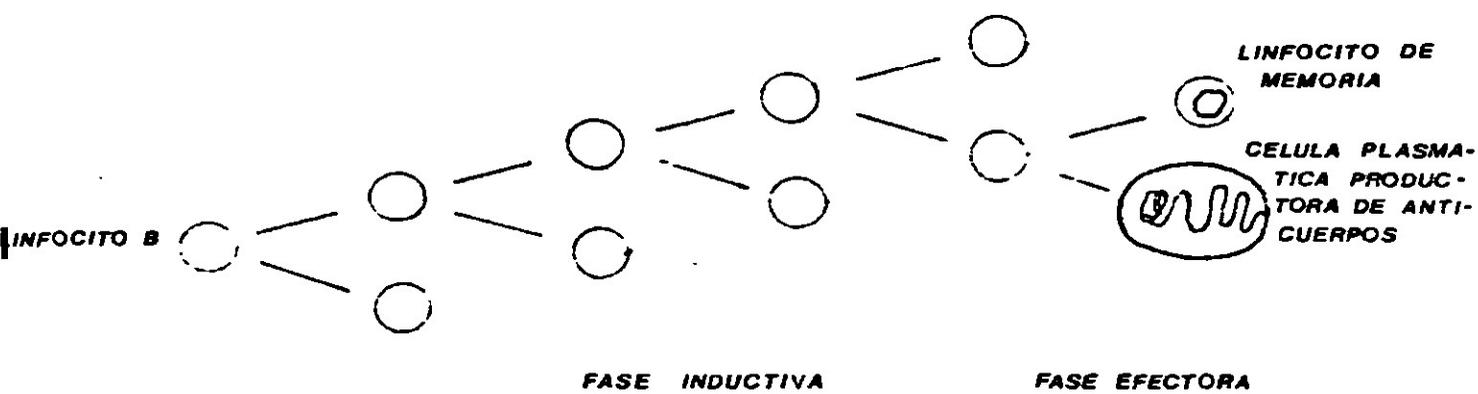


FIGURA 3: FASE INDUCTIVA Y EFECTORA, UNA VEZ QUE EL LINFOCITO ENTRE EN CONTACTO CON EL ANTIGENO ESPECIFICO

INMUNOGLOBULINAS

INMUNOGLOBULINAS

Las inmunoglobulinas (Igs) son moléculas glicoproteicas, compuestas de 91 % de proteínas y 9 % de carbohidratos con actividad de anticuerpos, es decir tiene la capacidad de combinarse con la sustancia (antígeno) que indujo su formación.

Las inmunoglobulinas comprenden un grupo heterogéneo de glicoproteínas y constituyen aproximadamente un 20 % de las proteínas totales del plasma.

En una electroforesis, la mayoría de las inmunoglobulinas migran a la zona llamada gamma-globulina, debido a esto las inmunoglobulinas también se les conoce como gamma-globulinas, sin embargo una cantidad significativa se encuentra en la región de las beta-globulinas .

Los anticuerpos son moléculas bifuncionales ya que se unen específicamente con el antígeno y también inician una gran variedad de fenómenos secundarios, tales como: fijación de complemento, liberación de histamina por células cebadas y basófilos. La actividad biológica de las inmunoglobulinas solamente puede ser entendida en base al conocimiento de su estructura. Las moléculas de anticuerpos son extraordinariamente heterogéneas, como era de esperarse debido a la enorme diversidad de antígenos y a las diferentes actividades biológicas.

Cada inmunoglobulina tiene cuando menos una unidad básica o monomero, que comprende cuatro cadenas polipeptídicas, dos idénticas y se les llama cadenas ligeras (L), las otras dos también iguales llamadas cadenas pesadas (H) (Figura 4).

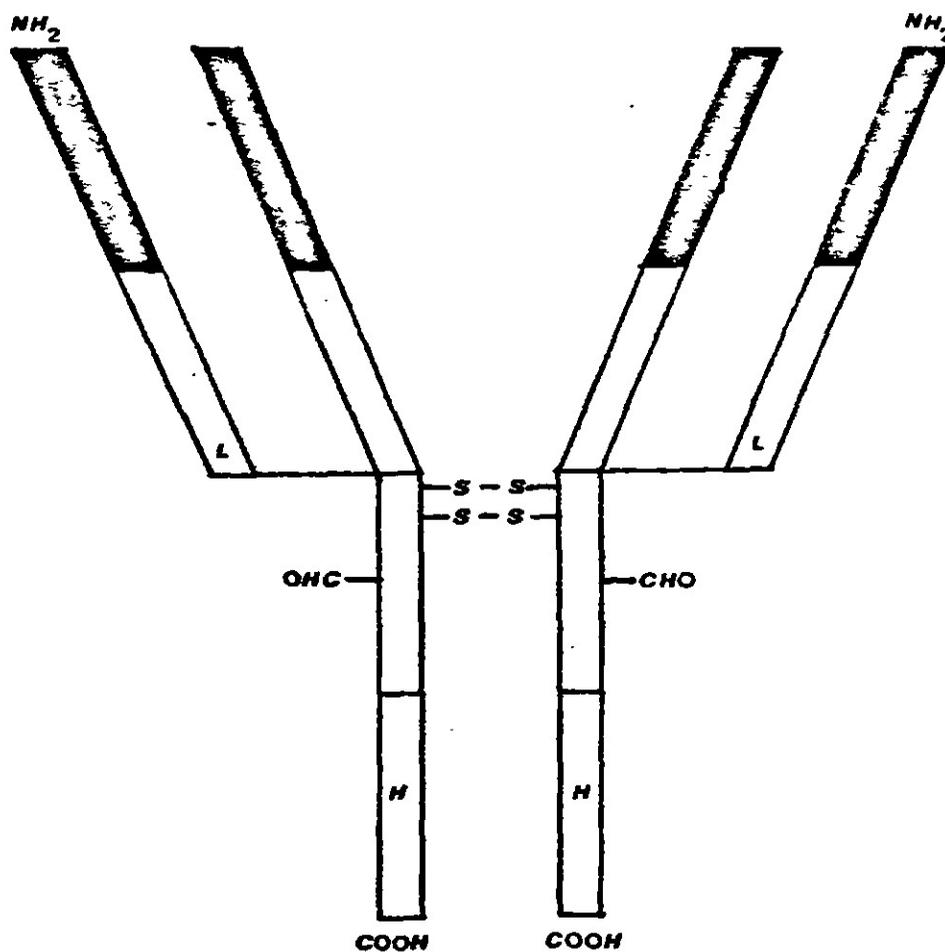


FIGURA 4: REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA UNIDAD MONOMERICA DE UNA INMUNOGLOBULINA, EN LA CUAL SE PRESENTAN LAS CADENAS PESADAS (H) Y LIGERAS (L), ASI COMO LAS REGIONES VARIABLES (ZONA SOMBRADA) Y CONSTANTES DE CADA UNA DE ELLAS.

Una cadena ligera consta de 214 aminoácidos y una cadena pesada - de aproximadamente el doble.

Dentro de las cadenas H y L se tienen regiones variables y constantes. Cada región es un sitio de combinación tridimensional capaz de reconocer a su epitopo complementario. Cada sitio de combinación reconocera uno o varios epitopos dependiendo de cuales aminoácidos se encuentren en la posición variable.

Al fragmentar la molécula de inmunoglobulina con papaína, en presencia de cisteína, se producen tres fragmentos. Los fragmentos I y II son iguales y constan de una cadena ligera L y la parte final amino de la cadena pesada H, estos fragmentos forman la porción -- llamada Fab (fragmento de union con el antígeno).

El fragmento III conocido como factor Fc (fragmento cristalizante) contiene la parte terminal carboxilo en ambas cadenas de tipo pesado H. Este fragmento regula la fijación de la inmunoglobulina a la célula (2,21,22).

Las inmunoglobulinas relajan su actividad biológica a los rasgos estructurales determinados por el Fc y por su capacidad para aglutinar células y fijar el sistema de complemento. También son importantes en su capacidad para adherirse a las membranas corporales, o para fijarse en los sitios apropiados sobre las membranas celulares (Figura 5).

Hay cinco clases de inmunoglobulinas que se designan: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Y son definidas de acuerdo al tipo de cadenas pesadas - que las forman.

Así tenemos que las IgG, las cadenas H que las forman son (γ), en las IgA las cadenas H seran (α), en las IgM sus cadenas H son (μ), en las IgD las cadenas H son (δ) y el las IgE serán (ϵ).

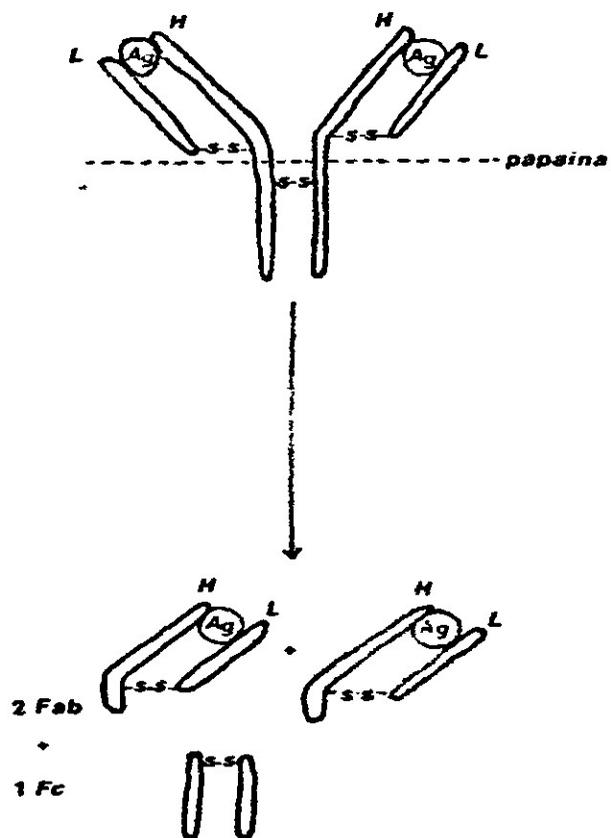


FIGURA 5: DIAGRAMA DE LA ESTRUCTURA DE LA IgG AL SER FRAGMENTADA POR LA ACCION PROTEOLITICA DE LA PAPAINA (6).

En cuanto al tipo de cadenas ligeras L en todos los tipos de inmunoglobulinas, pueden ser: κ o λ : pero siempre en una misma molécula, o son kappa las dos, o son lambda.

EL SISTEMA DE COMPLEMENTO

EL SISTEMA DE COMPLEMENTO

El sistema de complemento o alexina, es un conjunto de proenzimas, - de origen glicoproteico, las que se encuentran en la circulación de los vertebrados en forma inactiva.

Constituyen aproximadamente del 10-15 % de las proteínas séricas. - Este sistema es activado en forma de cascada, es decir una proenzima es transformada a enzima y esta a su vez actúa sobre la siguiente - proenzima transformándola a enzima y así sucesivamente (23).

La activación del complemento se puede llevar a cabo por dos vías: - una vía clásica, que es a través de una reacción antígeno-anticuerpo (mecanismo específico), en donde el anticuerpo es fijador de complemento.

La otra forma de activación se le conoce como vía alterna, o vía de la properdina. La cual es considerada como un mecanismo de resistencia no específico.

En la activación del complemento por vía clásica, hay 11 proteínas - en el sistema de complemento que se designan por la letra C y por los números C1, C2, C3 hasta llegar a C9. El C1 esta compuesto por tres -- subunidades llamadas: C1q, C1r y C1s.

El número asignado a las proteínas del complemento refleja la secuencia en el cual se activa, a excepción de la glicoproteína C4, la cual reacciona después de C1 y antes de C2 (el número se les asignó antes de que la secuencia de la reacción fuera totalmente conocida) quedando así la secuencia de activación como C142356789. El sistema de complemento se puede dividir en tres partes: Unidad de reconocimiento, activación enzimática y unidad de ataque celular. Unidad de reconocimiento, en donde las siguientes inmunoglobulinas son capaces de fijar complemento: IgM, IgG1, IgG2 e IgG3, por la vía clásica. Al combinarse el anticuerpo con su antígeno específico, -- ocurren una serie de cambios en la molécula del anticuerpo, de tal manera que ahora la molécula expone receptores para Fc, por donde se pega C1q (unidad de reconocimiento). C1q y C1r son los responsables de la activación de la primera proenzima C1s.

En la activación enzimática una vez activado C1s, este actúa C4, rompiéndolo en C4a y C4b. El C4a es liberado y no se conoce el papel que desarrolla, en cambio el C4b se pega a la superficie de la célula. El C1s también actúa sobre C2 rompiéndolo en C2a y C2b. El C2b se libera, mientras que el C2a se pega a la fracción C4b, formando un complejo enzimático C4b2a (C3 convertasa). Se sabe que para inactivar virus, basta que se fije C4b (24).

El complejo enzimático C4b2a actúa sobre C3 rompiéndolo en C3a y C3b. El C3a se libera y tiene funciones de anafilatoxina (libera histamina y contrae músculo liso) y de factor quimiotáctico para polimorfonucleares.

El C3b es pegado al complejo C4b2a dando C4b2a3b (C5 convertasa). Al pegarse C3b se presenta un fenómeno que se conoce como adherencia inmune, ya que el C3b tiene receptores en células fagocíticas (polimorfonucleares y macrófagos) y como el C3b se encuentra pegado en la --

superficie de la célula es factible la promoción de la fagocitosis. En la unidad de ataque celular la C5 convertasa actúa sobre C5 originando C5a y C5b. El C5a se libera y tiene función de anafilatoxina y de factor quimiotáctico para polimorfonucleares. El C5b se adhiere al complejo C5 convertasa. Una vez activado el C5 es capaz de activar a C6, C7, C8 y C9 (C6,7,8,9 no se fragmentan).

El complejo C5b67 es un potente factor quimiotáctico. Al fijarse C8 empieza la lisis lentamente de la célula y al fijarse C9 la lisis se acelera.

El complejo C5b67 se puede desprender e irse a depositar en otro sitio de la célula, o bien irse a otra célula (lisis reactiva), y fijar C8 y C9 y producir la lisis de la célula (Figura 6).

La vía alterna o vía de la properdina se considera como un mecanismo de resistencia no específica y se puede activar por: polisacáridos de bacterias Gram positivas, carbohidratos de levaduras, polisacáridos de bacterias Gram negativas.

La activación del complemento por esta vía no empieza por C1 sino por C3, y el complejo enzimático C3bBb equivale a C4b2a (C3 convertasa) (Figura 7).

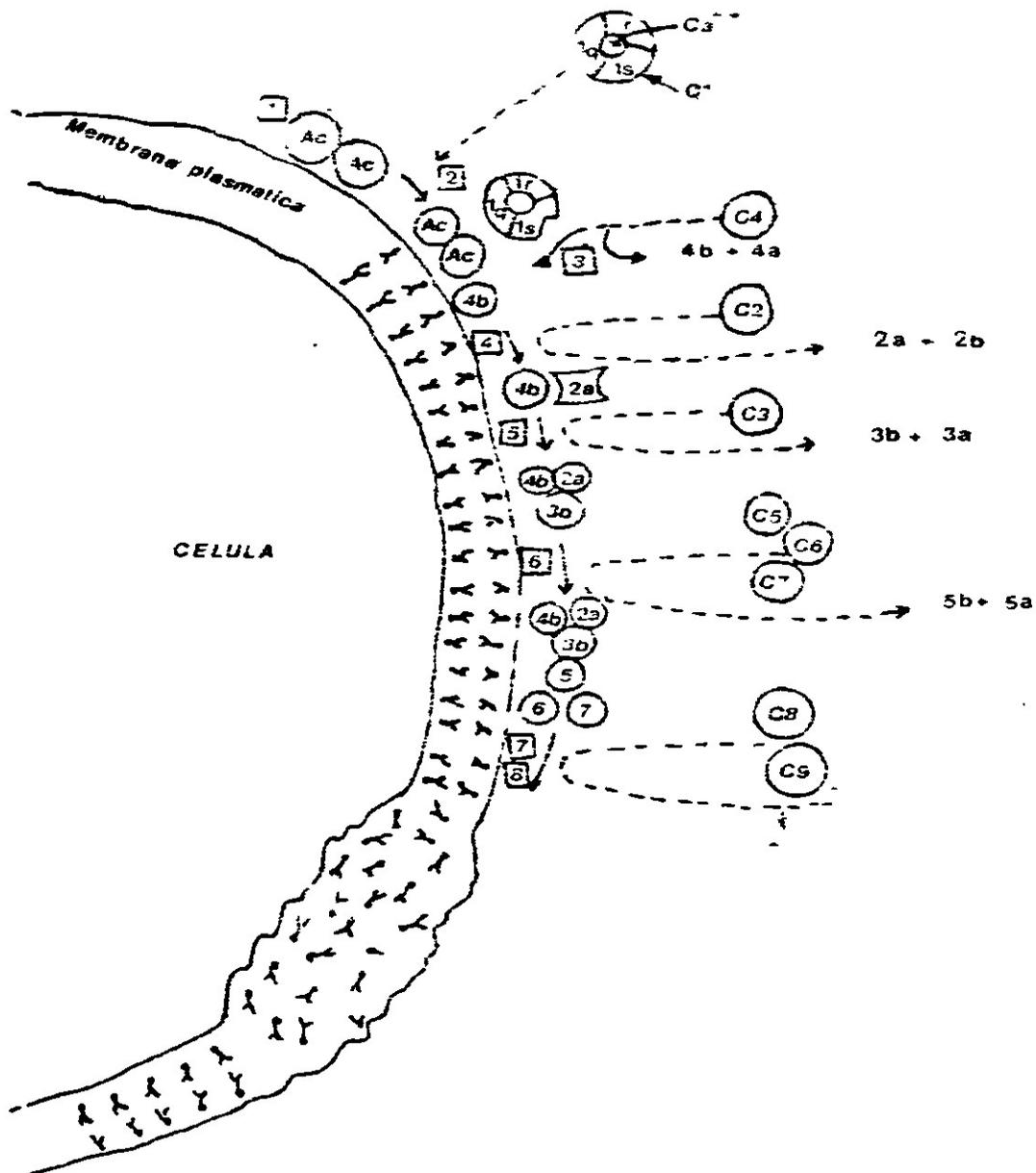


FIGURA 6: SECUENCIA DE REACCIONES EN LA LISIS DE UNA CELULA POR EL COMPLEMENTO ACTIVADO. LOS NUMEROS EN RECUADRO CORRESPONDEN A LA SECUENCIA DE LAS REACCIONES (5).

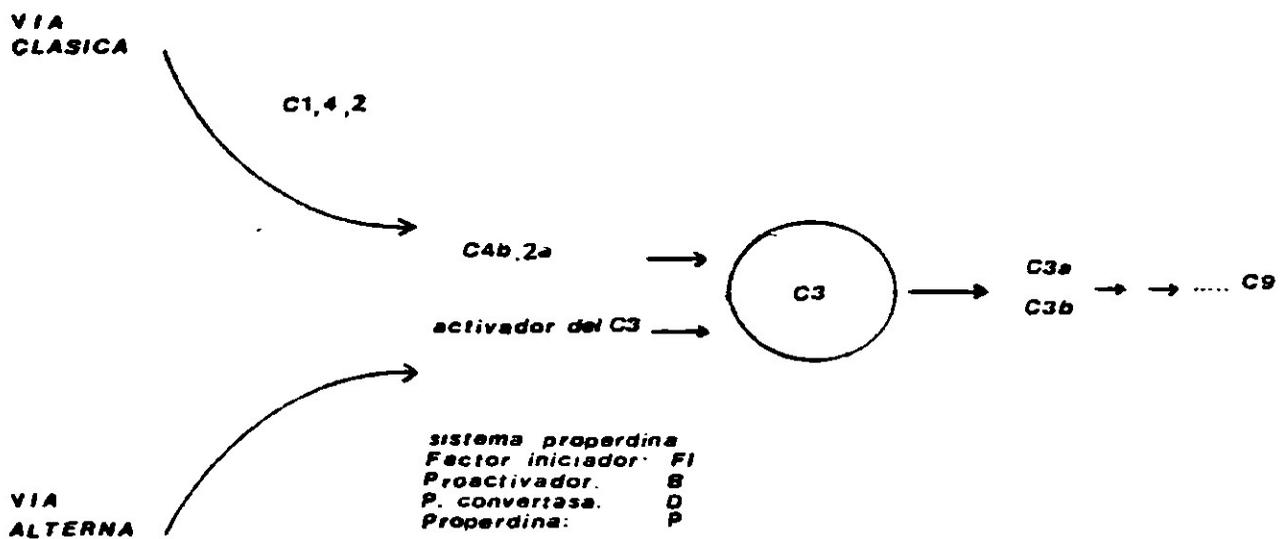


FIGURA 7: SISTEMA PROPERDINA COMO VIA DE ACTIVACION PARA C3 Y DE OTROS COMPONENTES DE ACCION TARDIA. LAS 2 VIAS SON ACTIVADAS POR DISTINTOS TIPOS DE IMMUNOGLOBULINAS (6).

DIFERENCIACION CELULAR

DIFERENCIACION CELULAR

Todas las células sanguíneas se originan de una célula indiferenciada localizada en médula ósea (célula madre), la cual madura hacia diferentes estirpes celulares, en la última etapa de la diferenciación aparecen en la circulación sanguínea como: eritrocitos, plaquetas y leucocitos (Tabla 1).

Las células de la primera etapa de la diferenciación de cada línea celular presentan características morfológicas similares y no pueden distinguirse por simples criterios morfológicos (25).

Estas células primitivas reciben nombres específicos como mieloblastos, linfoblastos y eritroblastos.

El descubrimiento de la sustancia inductora, o estimulante de la diferenciación celular, hoy conocida en la literatura como Colony Stimulating Factor (CSF) (26,27,28), o Colony Stimulating Activity (7,29,9), o Macrophage and Granulocyte Inducer (MGI) (30,10) y que probablemente tiene relación estrecha con el llamado Macrophage Growth Factor (MGF) (31). Esta sustancia que llamaremos MGI es indispensable para la diferenciación in vitro y se cree que juega el papel de regulador fisiológico in vivo, tanto en animales como en el hombre (7).

Se han encontrado diferentes fuentes para la obtención de MGI, (Tabla 2).

Con el objeto de revelar la actividad interna de MGI, se realizaron extracciones de órganos de ratón encontrándose que; pulmon, hígado, bazo, médula ósea y testículos tenían muy poca actividad con efecto diferenciador. (32,33).

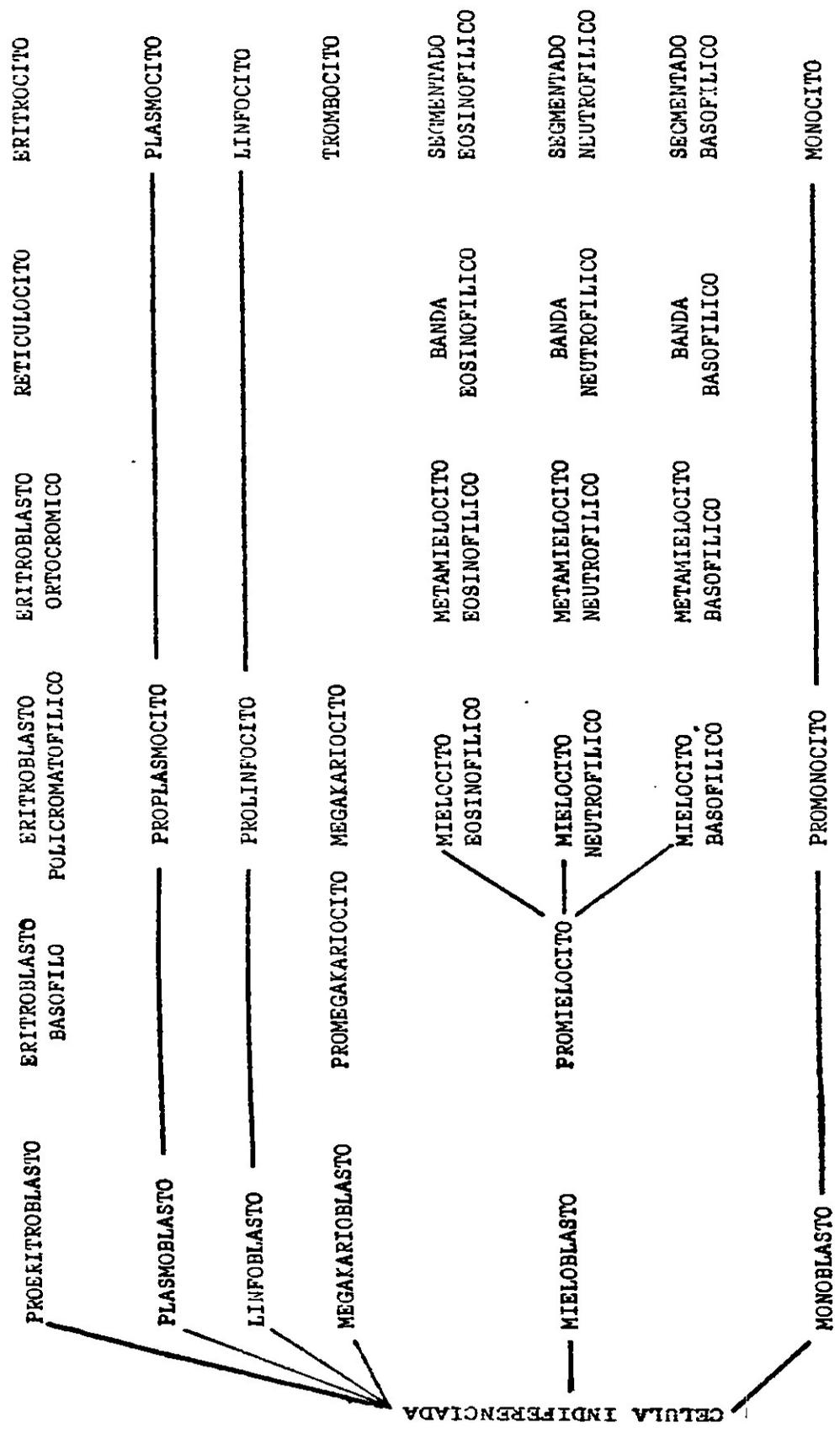


TABLA 1: ORIGEN Y DESARROLLO DE LAS CELULAS SANGUINEAS.

FUENTES DE OBTENCION DE MGI

MEDIO CONDICIONADO	EXTRACTOS TISULARES	OTRAS FUENTES
Fibroblastos embrionarios (31). Fibroblastos transformados por SV40 (31, 9). Células de riñón (112). Pulmón de ratón (112). Linfocito mitogenico estimulado (32). Leucocitos de sangre periférica (112). Macrófagos peritoneales (7). Células 3T3 (112). Células L (112). Placenta humana (112). Células tumorales metastáticas humanas (10, 9).	Glándulas salivales (34). Riñón adulto (32, 41). Bazo (34). Utero gravide (112). Pulmón (34). Placenta (112). Membrana fetal (112). Fluido ascítico (112). Exudado peritoneal (112).	Suero normal (113). Suero con endotoxinas (114). Orina murina (115). Suero leucémico (42). Orina humana (42).

TABLA 2: DIFERENTES FUENTES PARA LA OBTENCION DE MGI A PARTIR DE MEDIO CONDICIONADO, EXTRACTOS TISULARES Y OTRAS FUENTES.

En tanto que otros investigadores como Bradley et al (34) encontraron que: pulmón, útero, placenta, membranas fetales al igual que musculo esquelético presentan altos niveles de MGI, lo contrario sucedía con cerebro, glándulas salivales y riñón.

Como se sabe (35) algunas fuentes presentan altas concentraciones de MGI, sin embargo existe una gran dificultad para purificar este factor, ya que contiene varios contaminantes, entre ellos tenemos a las proteínas del suero.

Para obtener mayores cantidades de MGI se ha recurrido a la activación de células mediante el empleo de endotoxinas entre las que se encuentran los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas (36,37). Los granulocitos, neutrófilos y monocitos estan involucrados en la resistencia contra las infecciones, en consecuencia se han hecho estudios sobre el efecto de las endotoxinas (LPS) en la actividad proliferativa de las poblaciones celulares, observándose que producen una elevación de los niveles de MGI tanto in vivo como in vitro (38,39,40).

Un estudio de las propiedades de este factor muestra que es termolabil, resistente a la acción del éter, a la desoxirribonucleasa y ribonucleasa, está constituido por moléculas no dializables, en la electroforesis migra junto con la fracción de las gamma-globulinas inmediatamente despues de la albumina (41).

Se considera a esta molécula como una proteína o más bien una glucoproteína con actividad específica (30). Otro aspecto de gran importancia consiste en que la masa molecular varía de acuerdo a la fuente de obtención, así podemos encontrar MGI con masa molecular desde 5,000 daltones (42) hasta en el caso extremo con masa molecular de 200,000 daltones (43).

H. Laukel (28) encontró que el MGI de orina humana tiene una masa molecular de 45,000 daltones. E. Richard (44) ha purificado MGI -

proveniente de medio condicionado de células L de r aton obtenier- do una masa molecular de 70,000 daltones. T. Ohno (45) a partir de la línea celular Yosida Sarcoma (YSSF-212T) encontró una masa mo- lecular de 22,000 - 25,000 daltones.

A. Burges (46) empleó medio condicionado de pulmón de r aton para - determinar una masa molecular correspondiente a 23,000 daltones. -

K. Motoyoshi (42) en orina humana obtuvo este factor, mostrando - una masa molecular de 85,000 daltones. Mingu-Chi wu (35) empleando células pancreáticas cancerígenas encontró una masa molecular de - 50,000 daltones.

Burger y Metcalf (43) utilizando medio condicionado de pulmón huma- no, obtuvo dos masas moleculares distintas, una de 45,000 y la otra de 200,000 daltones y finalmente Stanley (47) con células L de r - ton obtuvo dos subunidades de 35,000 daltones cada una.

RECEPTORES DE MEMBRANA

RECEPTORES DE MEMBRANA

Los receptores superficiales son de importancia obvia para la actividad biológica de los leucocitos. Se han identificado receptores para la porción Fc de la IgG, receptores para el complemento y receptores no específicos (48).

La función de los receptores superficiales en los leucocitos consiste aparentemente en incrementar la respuesta inmune celular. Recientes estudios morfológicos de las interacciones macrófago-linfocitos en la respuesta inmune a un antígeno dado, proveen una oportunidad para poder apreciar las correlaciones en la estructura y función para estos factores (48).

Un macrófago activado, se obtiene mediante la inyección de un irritante extraño, generalmente en la cavidad peritoneal del animal (49). El macrófago activado es capaz de incrementar su capacidad microbicida (50), que trae como consecuencia: un incremento en la endocitosis (51,52,53), aumento en la expansión y adherencia (54,55,52,56), disminución de la actividad de la 5' nucleotidasa en la membrana (52,57), aumento de la citotoxicidad (58,59,60), mayor actividad para proliferar in vitro (61,62), incremento en las enzimas lisosomales (63), incremento en la capacidad de ingerir EC (53,52), volumen celular más grande (64,56,65), elevada actividad quimiotáctica (56,66) y un incremento en el metabolismo de la glucosa (67,68).

Sin embargo no todos los agentes utilizados para la activación de los macrófagos producen los efectos arriba mencionados (68,58).

Las IgG e inmunoglobulinas con enlaces para componentes del complemento, están directamente relacionadas con la selectividad a la adherencia del macrófago (69).

Asi mismo las inmunoglobulinas unidas a bacterias, han mostrado - selectividad a la adherencia y fagocitosis elevando la acción bactericida del macrófago (70,71).

El papel de los anticuerpos en la medicion selectiva de la fagocitosis, depende de la unión o de la región del anticuerpo para re- conocer el sitio, o el receptor sobre la membrana del macrófago. Ademas las IgG aparentemente enlaza inmunoespecíficamente a los - microorganismos a través de la porción variable de sus regiones - Fab y la unión a la superficie del macrófago por medio del segmento Fc (72,73).

Los receptores para las IgG son importantes para combatir infecciones parasitarias (74,75).

Ademas de su función en la eliminación de agentes extraños, los receptores de superficie para las inmunoglobulinas (receptores Fc), aparentemente funcionan en la remisión fisiológica de eritrocitos - viejos por medio de los macrófagos (76). Estos eritrocitos son op- sonizados por inmunoglobulinas autólogas in situ, promoviendo consecuentemente la fagocitosis por macrófagos hepáticos y esplénicos - (77,78,79).

Los receptores para Fc son comunmente demostrados por medio de la - técnica de formación de rosetas eritrocitarias. Cuando los eritrocitos son cubiertos con anticuerpos (EA), que se unen a la superficie del leucocito, dan lugar a lo que se ha denominado roseta (80).

La actividad para receptores Fc, se puede considerar que existe cuando tres o mas eritrocitos se adhieren a la membrana del leucocito. Existen otras técnicas menos comunes para la valoración de estos re- ceptores, y pueden ser detectados indirectamente con fluoresceinatos de anticuerpos (81), o por medio de radioisótopos (82,83,84).

La afinidad de los macrófagos por complejos con antígenos formados por la IgG ha sido caracterizada, lo que indica que los enlaces dependen sobre un receptor con un número finito de sitios activos. Los complejos inmunes se combinan más ávidamente, posiblemente por que ofrecen un número adicional de receptores Fc por complejo molecular (85,86,87), o porque ellos inducen cambios conformacionales en los componentes del Fc (88,89).

Un macrófago presenta sobre su superficie de 10^5 a 10^6 receptores Fc. La regeneración o conservación selectiva de estos receptores - después de la unión con complejos inmunes, puede ser un fenómeno - que esté en relación al tamaño, o a la cantidad total del material ingerido (90).

Los factores del complemento tienen una función importante en la - eliminación selectiva de los patógenos invasivos por medio de los macrófagos, de igual forma la adherencia secuencial de los productos del complemento a partir del tercer componente, dan lugar a - una mayor susceptibilidad a la ingestión por estas células (91).

La importancia biológica de este sistema, se evidencia en aquellos pacientes con una deficiencia hereditaria o metabolismo anormal de

C_3 .

Estos pacientes son susceptibles a infecciones bacterianas recurrentes (92,93), que ordinariamente pueden ser controladas por los fagocitos en presencia de suero normal (94). La importancia del complemento o de los receptores para Fc, en el incremento del poder bactericida de los fagocitos polimorfonucleares ha sido demostrada in vitro (95,96).

Es posible que los receptores para el complemento, regulen la inhibición de la migración de los macrófagos por endotoxinas (97). Esta influencia podría ser efectuada por factores que se sabe son generados por el complemento y el sistema de coagulación sanguínea y los

cuales pueden actuar sobre la membrana plasmática para inducir la activación de los macrófagos (53).

La actividad de los receptores para el complemento, ha sido también demostrada por la técnica de rosetas, utilizando para este fin EA más un suero como fuente de complemento (98).

Se sabe que los eritrocitos recubiertos con IgM son incapaces de unirse a los macrófagos, pero cuando estos eritrocitos son incubados en presencia de un componente del complemento o suero fresco, dan lugar a esta unión (99,91).

Los métodos de enlace para el C_3 han sido aplicados en el estudio de neoplasias linfoides (100), que evalúan la especificidad para los receptores del macrófago por el complemento.

Los receptores del complemento, juegan un papel importante en el incremento de la endocitosis mediada por los receptores para Fc (101). Además los polimorfonucleares, monocitos y macrófagos peritoneales inducidos con gel de almidón (102), ingieren EA más eficientemente en presencia de complemento a concentraciones limitadas de anticuerpos. Aparentemente tal incremento es una propiedad que caracteriza generalmente la actividad superficial de los fagocitos. Algunos experimentos sugieren que el complemento se enlaza al segmento Fc de la IgG en los complejos inmunes, haciendo inefectivo este ligando para los receptores Fc de los macrófagos, por lo que esta unión ocurre a través de los receptores para el complemento (103).

La secuencia de maduración de las células hematopoyéticas ha sido caracterizada tradicionalmente por una serie de cambios notorios en la morfología de las células. Sin embargo, muy poco ha sido hecho para definir la diferenciación de los leucocitos sobre la base de la

adquisición de receptores sobre la membrana celular, ya que la célula madre conforme se diferencia, va adquiriendo diferentes marcadores (104).

Los marcadores y receptores de superficie, han probado ser de gran valor a este respecto, pero hasta la fecha hay muy pocos estudios que utilicen la presencia de marcadores particulares de membrana en el proceso de diferenciación celular (105).

Hämmerling et al (106), son los pioneros en este campo y han mostrado que hay un distinto orden de aparición de receptores o marcadores de membrana durante la diferenciación de linfocitos "T" y "B". También estudios hechos sobre cultivo de leucocitos de tipo leucémico y normales de médula ósea, han indicado la aparición de marcadores, o receptores del complemento C_3 y de la porción Fc de la IgG, dichos aspectos pueden estar íntimamente asociados con el proceso de diferenciación celular (107).

Aunque la incompleta expresión de marcadores en cultivo de neutrofilos, aparentemente presenta un bloqueo en la diferenciación de neutrofilos más que de cualquier tipo de proceso de diferenciación, este bloqueo selectivo puede deberse a la insuficiente concentración del factor inductor de la diferenciación : MGI.

Por lo tanto es posible que el MGI esté limitando sus efectos en la primera semana de cultivo, impidiendo la completa expresión de los receptores de membrana.

La aparición de los receptores de membrana esta relacionada con la maduración celular, ya que los sitios marcadores o receptores en la célula presenta un núcleo redondo hasta la aparición de un núcleo muy segmentado.

Así se puede pensar, en una correlación entre la maduración morfológica y la expresión de los marcadores celulares.

Lotem (108) determino que podia esta secuencia ser utilizada para definir los estados de maduración que no siempre son obvios cuando se relacionan los cambios en la apariencia morfológica.

Lotem y Rebelino (109), dividen la relación entre los marcadores o sitios receptores con el proceso de maduración morfológica en seis fases: Fase 1: no hay presencia de receptores (mieloblasto y promielocito), Fase 2: presencia de receptores para Fc (de mielocitos hasta polimorfonucleares), Fase 3: aumento de receptores para Fc y presencia de sitios para el complemento C2, Fase 4: presencia de receptores para Fc y C2, Fase 5: aparición de los primeros marcadores para el complemento C1 (neutrófilos maduros y monocitos), Fase 6: presencia de receptores para Fc y C1 en macrófagos activados.

Se ha demostrado que el MGI parcialmente purificado, induce la formación de células morfológicamente maduras, pero sin receptores para Fc y C₃ (99), demostrando de esta forma que existe una molécula diferente al MGI que es la inductora a la formación de receptores para Fc y C₃ en células de médula ósea.

Capítulo II

FUNDAMENTACION DEL TEMA

FUNDAMENTACION DEL TEMA

Los receptores superficiales para la porción Fc de la molécula de la IgG han sido demostrados sobre monocitos y granulocitos de origen humano y también en linfocitos de ratón.

Los receptores de macrófagos para Fc pueden ser indispensables para la fagocitosis no dependiente del complemento, los anticuerpos dependientes de la citotoxicidad mediada por células, macrófagos armados y antígenos procesados para su presentación.

Los receptores para Fc de la molécula de IgG, están presentes en toda fagocitosis "profesional" y es indispensable para la fagocitosis inmune.

Los receptores para C_3 también se presentan en distintas variedades celulares y recientemente se han esclarecido los factores que regulan la fagocitosis. En la ausencia de IgG, C_3 es insuficiente para promover la ingestión de partículas por cualquier célula, exceptuando a los macrófagos activados. Sin embargo C_3 puede actuar sinérgicamente con pequeñas cantidades de IgG, pero estas por si solas son insuficientes para promover la fagocitosis.

Dado que existen factores responsables de inducción de receptores para Fc y C_3 (FcRI y C_3 RI) en el ratón, y teniendo en cuenta que estas moléculas pueden tener una aplicación en el ser humano, en padecimientos donde exista una disminución de estos factores (pacientes con tratamiento inmunosupresor, sarcomas, linfomas, leucemias, lupus eritematoso etc), se pretende identificar la existencia y las propiedades moleculares de estos factores en el ser humano, así como la identificación de la fuente productora para diseñar una posible purificación bioquímica.

Capítulo III

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que las moléculas inductoras provenientes de ratón tienen una masa molecular aproximada de 12,000 daltones, supusimos que la mejor fuente para hacer el estudio de estas moléculas en el ser humano sería la orina, ya que es conocido que el corte renal es mayor de esta cifra.

Además, como se detectaron estos factores originalmente en suero - de animales se supuso que probablemente sería una célula sanguínea la productora de estos factores, en consecuencia se plantea la separación e incubación de los diferentes elementos celulares sanguíneos para determinar si alguna de ellas es la productora.

Capítulo IV

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- * Obtencion de medios condicionados provenientes de diferentes - fuentes para la identificación de los factores inductores.
- * Determinación de las masas moleculares del FcRI y C₃RI.
- * Identificación de que el ratón y el hombre presentan las mismas moléculas inductoras.
- * Identificación de la célula productora del FcRI y C₃RI.
- * Realización del enfoque isoelectrico de algun medio evaluado - como método de purificación bioquímica.

Capítulo V

HIPOTESIS

HIPOTESIS

Siendo que en el ratón existen moléculas inductoras para la formación de receptores para Fc y C₃ y teniendo en cuenta que el sistema inmune del ratón y el hombre son muy semejantes, suponemos que estas moléculas también deben de existir en el ser humano.

El primer medio condicionado en donde se encontró la molécula de FcRI, fué el medio condicionado por una línea leucémica inmadura mantenida en cultivo in vitro.

En consecuencia es de esperar que sea alguna célula del sistema sanguíneo, la secretora de este factor. Por lo tanto sería conveniente aislar los diferentes tipos para identificar la célula responsable.

Capítulo VI

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO: El trabajo experimental se realizó con células de bazo, timo, ganglios axiales, granulocitos de cavidad peritoneal, macrófagos de cavidad peritoneal, médula ósea, pulmones y suero de ratones de la cepa CD-1 de ambos sexos de 6 a 8 semanas de edad. Además se usó suero y orina de origen humano.

CULTIVO CELULAR: Como fuente de nutrición se usó el medio de Eagle (Gibco Labs USA. Apendice) al que se le adicionaron antibióticos - (penicilina 100 UI/ml y estreptomycin 100 mcg/ml) para evitar una posible contaminación y 3.7 gramos de bicarbonato de sodio para obtener un pH de 7.2 en nuestras condiciones de cultivo.

Posteriormente se filtró en membrana Millipore (Millipore USA) con poro de 22 micras de diámetro.

Para verificar su esterilidad se tomó como muestra 5 gotas de este medio y se colocaron en tubos de ensaye que contenían 2 mililitros de caldo de soya al 0.3 % (Bioxon Mex) previamente esterilizado en autoclave, incubándolos durante 48 horas a 37°C. El medio de cultivo fue suplementado con suero fetal bovino o de caballo al 10 % - (Gibco Labs USA) los cuales fueron previamente desactivados a 56°C durante 30 minutos.

Las células fueron sembradas a las concentraciones requeridas para cada experimento en cajas de Petri desechables (Vela-Plastic Mex) de 60 x 15 mm a las cuales se le adicionaron 5 mililitros de medio de cultivo. Los cultivos se mantuvieron in vitro en una incubadora a 37°C con una atmósfera parcial de CO₂ al 10 % y una humedad relativa del 95 %.

Estos se realizaron en una campana de cultivo previamente esterilizada con luz ultravioleta durante 15 minutos. Para verificar las condiciones generales de los cultivos se utilizó el microscopio de tipo invertido.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (SAF): Esta solución se utilizó para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables, dicha solución tiene en sus componentes sales de fosfatos (Apendice). La solución una vez preparada se ajustó a un pH de 7.2 y se filtró a través de una membrana con poro de 22 micras de diametro. La solución estéril se guardó a 4°C hasta el momento de su uso, efectuando previamente la prueba de esterilidad anteriormente descrita.

TECNICA PARA OBTENER CELULAS DE MEDULA OSEA: Con el fin de obtener células viables para cuantificar la actividad del factor inductor para receptores de Fc y C₃ (FcRI y C₃RI). Se sacrificaron los ratones mediante la dislocación cefalo-medular. Para proceder a retirar los fémures colocándolos inmediatamente en cajas de petri que contenian medio de Eagle o SAF. Posteriormente se eliminó la mayor cantidad de tejido muscular circundante del fémur.

Se perforaron ambas epífisis con una jeringa de 1 mililitro haciendo fluir medio de Eagle de un extremo a otro del hueso para de esta forma colectar las células en un tubo de ensaye. Las células así obtenidas se lavaron mediante centrifugación a 500 g durante 3 minutos, se decanto el sobrenadante y se adicionaron 3 mililitros de medio de Eagle resuspendiendo a continuación. La cantidad de células obtenidas se determinó por conteo en un hemocitometro (American Optical USA) sembrandose 8×10^6 células en el medio de cultivo.

PREPARACION DE INMUNOGLOBULINA G (IgG): Se diluyeron 10 microli-
tros de una dilucion 1:100 de inmunoglobulina G (Cordis Labs USA)
en 16 mililitros de SAF.

Se agregaron 3 mililitros de esta dilución en tubos de ensaye -
estériles y se conservaron en congelación a -20°C hasta su uso.

PREPARACIÓN DE ERITROCITOS CUBIERTOS CON ANTICUERPO (EA): Se em-
plearon eritrocitos de carnero, que fueron extraídos de la yugu-
lar utilizando una jeringa hipodérmica. Los eritrocitos así ex-
traídos se diluyeron al 10 % en Alsevers (Apéndice) estéril y se
almacenaron durante una semana a 4°C hasta el momento de su uso.
La sangre se colocó en un tubo de ensaye estéril y se adiciona-
ron 3 mililitros de SAF para someterla a un proceso de lavado --
por centrifugación a 500 g durante 3 minutos con el objeto de re-
tirar el exeso de solución de Alsever, la cual se desecho. A con-
tinuación se volvió a agregar el mismo volumen de SAF repitiendo
el proceso hasta que el sobrenadante fue completamente incoloro
(libre de hemoglobina).

Despues del ultimo lavado las células se resuspenden en 4 milili-
tros de SAF agregándoles un volumen igual de IgG. Esta mezcla se
resuspendio lentamente y se incubo en baño maria a 37°C durante
30 minutos, obteniéndose eritrocitos cubiertos con anticuerpo -
(EA). El EA es nuevamente lavado por centrifugación a 500 g por
3 minutos con SAF con el objeto de quitar el exceso de IgG no ab-
sorbida por los eritrocitos.

Los lavados se repitieron cuantas veces fue necesario hasta que el
sobrenadante fue incoloro. Finalmente se resuspenden en 8 milili-
tros de SAF y se almacenan a 4°C hasta el momento de su uso.

OBTENCION DE SUERO FRESCO DE RATON: En esta técnica se usó suero fresco para obtener la fuente de complemento C_3 que interviene en la respuesta inmune.

Para su obtención la sangre se extrae de ratones por medio de la punción del plexo de la cavidad ocular (110) utilizando un capilar que esta unido a un tubo de ensaye estéril. La sangre se deja reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se retrae el coágulo de las paredes del tubo y se coloca a 4°C durante 45 minutos. Finalmente se centrifuga a 1000 g durante 30 minutos para separar el suero y proceder a diluirlo 1:10 con SAF. Debido a la labilidad del complemento en el suero, este se obtuvo de suero fresco y se utilizo de inmediato.

PREPARACION DE ERITROCITOS CUBIERTOS CON ANTICUERPO Y COMPLEMENTO (EAC): Se tomaron 10 mililitros de EA agregándoles 10 mililitros de suero fresco de ratón diluido 1:10 en SAF, esta mezcla se resuspende lentamente y se incuba en baño maría a 37°C durante 30 minutos, obteniéndose eritrocitos cubiertos con anticuerpo y complemento (EAC).

El EAC es nuevamente lavado por centrifugación a 500 g por 3 minutos con 3 mililitros de SAF, con el objeto de quitar el exceso de complemento no absorbido en los eritrocitos.

Los lavados se repitieron cuantas veces fue necesario hasta que el sobrenadante fue incoloro. Por ultimo se resuspenden en 10 mililitros de SAF conservándose a 4°C hasta su uso. El EAC es guardado hasta por dos dias (2,108,111).

PREPARACION DE LIPOPOLISACARIDOS (LPS): Se prepararon soluciones de lipopolisacáridos de Salmonella typhi (Difco Labs USA) mediante dilución en SAF, a partir de una concentración inicial de 1 mg/ml.

PREPARACION DE MEDIO CONDICIONADO DE PULMON ENDOTOXICO (MCPE): Se inyectó a ratones por vía intravenosa un volumen de 0.2 mililitros de una solución que contenía 5 microgramos de LPS. Se dejó actuar el antígeno por un período de 3 horas después de las cuales se sacrificaron los ratones por dislocación cefalo-medular para extirparles los pulmones. Se utilizaron tubos cónicos con 5 mililitros de medio de Eagle para incubar los pulmones durante 48 horas a 37°C. Concluido el período de incubación se retiraron los pulmones de los tubos y el líquido sobrenadante se centrifugó a 500 g durante 3 minutos y posteriormente el sobrenadante fue colocado en tubos de ensaye estériles. Una vez asegurada la esterilidad se almacenó el volumen total a -20°C hasta su uso.

PREPARACION DE SUERO ENDOTOXICO (SE): Al igual que para la obtención de MCPE a los ratones retados con LPS, se obtuvo la sangre de la cavidad torácica colocándola posteriormente en tubos de ensaye estériles y una vez tapados se dejaron reposar durante 15 minutos. Se retrae el coágulo de las paredes del tubo y se centrifugó a 1000 g durante 30 minutos para separar el suero.

El suero así obtenido se coloca en un tubo estéril y se almacena a -20°C hasta su uso realizando siempre la prueba de esterilidad.

PREPARACION DE SOLUCION DE CASEINATO DE SODIO: Se hizo una solución de caseinato de sodio (Difco Labs USA) en SAF, se esterilizó en autoclave y se deja enfriar para después ser almacenado a temperatura ambiente hasta su uso.

PREPARACION DE MEDIO CONDICIONADO DE MACROFAGOS PERITONEALES (MCMP):

Se inocularon ratones por vía peritoneal con 3 mililitros de solución de caseinato de sodio, se dejó actuar este antígeno por un periodo de 96 horas después de las cuales se sacrificaron los ratones por dislocación cefalo-medular para proceder a extraer los macrófagos por medio de una jeringa hipodérmica, que contenía 10 mililitros de SAF estéril, la que se inyectó en la cavidad peritoneal, dando un ligero movimiento al animal con el fin de recuperar la mayor cantidad de macrófagos.

Se coloca el SAF en un tubo de plástico cónico estéril, junto con los 10 mililitros de SAF provenientes de otras dos extracciones de la cavidad peritoneal con porciones de 5 mililitros cada una. Se lavan las células mediante centrifugación a 600 g durante 5 minutos desechando el sobrenadante y resuspendiendo en medio de Eagle para determinar mediante un hemocitómetro la cantidad de macrófagos obtenidos. Se sembraron 15×10^6 de células por caja de petri incubándolas por 2 horas a 37°C con el fin de que las células fagocíticas se adhieran al fondo de la caja de cultivo, después de este tiempo las células no adheridas son retiradas y nuevo medio de cultivo es agregado junto con 0.3 mililitros de solución de LPS correspondiente a 7.5 microgramos de LPS, otras cajas de petri son sembradas con la misma cantidad de células y sometidas al mismo proceso descrito anteriormente con la variante de que no se agregó solución de LPS.

Los cultivos así preparados son incubados por 96 horas más. Posteriormente el medio condicionado se retiró de las cajas y se colocó en tubos de ensayo para ser lavados a 500 g por 3 minutos, se decantó el sobrenadante en un matraz estéril de 50 mililitros y se almacenó a -20°C hasta su utilización. Como siempre se realizó la prueba de esterilidad.

PREPARACION DE MEDIO CONDICIONADO DE CELULAS DE BAZO, TIMO Y GANGLIOS LINFATICOS: Se sacrificaron ratones mediante dislocación cefalo-medular para extirparles el bazo y colocarlo rápidamente en cajas de petri con medio de Eagle. Posteriormente el bazo es maceado sobre un tamíz celular de acero inoxidable (Bellco USA) agregando gota a gota medio de Eagle hasta que se colecta un volumen aproximado de 5 mililitros. Las células así obtenidas son centrifugadas a 500 g durante 3 minutos decantando el sobrenadante y resuspendiendo el paquete celular en medio de Eagle fresco. La cantidad de células obtenidas se determinan por conteo en un hemocitómetro sembrando posteriormente 15×10^6 de células por caja agregando -- 0.3 mililitros de LPS conteniendo 7.5 microgramos de LPS y 5 mililitros de medio de cultivo.

Finalmente se incuban las células a las mismas condiciones que para la obtención de MCGP.

Se procedio de igual forma para las células provenientes de timo y ganglios linfáticos.

CROMATOGRAFIA EN GEL ACA-54: Para la determinación de la masa molecular de los factores inductores para Fc y C₃ (FcRI y C₃RI) se empacó una columna K 9/11 (Pharmacia Fine Chemical. Suecia) con Ul--trogel ACA-54 para cromatografía de masas moleculares entre 5,000 y 70,000 daltones.

La calibración se obtuvo con proteínas de masa molecular conocida -- (Hemoglobina, Anhidrasa Carbonica, Inhibidor de tripsina, Mioglobina) y azul dextrano como indicador del volumen de exclusión.

Se tomo una muestra de 2 mililitros de SE y se cromatografió con -- Tris-HCl 75 milimolar a un pH de 7.7 a un flujo de 4 cm/hora.

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA CON SEPHADEX G-100/40: El gel utilizado en esta técnica tenía un rango de separación cromatográfica entre 4,000 y 90,000 daltones.

El gel se hizo hinchar en el amortiguador Tris-HCl 75 milimolar a un pH de 7.7 durante 3 horas a una temperatura de 92°C, posteriormente se procedio a empacar una columna K 9/11 (Pharmacia Fine Chemical. Suecia). Eluyendo la columna con solución amortiguadora a una velocidad de 4 cm/hora por medio de una bomba peristáltica.

Esta columna se calibro con proteínas de masa molecular conocida - Albumina, Hemoglobina, Ovoalbumina, Anhidrasa Carbonica y Citocromo C). Se aplicaron 10 miligramos de Albumina, 10 miligramos de Hemoglobina, 15 miligramos de Ovoalbumina, 12 miligramos de Anhidrasa Carbonica y 10 miligramos de Citocromo C que fueron diluidos en 2 mililitros de amortiguador y azul dextrano como indicador del volumen de exclusión. Una vez calibrada la columna se procedio a cromatografiar 2 mililitros de SE y MCMP recolectando 85 fracciones de 2.5 mililitros en tubos de ensaye los cuales fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

ELECTROENFOQUE PREPARATIVO CON ULTRADDEX: Técnica utilizada para determinar exclusivamente el pH isoeléctrico de la molécula de FcRI en MCPE mediante el siguiente procedimiento: 20 mililitros de MCPE fueron desalinizados por medio de una columna K 26/100 (Pharmacia Fine Chemical. Suecia) empacada con Sephadex G-25. Este medio ya desalinizado se mezcló con 6 gramos de Ultradex (Pharmacia Fine Chemical. Suecia) 100 mililitros de agua destilada y 5 mililitros de anfollinas (Pharmacia Fine Chemical. Suecia) dentro del rango de pH que va de 3 a 9.

Se añaden 2 mililitros de la fracción con mayor actividad inductora para FcRI obtenida del cromatografiado en Sephadex G-100/40. La mezcla se desgasificó por medio de vacío y se extiende sobre una placa de vidrio procurando que la distribución del gel sea lo más homogéneo posible.

En los extremos de la placa se Ultrodex se corta un zurco de 1 centímetro y se colocan las tiras de papel absorbente especiales para electroenfoque, estas fueron previamente humedecidas, con una solución 0.1 M de ácido sulfúrico (que se coloca en la parte del ánodo +) y las otras con solución 1 M de etilendiamina y se coloca en la parte del cátodo -.

La placa se coloca sobre el plato de enfriamiento del MULTIPHOR — (LKB Products. Suecia) limpiándola anteriormente con tritón al 1 % para obtener una buena superficie de contacto. Se tapa el MULTIPHOR procurando que los electrodos entren en contacto con las tiras de los extremos de la placa.

Se aplicaron 30 watts durante 6 horas y al término de este tiempo y con la finalidad de visualizar las zonas con proteína dentro del gel, se usó la técnica de impresión en papel filtro. Se cortó un papel filtro Whatman (Whatman Limited. England) del tamaño de la cámara del gel colocándolo cuidadosamente en su superficie para que de esta forma pequeñas cantidades de proteína puedan ser absorbidas se retira el papel filtro y se deja secar, para después teñirse con azul de Comassie R 250. Finalmente el papel filtro es lavado con una mezcla de metanol-agua-ácido acético en una proporción de 50:50:10.

El gel fue cortado en 30 secciones y se procedió a leer el pH de cada fracción. Las proteínas contenidas en cada fracción fueron eluidas en pequeñas columnas agregando 2 mililitros de SAF. Las fracciones así recolectadas se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

DETERMINACION DE LOS RECEPTORES DE MEMBRANA POR FORMACION DE ROSETAS CON EA Y EAC: Antes de incubar las células de médula ósea de ratón, se les agregó medio condicionado para inducir la formación de sitios receptores para Fc y C₃.

Después de la incubación se colocan las células en tubos de centrifuga con el objeto de lavarse (tres veces) con SAF, centrifugándolas a 800 g durante 3 minutos. Se resuspenden en un mililitro de SAF agregándoles 0.20 mililitros de EA o de EAC, se incuban por 30 minutos a 37°C sin resuspender las células, de tal manera que quedan 50 células EA o EAC por una célula de médula ósea.

Posteriormente se dispersan suavemente las células, contandose el porcentaje de células que han formado un conglomerado con el EA o con el EAC (llamado roseta) utilizando para este conteo un hemocitómetro (American Optical USA).

Como criterio para considerar un conglomerado de células como roseta, se estableció que se requiere un mínimo de 8 eritrocitos EA o EAC a una célula de médula ósea.

CONFIAELIDAD DE RESULTADOS: Todos los experimentos realizados en este trabajo, fueron repetidos un mínimo de 2 veces y siempre por duplicado.

Capítulo VII

RESULTADOS

RESULTADOS

Para determinar el grado de actividad biológica del FcRI y de C₃RI en los diferentes medios condicionados se utilizaron 3, 6, 12, 25, 50 y 100 microlitros de cada uno de ellos.

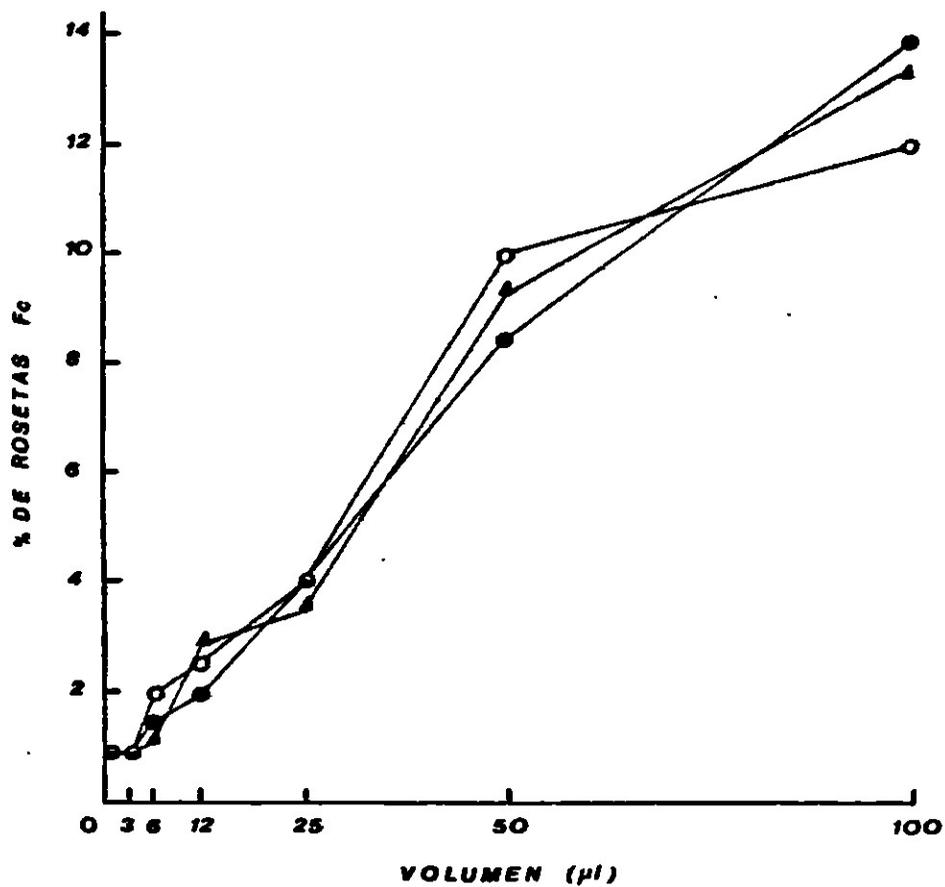
La actividad biológica de los factores FcRI y C₃RI, fué determinada mediante la inducción a la formación de rosetas en precursores mieloides provenientes de médula ósea.

DETERMINACION DE LAS CURVAS DOSIS-RESPUESTA DE LOS DIFERENTES MEDIOS CONDICIONADOS CON ACTIVIDAD FcRI Y C3RI.

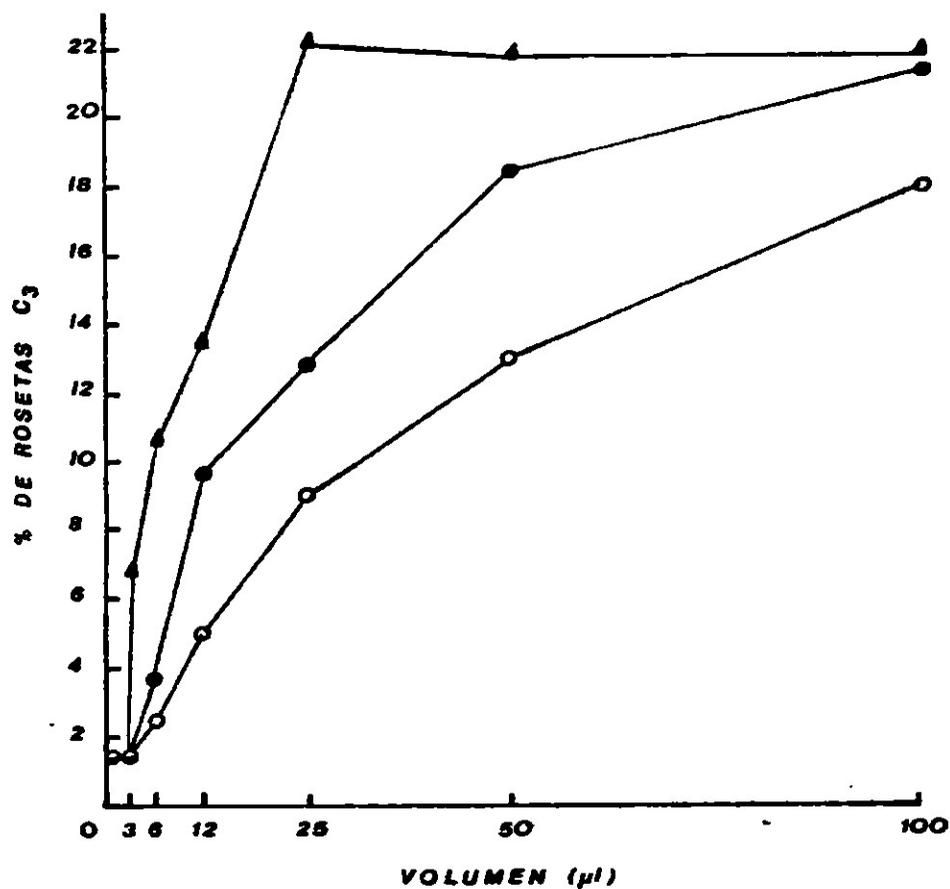
Tanto como para SE, MCMP y MCPE la inducción a la formación de receptores para Fc, ocurrió al utilizar 6 microlitros del medio condicionado respectivo (Grafica 1), siendo el MCPE el que presento la mayor actividad.

La respuesta a la inducción en células de médula ósea por los diferentes medios condicionados, fue lineal hasta los 100 microlitros, excepto en SE en donde hubo un aumento de solo 2 % de rosetas al pasar de 50 a 100 microlitros de medio condicionado.

Con respecto a la inducción de los diferentes medios condicionados a la formación de receptores para C3 (Grafica 2), se observó que la actividad inductora se inició a partir de 3 microlitros para el MCMP y SE con el 1 % de rosetas, mientras que para el MCPE (a la misma dilución) presento un incremento del 6.5 % para posteriormente ser saturante en 25 microlitros con un 22 % de formación rosetaria, comenzando a disminuir para mantenerse constante con un 21.5 % de rosetas en los 100 microlitros y que para este mismo volumen el MCMP y SE, no alcanzaron aún los niveles de saturación.



GRAFICA 1; CURVA DOSIS-RESPUESTA DE LA INDUCCION DE RECEPTORES F_c EN CELULAS DE MEDULA OSEA POR LOS DIFERENTES MEDIOS CONDICIONADOS: SUEPO ENDOTOXICO (O), MACROFAGOS PERITONEALES (●), Y PULMON ENDOTOXICO (Δ).



GRAFICA 2. CURVA DOSIS-RESPUESTA DE LA INDUCCION DE RECEPTORES C_3 EN CELULAS DE MEDULA OSEA POR LOS DIFERENTES MEDIOS CONDICIONADOS: SUERO ENDOTOXICO (O), MACROFAGOS PERITONEALES (●), Y PULMON ENDOTOXICO (Δ).

DETERMINACION DE LAS MASAS MOLECULARES DE LOS FACTORES FcRI Y C3RI MEDIANTE CROMATOGRAFIA EN ULTROGEL ACA-54 Y SEPHADEX G-100/40.

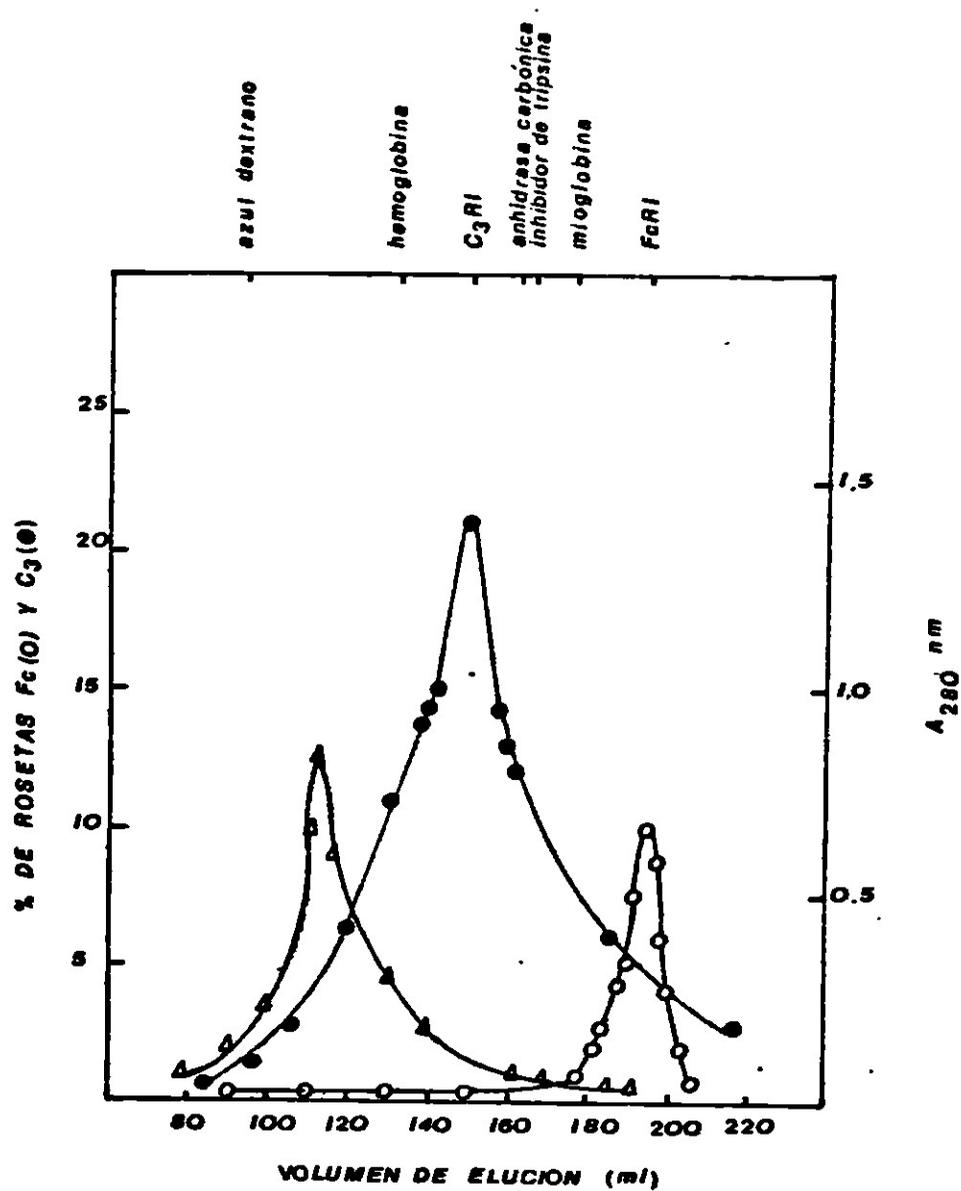
Con el objeto de determinar las masas moleculares de los factores responsables de la inducción de sitios receptores para Fc y C₃ se procedió a cromatografiar 2 mililitros de los diferentes medios con dicionados.

El perfil de absorción a 280 nm de las fracciones recolectadas del MCPE cromatografiado en Ultrogel ACA-54, presentó un solo pico correspondiente al volumen de elución de 112.5 mililitros (Grafica 3). Así mismo se utilizaron 100 microlitros de cada una de las fracciones para determinar los picos con mayor actividad biológica, tanto para Fc como C₃ (Grafica 3), observando que para el primero se encuentra en el volumen de elución correspondiente a 195.0 mililitros con un 10 % de rosetas mientras que el volumen de mayor actividad biológica a C₃ se encontró en 150.0 mililitros con el 21.2 % de for mación rosetaria.

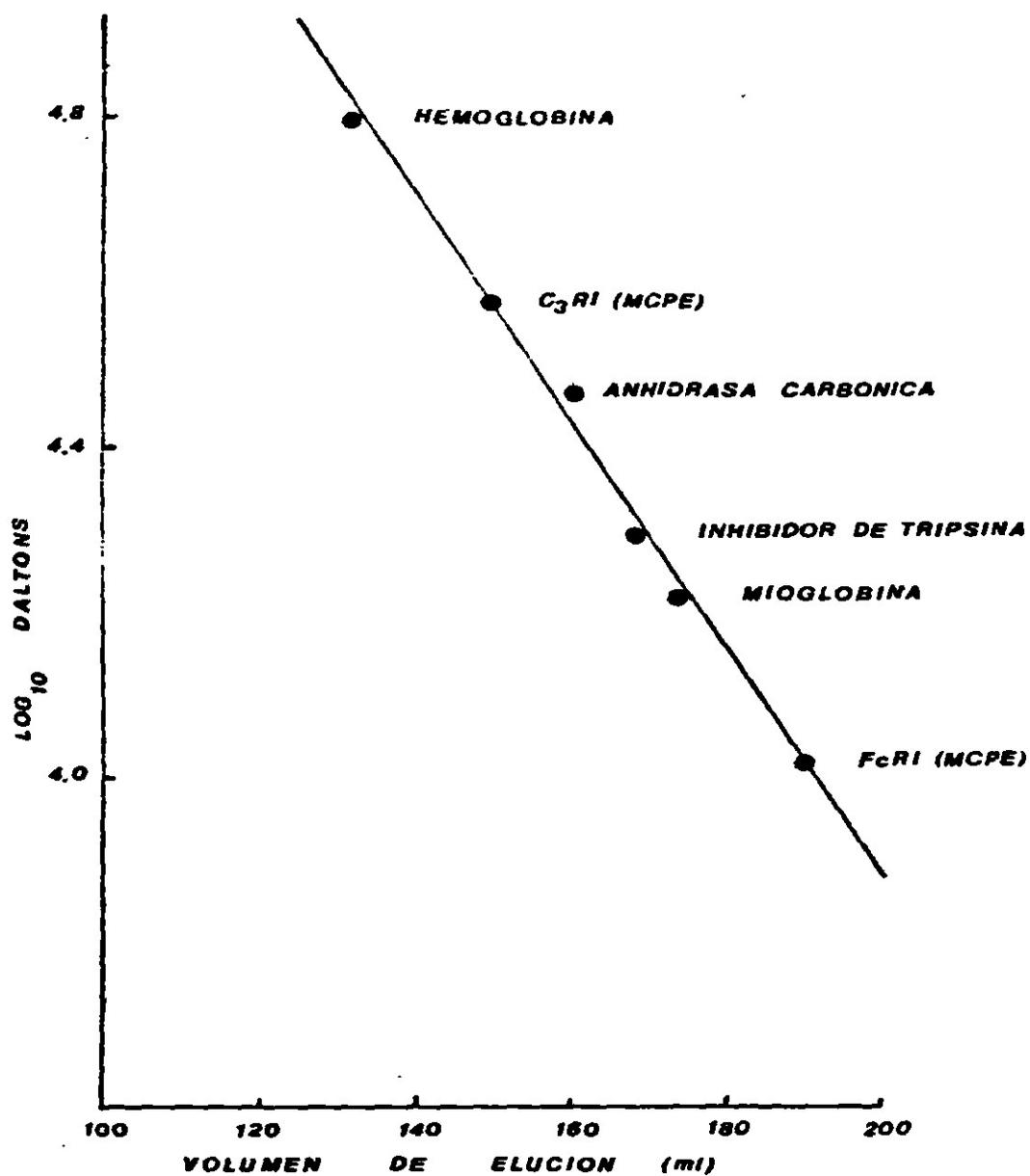
Mediante la extrapolación; en la columna correspondiente al ACA-54 previamente calibrada, se determinaron las masas moleculares del FcRI y C₃RI, encontrando una masa de 10,500 daltones y 35,000 daltones respectivamente (Grafica 4).

Los medios de SE y MCMP fueron cromatografiados a través de una columna de Sephadex G-100/40. El perfil proteico a 280 nm de las fracciones recolectadas del SE cromatografiado, mostró cuatro picos en los volúmenes de elución de 82.5 mililitros, 105.0 mililitros, 117.5 mililitros y 127.5 mililitros.

Subsecuentemente para realizar las determinaciones de las actividades biológicas del Fc y C₃, se utilizaron 100 microlitros de cada una de las fracciones cromatografiadas, encontrando la mayor actividad del Fc en el volumen de elución de 177.5 mililitros con el —



GRAFICA 3. PORCENTAJE DE ROSETAS Fc (○), C₃ (●) Y ABSORCION A 280 nm(▲) DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA CROMATOGRAFIA EN ULTRAGEL ACA-54 DEL MCPE ACTIVADO CON LPS.



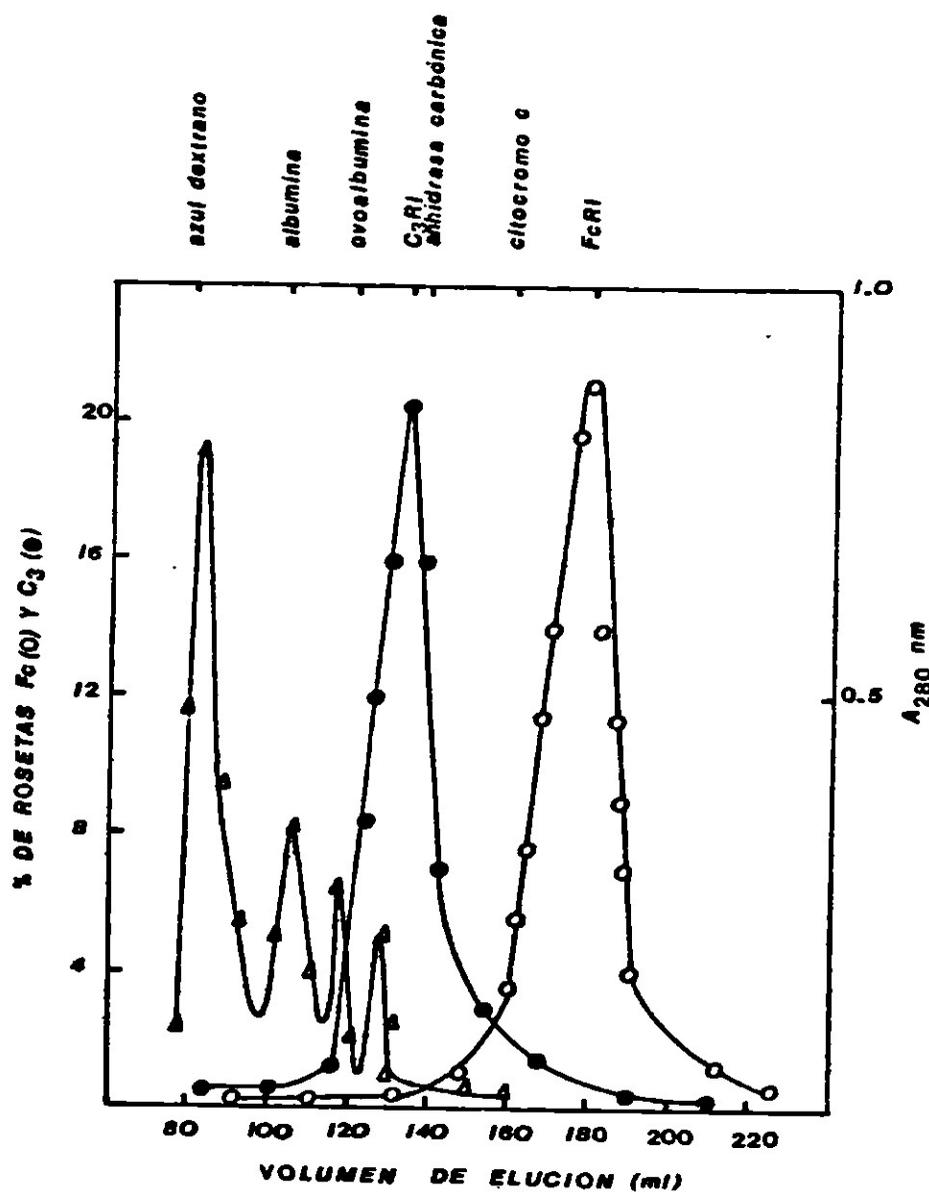
GRAFICA 4. CALIBRACION DE LA COLUMNA DE ULTROGEL ACA-54 CON PROTEINAS DE MASAS MOLECULARES CONOCIDAS.

21.2 % de rosetas, mientras que para el C_3 el volumen encontrado - fue de 135.0 mililitros y un 20.5 % de rosetas (Grafica 5).

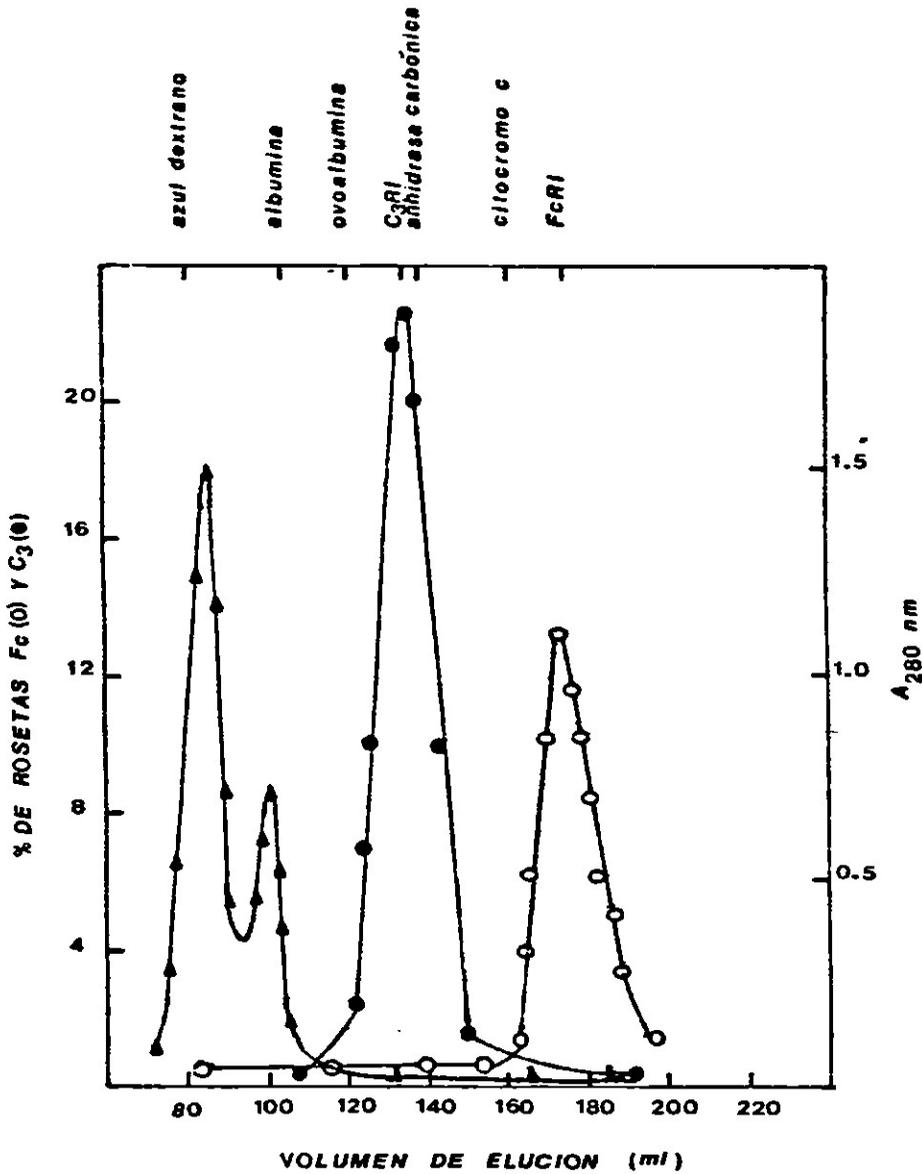
De la misma forma para MCMP, la absorción a 280 nm de las fracciones recolectadas (Grafica 6), mostraron dos picos pertenecientes a los volúmenes de elución de 85.0 mililitros y 100.0 mililitros.

La mayor actividad biológica para el Fc se mostró en el volumen de 172.5 mililitros y 13 % de formación rosetaria, en tanto que para C_3 se localizó en los 132.5 mililitros con el 23.0 % de rosetas. - La determinación de las masas moleculares se realizaron mediante - extrapolación en la columna donde los medios fueron cromatografiados, la cual fué previamente calibrada (Grafica 7), encontrando -- 10,500 daltones para el FcRI y 34,000 daltones para el C_3 RI correspondiente al SE.

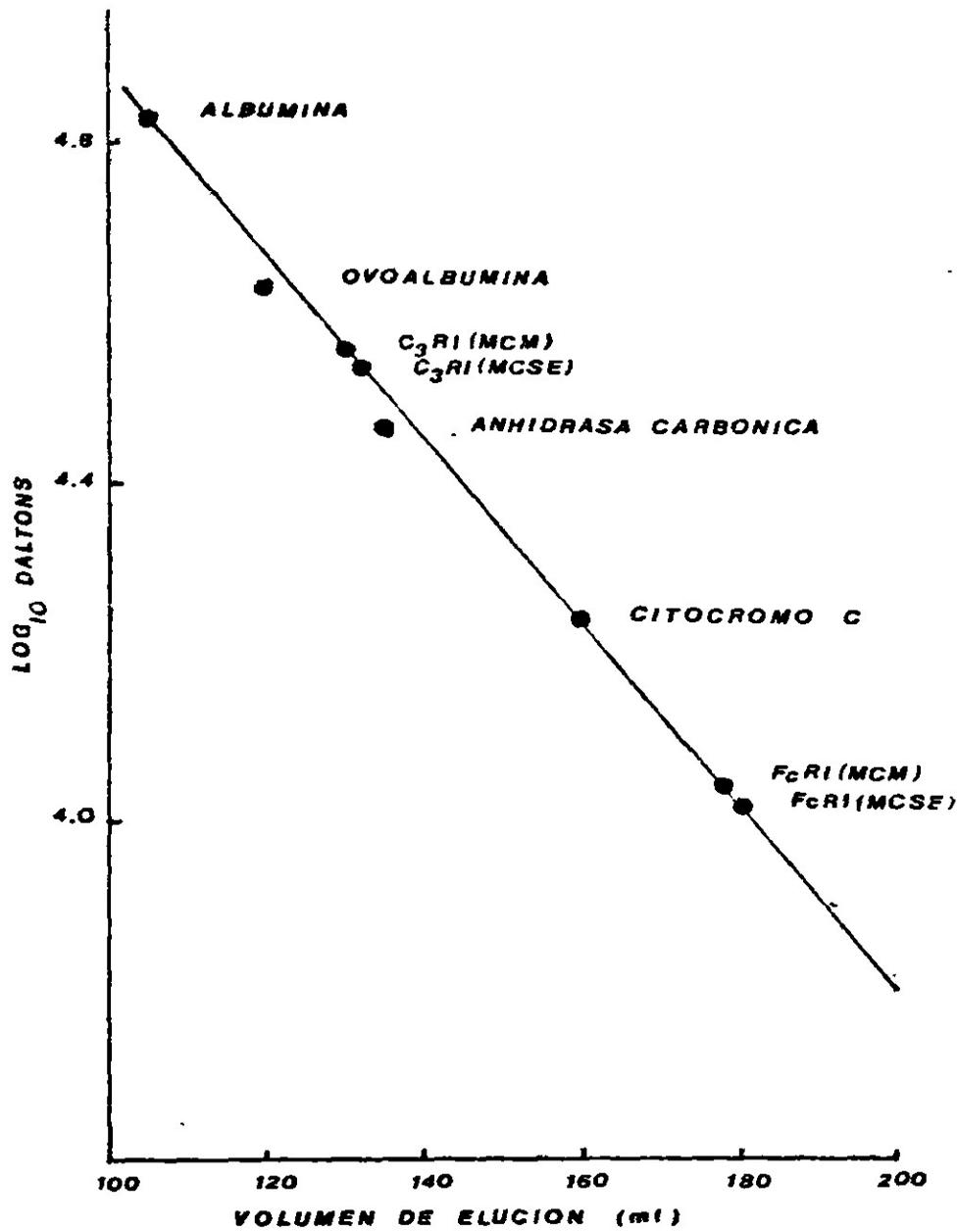
Así mismo se encontro que las masas moleculares del FcRI y C_3 RI del MCMP fueron de 10,500 daltones y 35,000 daltones respectivamente.



GRAFICA 5. PORCENTAJE DE ROSETAS Fe (O), C₃ (●) Y ABSORCION A 280 nm (A) DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-100/40 DEL SUERO ENDOTOXICO ACTIVADO CON LFS.



GRAFICA 6. PORCENTAJE DE ROSETAS Fc (O), C₃ (●) Y ABSORCION A 280nm (▲) DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-100/40 DE MACROFAGOS PERITONIALES ACTIVADOS CON LPS.



GRAFICA 7. CALIBRACION DE LA COLUMNA DE SEPHADEX G-100/40 CON PROTEINAS DE MASAS MOLECULARES CONOCIDAS.

DETERMINACION DEL pH ISOELECTRICO DEL FcRI: Para determinar el pH isoeléctrico del FcRI, se utilizó la técnica del electroenfoque en placa de Ultrodex y anfolinas de rango de pH conocido (ver materiales y métodos), utilizando 20 mililitros del MCPE previamente desalinizado.

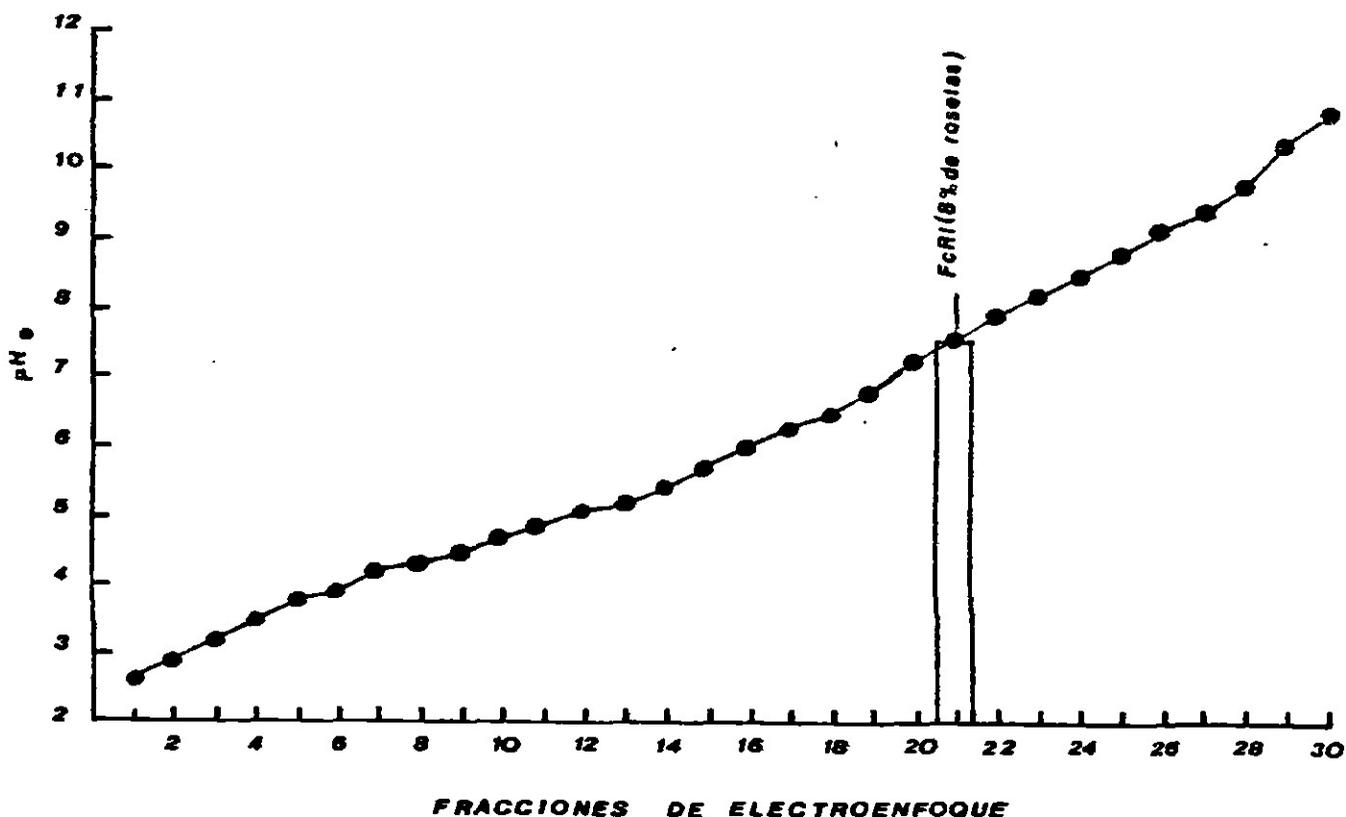
Como resultado se obtuvo que la actividad para la formación de rosetas con el EA se encontraba exclusivamente en la fracción N° 21 del electroenfoque encontrando que para el FcRI el pH isoeléctrico fué de 7.6 (Grafica 8).

La aparición del FcRI en una sola fracción, podría indicar que se trata de una sola molécula.

DETERMINACION DE LA CELULA PRODUCTORA DE LOS FACTORES INDUCTORES
PARA Fc Y C3

Con el objeto de investigar cual era la célula sanguínea responsable de la inducción de los factores para Fc y C₃, se procedió a obtener los diferentes medios condicionados (ver materiales y métodos).

Se observó que el medio condicionado de macrófagos fue el único capaz de inducir receptores para Fc y C₃ (Tabla 3), obteniendo un 13 % y un 15 % de rosetas para Fc y C₃ respectivamente mientras que para los demás medios condicionados se encontró que no presentaron capacidad inductora a la formación de receptores Fc y C₃. Otros estudios revelaron que el medio condicionado de granulocitos, fue el único que presentó actividad inhibitoria frente al medio condicionado de macrófagos (Tabla 4), el cual perdió toda su capacidad inductora para la formación de receptores para Fc y C₃. Los otros medios no alteraron la actividad biológica del medio condicionado de macrófagos.



GRAFICA 8. DETERMINACION DEL pH ISOELECTRICO, EN ULTRODEX, DEL MCPE ACTIVADO CON LFS. EL pH FUE MEDIDO DESPUES DE CORRER EL ELECTROENFOQUE (●). SE LOCALIZA UNA BARRA EN EL RANGO DE pH DONDE APARECIO EL FeRI.

INDUCCION DE RECEPTORES CONDICIONA- DO POR:	Fe				C ₃			
	CON LES		SIN LES		CON LES		SIN LES	
	F	D	F	D	F	D	F	D
GRANULOCITOS	1	0	0	0	0	3	0	1
MACROFAGOS	6	7	0	2	9	6	0	2
CELULAS DE PAZO	0	3	0	0	0	1	0	0
CELULAS DE TIMO	0	2	0	0	0	1	0	1
CELULAS DE GANGLIO	0	2	0	1	0	3	0	0
CONTROL	0	3	0	2	0	4	0	3

TABLA 3. PORCENTAJES DE INDUCCION DE RECEPTORES PARA Fe Y C₃ POR DIFERENTES MEDIOS CONDICIONADOS. 8×10^6 CELULAS DE MEDULA OSEA FUERON SEPARADAS JUNTO CON 0.5 ml DE LOS DIFERENTES MEDIOS CONDICIONADOS.

F.- ROJETA FUERTE (MAS DE 9 ERITROCITOS ADHERIDOS).

D.- ROJETA DEBIL (DE 3 A 9 ERITROCITOS ADHERIDOS).

INDUCCION DE RECEPTORES MEDIO CONDICIONADO POR:	Fc				C3			
	CON LPS		SIN LPS		CON LPS		SIN LPS	
	F	D	F	D	F	D	F	D
GRANULOCITOS MCMP	0	2	0	1	0	3	0	2
CELULAS DE BAZO MCMP	6	7	0	2	8	10	0	2
CELULAS DE TIRO MCMP	5	6	0	1	8	6	0	3
CELULAS DE GANGLIO MCMP	6	7	0	2	7	8	0	2
CONTROL	0	3	0	3	0	2	0	3

TABLA 4: INHIBICION DE LA INDUCCION DEL MEDIO CONDICIONADO POR MACROFAGOS PARA RECEPTORES Fc Y C3 POR MEDIOS CONDICIONADOS PROVENIENTES DE OTRAS CELULAS. 8×10^6 CELULAS SE SEMBRARON CON 0.5 ml DE LOS DIFERENTES MEDIOS A PROBAR Y 0.5 ml DE MCMP

F: ROSETA FUERTE (MAS DE 9 ERIROCITOS ADHERIDOS)

D: ROSETA DEBIL (DE 3 A 9 ERIROCITOS ADHERIDOS)

MCMP: MEDIO CONDICIONADO DE MACROFAGOS PERITONIALES.

En estudios realizados con fluidos corporales humanos (orina y suero) de pacientes normales se observó que la orina persi mostraba actividad inductora hacia receptores Fc con un porcentaje del 13 % pero no para C₃, mientras que el suero presentó ambas actividades obteniendo un 12 % de formación rosetaria para Fc y un 21 % para C₃ (Tabla 5).

RECEPTORES PARA INDUCTORES	Fc		C3	
	F	D	E	D
ORINA HUMANA	6	7	0	I
SUERO HUMANO	6	6	10	II
CONTROL	0	2	0	3

TABLA 5: PORCENTAJES DE INDUCCION DE RECEPTORES PARA Fc Y C3 POR ORINA Y SUERO HUMANO. 8×10^6 CELULAS DE MEDULA OSEA FUERON SEMBRADAS JUNTO CON 0.5 ml DE SUERO U ORINA HUMANA.

F: ROSETA FUERTE (MAS DE 9 ERITROCITOS ADHERIDOS)

D: ROSETA DEBIL (DE 3 A 9 ERITROCITOS ADHERIDOS)

Capítulo VIII

DISCUSION

DISCUSION

Esta bien establecida la existencia de receptores Fc y C_3 sobre la membrana de los leucocitos, y la importancia que ellos tienen en la defensa del organismo contra agentes extraños.

Sin embargo muy poco se conoce sobre el grado de diferenciación que las células necesitan para presentar esos receptores o los mecanismos que regulan su inducción.

El inductor de macrófagos y granulocitos (MGI), también conocido como factor estimulante de colonias (CSF) diferencia precursores mieloides hacia células morfológicamente maduras pero sin receptores para Fc y C_3 , demostrándose que existen otras moléculas diferentes al MGI que son las responsables a la formación de receptores Fc y C_3 . Por lo tanto el inductor del Fc (FcRI) y el inductor de C_3 (C_3 RI) completan la diferenciación de esas células en funcionalmente maduras.

Muchos intentos se han realizado hoy en día para determinar la masa molecular y el pH isoelectrico del MGI, utilizando diferentes medios condicionados de animales y humanos, de tejidos, de organos y fluidos corporales, así como medios condicionados normales o transformados por células in vitro.

Las propiedades moleculares obtenidas para el MGI varían de acuerdo a la fuente de obtención y al método bioquímico empleado.

En este trabajo se demostró que los factores FcRI y C_3 RI están también presentes en los medios condicionados usados para el estudio del MGI.

Se observó que la inducción de rosetas para FcRI utilizando suero endotóxico resultó ser el único que a concentraciones de 100 microlitros no aumentó en forma lineal, probablemente esto se deba a la existencia de elementos tóxicos en este medio.

La inducción a la formación de receptores para C_3 en células de médula ósea llegó a un nivel de saturación de aproximadamente un 22 % a partir de 25 microlitros del MCPE, esto parece indicar que el 78 % restante de las células no son inducibles a la formación de rosetas, al menos por el C_3 RI que se encontraba en este inductor. La posibilidad de existencia de sustancias tóxicas en este medio condicionado es poco probable, ya que se encontraron los mismos niveles de saturación cuando se usó el MCMP y el SE.

En este trabajo se demostró que a diferencia del MGI, los factores FcRI y C_3 RI representan un juego homogéneo de moléculas con una masa molecular aproximada de 10,500 daltones para el FcRI y 35,000 daltones para el C_3 RI.

Como es conocido las masas moleculares determinadas por cromatografía, suelen variar según el tipo de gel utilizado. En este trabajo se utilizó tanto Ultrogel ACA-54 como Sephadex G-100/40 se obtuvieron masas moleculares muy semejantes lo que nos da un indicio de que probablemente estos valores estén cercanos a los reales. Ya que existen con masas moleculares semejantes pero diferentes valores de pH isoeléctrico, y no se puede concluir que nuestros factores representen una especie química única hasta que no sean evaluados sus pH isoeléctricos.

Se ha demostrado que los macrófagos y linfocitos son capaces de producir MGI y esto implica la existencia de un posible mecanismo de retroalimentación regulada por leucocitos.

Segun los resultados de esta investigación, se dieron pruebas (en nuestras condiciones de cultivo) que los macrófagos y no los granulocitos y linfocitos, son las únicas células leucocitarias que fueron capaces de elaborar tanto FcRI como C_3 RI. Sin embargo, esta propiedad solo se manifestó exclusivamente cuando estas células fueron cultivadas en presencia de LPS, lo cual parece indicar que esta actividad de control en la aparición de receptores inmunológicos existe in vivo, como por ejemplo en los procesos infecciosos. Cabe así mismo hacer notar, que el control de la aparición de los receptores para Fc y C_3 en células mieloides puede estar bajo el control tanto de macrófagos como de granulocitos ya que en este trabajo se dió evidencia de que el MCGP contenia un factor que inhibía el efecto inductor del MCMP. Por lo que probablemente los macrófagos y granulocitos juegan un papel reelevante en la inducción e inhibición de la producción de estos factores.

Los resultados obtenidos muestran que el FcRI y el C_3 RI estan presentes en el suero humano normal, mientras que en la orina se encontro únicamente el FcRI (lo cual indica que posiblemente el C_3 RI no pasa la barrera glomerular del riñon).

Consideramos que la existencia de estos factores en el ser humano abre la posibilidad de un estudio de valor diagnóstico de estas moléculas en el suero de pacientes que presenten anomalías hematopoyéticas en donde una variación de estos inductores puede ser sospechada.

Seria conveniente la purificación del FcRI y C_3 RI para estudiar su posible aplicación terapeutica en aquellas enfermedades en donde se encuentren disminuidos y en los que sea necesario elevar el número de receptores para Fc y C_3 .

Finalmente hay que considerar que en este trabajo, el FcRI y C₃RI de origen humano fue evaluado por medio de células de médula ósea murina, y que estudios similares deben de llevarse a cabo usando médula ósea humana, para determinar si estas moléculas son semejantes. Cabe aclarar que estos factores existentes en el humano - podrían ser estudiados más fácilmente utilizando médula ósea de - ratón la cual es evidentemente más fácil de obtener que la médula humana.

Consideramos que la importancia de esta investigación radica en la contribución hecha al entendimiento de la diferenciación celular - en leucocitos, además de la identificación de la existencia de dos moléculas inductoras de interés biológico que así mismo demuestra que estos factores inducen a la formación de sitios receptores para Fc y C₃ en precursores mieloides de médula ósea. Y poseen características diferentes a las que se han reportado para la otra molécula diferenciadora: el MGI a la cual hasta la fecha se le asociaban las propiedades de inducir los receptores para Fc y C₃.

Capítulo IX

APENDICE

APENDICE

MEDIO DE EAGLE:

CONCENTRACIONES

	Miligramos por 1000 ml de agua	Equivalente aprox. en mM.
ARGININA	105	0.6
CISTEINA	24	0.2
HISTIDINA	31	0.2
ISOLEUCINA	52	0.4
LEUCINA	52	0.4
LISINA	58	0.4
METIONINA	15	0.1
FENILALANINA	32	0.2
TREONINA	48	0.4
TRIPTOFANO	10	0.05
TIROSINA	36	0.2
VALINA	46	0.4
GLUTAMINA	292	2.0
COLINA	1	
Ac. NICOTINICO	1	
Ac. PANTOTENICO	1	
PIRIDOXAL	1	
RIBOFLAVINA	0.1	
TIAMINA	1	
INOSITOL	2	
Ac. FOLICO	1	

GLUCOSA	2000
NaCl	8000
KCl	400
CaCl	140
MgSO ₄ ·7H ₂ O	100
MgCl ₂ ·6H ₂ O	100
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	60
KH ₂ PO ₄	60
NaHCO ₃	350
ROJO FENOL	20
PENICILINA	0.5

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (SAF): Con el objeto de contar con una solución amortiguadora para el mantenimiento de la célula, se utilizó la solución amortiguadora de fosfatos (SAF), la cual está constituida de los siguientes elementos en 1000 mililitros de agua destilada.

NaCl	8.0 gr
KCl	0.2 "
KH ₂ PO ₄	0.2 "
CaCl	0.1 "
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.1 "
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	2.1 "

El CaCl y MgCl₂·6H₂O se diluyen por separado en 100 mililitros de agua destilada, los compuestos restantes se diluyen en 800 mililitros de agua destilada, agregando al final poco a poco los 100 mililitros iniciales. Se afora a 1000 mililitros y se esteriliza por medio de un filtro de membrana (Millipore USA) con un poro de 22 micras de diámetro.

Se realizan pruebas de esterilidad en caldo soya. Se conserva en refrigeración hasta su uso.

SOLUCION DE ALSEVER: Solución amortiguadora para mantener los eritrocitos de carnero en condiciones normales in vitro durante 5 semanas. Se prepara como sigue:

$C_6H_{12}O_6$	20.50 gr
$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	8.00 "
$H_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$	0.55 "
NaCl	4.20 "

Se disuelve en un litro de agua y se esteriliza en autoclave, ajustando el pH a 6.1. Se efectúan pruebas de esterilidad en caldo de soya.

CROMATOGRAFIA: La cromatografía en columna es fácil de llevar a cabo desde el punto de vista técnico ya que es notablemente insensible a la composición del eluyente y a la temperatura, pudiendo tratar en esta forma compuestos muy lábiles con pocas posibilidades de que se destruyan pues no produce desnaturalización.

Fracciona sustancias de muy alto peso molecular dependiendo del tipo de gel que se use, determinando así la masa molecular de macromoléculas. También se usa para la disolución de sustancias proteicas.

El gel Sephadex usado en este caso es muy estable y puede ser usado durante años sin que pierda sus propiedades cromatográficas, siempre y cuando se evite desarrollo de microorganismos contaminantes.

En la cromatografía de gel de Sephadex se separan las sustancias - de acuerdo a su masa molecular: las moléculas grandes emergen primero de la columna mientras que las pequeñas son retardadas, esto se debe a que las moléculas grandes no penetran los enlaces cruzados que constituyen un armazón tridimensional en cada partícula de gel. Las moléculas pequeñas tienen acceso a todos los espacios entre las cadenas de la matriz del gel y por lo tanto, están distribuidos igualmente entre el líquido libre y el líquido en el gel, - lo que da lugar a que las moléculas pequeñas permanescan estacionarias en el gel y viajen a menor velocidad siendo arrastradas por - el líquido que se hace fluir a través del medio cromatografiado -- (116,117,118).

ELECTROENFOQUE: Esta técnica saca partido de la migración de iones en un campo eléctrico.

Cuando se hace pasar una corriente continua entre los electrodos - en un medio con iones, los iones negativos (aniones) se mueven --- hacia el electrodo positivo (ánodo), mientras que los iones positivos (cationes) se mueven hacia el electrodo negativo (cátodo), la velocidad de migración del ion depende de otras cosas, del tamaño de la carga que lleva y de la magnitud de la corriente empleada. - Se utiliza una matriz sólida de gel de (Ultradex) material que es hidratado y poroso pero posee rigidez mecánica, la matriz rígida - impide la convección y las alteraciones por vibración. No requiere de un sistema óptico complejo para poner de manifiesto la posición de las proteínas, ya que se detectan por medio de ensayos coloreados cualitativos.

En esta técnica la muestra problema se encuentra sometida a un -- campo eléctrico y a un gradiente de pH, dando por una serie de -- anfolinas de pH conocido.

Las proteínas se separan en bandas de acuerdo a su carga eléctrica y su pH, permitiendo realizar análisis de gran resolución con cantidades mínimas de mezcla compleja de proteínas (116,119).

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Carrèl, A. Harrison, J. Hugles, A. (1959). History of cytology. Abelard Schuman. London pag. 11-37
- 2.- Funderberg, H. (1979). Manual de inmunología clínica. El manual moderno. México. pag. 1-36
- 3.- Pluznik, D. and Sachs, L. (1965). The cloning of normal mast cell in tissue culture. J.Cell.Comp.Physiol. 66:319
- 4.- Paul, J. (1973). Cell and tissue culture. Churchill Livingstone 4° Ed, London. pag 14-79
- 5.- De Robertis, E.D. (1976). Biología celular y molecular. El Ateneo. México. pag 10-143
- 6.- Davis, B. Dulbecco, R. (1978). Tratado de Microbiología. Salvat editores, España. pag 1144-1145
- 7.- Eaves, A. and Bruce, W. (1973). In vitro production of colony stimulating activity: I. Exposure of mouse peritoneal cell to endotoxin. Cell Tissue Kinet. 7:19
- 8.- Price, G. Krogsrud, R. Stewart, S. Sen, J. (1978). Heterogeneity of colony stimulating activities. In hematopoietic cell differentiation. ACA. PRESS. New York. pag 214-241
- 9.- Ralph, P. Broxmeyer, H. Moore, R. Nakoinis, I. (1978). Induction of myeloid colony stimulating activity in murine monocyte tumor cell lines by macrophage activators as in a "T" cell by concavalin A. Cancer Research 38:1414
- 10.- Di Persio, J.F. Brennan, J.K. Lichtman, M.A. and Sepicer, B. L. (1978). Granulocyte growth modulators elaborated by human cell lines in hematopoietic cell differentiation. Blood. 51:3

- 11.- Ross, G.D. and Polley, M.J. (1975). J. Exp. Med. 141:1163
- 12.- Ehlenberger, A.G. and Nussenzweig, V. (1975). FED. PROC, -
FED. AM. SOC. EXP. BIOL. 34:854
- 13.- Ehlenberger, A.G. McWilliams, M. Phillips-Quagliata, J.M. -
Lamm, M.E. and Nussenzweig, V.N. (1976). J. Clin. Invest. -
57:53
- 14.- Bianco, C. (1976). In "Biological amplification systems in
immunity". Plenum, New York, In Press.
- 15.- Ferranini, M. Moretta, L. Abrile, R. and Durante, M.L. (1975).
Eur. J. Immunol. 5:70
- 16.- Brain, P. and Marston, R.H. (1973). Eur. J. Immunol. 3:6
- 17.- Lobo, P.I. Westervelt, F.B. and Horwitz, D.A. (1975). J. -
Immunol 114:116
- 18.- Cohen, B.E. Rosenthal, A.S. and Paul, W.E. (1973). Antigen-
macrophage interaction. I. Hapten specific inhibition of --
antigen interaction with macrophages from immune animals. -
J. Immunol 111:811
- 19.- Alexander, P. (1976). The function of the macrophage in ma-
lignant disease. Ann. Rev. Med. 27:207
- 20.- Zinkernagel, R.M. and Doherty, P.C. (1974). Immunological -
surveillance against altered self components by sensitised -
T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. Nature. 251:
547
- 21.- Cells, P. and Combs, G. (1977). Clinical aspects of immuno-
logy. Blackwell. Oxford. pag. 33-48
- 22.- Porter, R.R. (1976). La estructura de los anticuerpos. Sci-
entific American. Ed Blume. España. pag. 341-349
- 23.- Osler, A.G. and Sandberg, A.L. (1973). Alternate complement
pathways. Proq. ALLERGY 17:51-58

- 24.- Koller, C.A. King, G.W. Hurtubise, P.E. Sagone, A.L. and Lo -
Buglio, A.F. (1973). J. Immunol. 111:1610
- 25.- Diggs, L.W. Sturm, D. and Bell, A. (1978). The morphology of
human blood cell in Wright stained smears of peripheral blood
and bone marrow. Abbott Laboratories 4° Ed.
- 26.- Metcalf, D. Johnson, G.R. and Burger, A.W. (1980). Direct sti-
mulation by purified GM-CSF of the proliferation of multipo-
tencial and erythroid precursor cells. Blood 55:1
- 27.- Steward, C. and Lin, H. (1978). Macrophage grow factor and --
it is relationship to colony stimulating factor. J. Reticulo-
endothel. Soc. 4:269
- 28.- Laukel, H. Gasel, W.D. Doch, M.H. and Haverman, K. (1978). --
Preparation of colony stimulating activity from large batches
of human orine and production of antisera against it. J. Cell.
Physiol. 94:21
- 29.- Price, G. Krogsrud, R. Steward, S. Gen, J. (1978). Heteroge-
neit of colony stimulating activities. In hematopoietic cell
differentiation. ACA. PRESS.
- 30.- Metcalf, D. and Foster, R. (1967). Behavior on transfer of
serum stimulated bone marrow colonies. Proc. Soc. Ex. Biol.
New York. 126:758
- 31.- Landau, T. Sachs, L. (1971). Characterization of the inducer
required for the development of macrophage and granulocyts -
colonies.. Proc. Nat. Acad. Sci. 68:10
- 32.- Parker, J. Metcalf, D. (1973). Production of colony stimula-
ting activity in mitogen-stimulated lymphocyte cultures. J.
Immunol. 112:502

- 33.- Sheridan, J. Metcalf, D. and Stanley, E. (1974). Further - studies on the factor in lung-conditioned medium stimulating granulocyte and monocyte colony formation in vitro. J. - Cell. Physiol. 84:147
- 34.- Bradley, T. Stanley, E. and Summer (1971). Factor from mouse tissues stimulating colony growth of mouse bone marrow cell in vitro. Aust. J. Exp. Biol. Sci. 49:595
- 35.- Ming Chi-Wu. and Cini, J. (1979). Purification of a colony - stimulating factor from cultured pancreatic carcinoma cells. J. of Biol. Chem. 254:14
- 36.- McGhee, R. Kiyono, H. and Michalek, M. (1980). Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response. J. Immunol. 124:1603
- 37.- Apte, R. Hertogs, CH. and Pluznik, D. (1980). Regulation of LPS induced granulopoiesis and macrophage formation by spleen cells. J. Immunol 124:1223
- 38.- Cline, M. Rothamm, B. and Golde, D. (1974). Effect of endotoxin on the production of colony stimulating factor by human monocyte and macrophage. J. Cell. Physiol. 84:193
- 39.- Lotem, J. and Sachs, L. (1974). Different blocks in the differentiation of myeloid leukemic cell. Proc. Nat. Aca. Sci. 71:3507
- 40.- Griffin, D.F. (1981). Activation of murine B lymphocyte with LPS. J. Immunol. 126:1186
- 41.- Stanley, E. Robinson, W. and Ada, G. (1968). Properties of - colony stimulating factors in leukemic and normal mouse serum. Exp. Biol. Med. Sci. 46:715

- 42.- Motoyoshi, K. Takaku, F. Mizoguchi, H. and Miuray, Y. (1978). Purification and some proprieties of colony stimulating factor from normal human urine. Blood 5:1012
- 43.- Burges, A. and Metcalf, D. (1978). Purification and characterization of cell specific colony stimulating factor in hematopoietic cell differentiation Aca. Press. New York
- 44.- Richard, E. and Heard, P. (1976). Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 49:281
- 45.- Ohono, T. Seki, M. and Shikita, M. (1978). Colony-stimulating factors active on human bone marrow cells from a Yoshida Sarcoma cell line. Blood 51:5
- 46.- Burges, A. Camakaris, J. and Metcalf, D. (1976). Purification and proprieties of colony-stimulating factor from mause lung conditioned medium. J. Biol. Chem. 252:1998
- 47.- Stanley, E. (1978). Induction of macrophage production and proliferation by a purified colony stimulating factor. Nature 274:5667
- 48.- McKeever, E.P. and Spicer, S.S. (1982). Surface receptors of mononuclear phagocytes. The reticuloendothelial system a comprehensive treatise.
- 49.- Stuart, A.E. (1970). The reticuloendothelial system. Livingstone, Edinburg
- 50.- Ratzan, K.R. Musher, D.M. Keusch, G.T. and Weinstein, L. (1972). Correlation of increased metabolic activity, resistance to infection, enhanced phagocytosis, and inhibition of bacterial growth by macrophages from Listeria and BCG infected mice. Infect. Immunol. 5:449
- 51.- Edelson, P.J. Zwiebel, R. and Cohn, Z.A. (1975). the pinocytic rate of activated macrophages. J. Exp. Med. 142:1150

- 52.- Edelson, P.J. and Erbs, C. (1978). Biochemical and functional characteristics of the plasma membrane of macrophages -- from BCG-infected mice. *J. Immunol.* 120:1532
- 53.- Bianco, C. Griffin, F.M. and Silverstein, S.C. (1975). Studies of the macrophage complement receptor. Alteration of receptor function upon macrophage activation. *J. Exp. Med.* 141:1278
- 54.- Carr, K. and Carr, I. (1970). How cell settle on glass: A study by light and scanning electron microscopy of some properties of normal and stimulated macrophages. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 105:234
- 55.- Bianco, C. Eden, A. and Cohn, Z.A. (1976). The induction of macrophage spreading: role of coagulation factors and the complement system. *J. Exp. Med.* 144:1531
- 56.- Burgalata, C. Territe, M.C. Quan, S.G. and Golde, D.W. (1978). Glucan activated macrophages: functional characteristics and surface morphology. *J. Reticuloendothelial. Soc.* 23:195
- 57.- Edelson, P.J. and Cohn, Z.A. (1976). 5' nucleotidase activity of mouse peritoneal macrophages. I. Synthesis and degradation in resident and inflammatory populations. *J. Exp. Med.* 144:1581
- 58.- Melsom, H. and Seljelid, R. (1973). The cytotoxic effect of mouse macrophages on syngenic and allogenic erythrocytes. *J. Exp. Med.* 131:807
- 59.- Hibbs, Jr J.B. (1976). The macrophage as a tumoricidal effector cell: A review of in vivo and in vitro studies on the mechanism of the activated macrophage nonspecific cytotoxic reaction, in: *The macrophage in neoplasia* (M.A. Fink, Ed) -- pag. 83-111 *Aca. Press. New York*

- 60.- Hanna, Jr M.G. Bucana, C. Hobbs, B. and Fidler, I.J. (1976). Morphologic aspect of tumor cell cytotoxicity by effector - cell of the macrophage histiocyte compartment: In vivo and in vitro studies in BCG mediated tumor regression, in: The macrophage in neoplasia (M.A. Fink, Ed) pag. 113-133 Aca. Press. New York.
- 61.- Stewart, C.C. Lin, H.S. and Adles, C. (1975). Proliferation and colony forming ability of peritoneal exudate cell in -- liquid culture. J. Exp. Med. 141:1253
- 62.- Van der Zrijts, B.A.M. Stewart, C.C. and Schlesinger, S. -- (1978). Proliferative capacity of mouse peritoneal macrophages in vitro. J. Exp. Med. 147:1253
- 63.- Dannenberg, Jr A.M. (1968). Cellular hypersensitivity and - cellular immunity in the pathogenesis of tuberculosis: specificity, systemic and local nature, and associated macro-- phage enzymes Bact. Rev. 32:85
- 64.- McKeever, P.E. Garvin, A.J. Hardin, D.H. and Spicer, S.S. - (1976b). Immune complex receptor on cell surfaces. II. Cytochemical evaluation of their abundance on different immune cells: Distribution, uptake, and regeneration. Am. J. Pathol 84:437
- 65.- Territo, M.C. Golde, D.W. and Cline, M.J. (1976). Macrophage activation and function, in: Manual of clinical immunology (N.R. Rose and H. Friedman. Ed) pag 142-158 Am. Soc. for Microbiol. Washington, D.C.
- 66.- Poplack, D.C. Sher, N.A. Chaparas, S.D. and Blaese, R.M. - (1976). The effect of mycobacterium bovis (Bacillus Calmette Guerin) on macrophage random migration, chemotaxis and pinocytosis Cancer. Rev. 36:1233

- 67.- Ratzan, K.R. Nusher, D.M. Keusch, G.T. and Weinstein, L. - (1972). Correlation on increased metabolic activity, resistance to infection, enhanced phagocytosis, and inhibition of bacterial growth by macrophages from *Listeria* and BCG infected mice. *Infect. Immunol.* 5:499
- 68.- Stubbs, M. Kühner, A.V. Glass, E.A. David, J.R. and Karnovsky, M.L. (1973). Metabolic and functional studies on activated mouse macrophages. *J. Exp. Med.* 137:537
- 69.- Haranaka, K. Matsuo, M. and Mashino, K. (1977). The enhancement of phagocytosis and intracellular killing of *Pseudomonas aeruginosa* and its common antigen (OEP) coated latex particles by mouse spleen macrophages to which anti-OEP-IgG and gentamicin have been added. *Jpn. J. Exp. Med.* 47:35
- 70.- Reynolds, H.Y. and Thompon, R.E. (1973). Pulmonary host defenses. II. Interaction of respiratory antibodies with *Pseudomonas aeruginosa* and alveolar macrophages. *J. Immunol.* 111:369
- 71.- Reynold, H.Y. (1974). Pulmonary host defenses in rabbits after immunization with *Pseudomonas* antigens: The interaction of bacterial, antibodies, macrophages and lymphocytes. *J. Infect. Dis.* 130:5
- 72.- Diamond, B. Birshtein, B.K. and Scharff, M.D. (1979). Site of binding of mouse IgG to the Fc receptor on mouse macrophages. *J. Exp. Med.* 150:721
- 73.- Dorrington, K.J. (1976). Properties of the Fc receptor on macrophages and monocytes. *Imminol. Commun.* 5:263
- 74.- Shear, H.L. Nussenzweig, R.S. and Bianco, C. (1979). Immune phagocytosis in murine malaria. *J. Exp. Med.* 149:1288

- 75.- Kassis, A.L. Aikawa, M. and Mahmoud, A.F. (1979). Mouse antibody-dependent eosinophil and macrophage adherence and damage to schistosomula of Schistosoma mansoni. J. Immunol 122:398
- 76.- Knyszynski, A. Lebovich, S.J. and Danon, D. (1977). Phagocytosis of "old" red blood cell by macrophages from syngenic mice in vitro. Exp. Hematol. 5:480
- 77.- Kay, M.M.B. (1975). Mechanism of removal of senescent cell by human macrophages in situ. Proc. Nat. Aca. Sci. 72:3521
- 78.- Jancik, J.M. and Schaver, R. (1978). Sequestration of neuraminidase treated erythrocyte. Studies on its topographic, morphologic and immunologic aspects. Cell. Tissue Res. 186:209
- 79.- Nicolson, G.L. (1973). Neuraminidase "unmasking" and failure of trypsin to "unmask" B-D-galactose-like sites on erythrocyte, lymphoma and normal and virus-transformed fibroblast cell membranes. J.Natl. Cancer. Inst. 50:1443
- 80.- Bianco, C. (1976). Methods for study of macrophage Fc and C₃ receptors, in: In vitro methods in cell-mediated and tumor immunity (B.R. Bloom, and J.R. Davis, Ed) pag 407-415 Aca. Press. New York
- 81.- Thrasher, S.G. Bigazzi, P.E. Yoshida, T. and Cohen, S. (1975b). Distribution of cytophilic and anti-macrophage antibody on the macrophage surface. Immunol Commun. 4:219
- 82.- Kuhn, R.E. and Cassida, G.W. (1978). An indirect quantifiable assay for cytophilic antibody. J. Immunol Methods. 19:387
- 83.- Unkeless, J.C. and Eisen, H.N. (1975). Binding of monomeric immunoglobulins to Fc receptors of mouse macrophages. J. Exp. Med. 142:1520

- 84.- Segal, D.H. and Hurwits, E. (1977). Binding of affinity --- cross-linked oligomers of IgG to cell bearing Fc receptors. *J. Immunol.* 118:1338
- 85.- Phillips-Quagliata, J.M. Levine, B.B. Quagliata, F. and Uhr, J.W. (1971). Mechanism underlying binding of immune complexes to macrophages. *J. Exp. Med.* 133:589
- 86.- Segal, D.M. titus, J.A. (1978). The subclass specificity for the binding of murine myeloma proteins to macrophage and --- lymphocyte cell lines and to normal spleen cell. *J. Immunol* 120:1395
- 87.- Benacerraf, B. (1968). Cytophilic immunoglobulins and delayed hypersensitivity. *Fed. Proc.* 27:46
- 88.- Shinomiya, T. and Koyama, J. (1976). In vitro uptake and digestion of immune complexes containing guinea-pig IgG1 and IgG2 antibodies by macrophages. *Immunology.* 30:267
- 89.- Thrasher? S.G. and Cohen, S. (1971). Studies of the mechanism of binding of chemical modified cytophilic antibodies to ma---crophages. *J. Immunol.* 107:672
- 90.- Munthe-Kass, A.C. (1976). Phagocytosis in rat Kupfer cell in vitro. *Exp. Cell. Res.* 99:319
- 91.- Gigli, I. and Nelson, Jr R.A. (1968). Complement dependent --- immune phagocytosis. I. Requeriments for C1, C4, C2, C3. *Exp. Cell. Res.* 51:45
- 92.- Alper, C.A. Abramson, N. Johnston Jr R.B. Jandl, J.H. and Rosen, F.S. (1970). Studies in vivo and in vitro on an abnormality in the metabolism of C3 in a patient with increased susceptibility to infection. *J. Clin. Invest.* 49:1975

- 93.- Alper, C.A. Colten, H.R. Rosen, F.S. Rabson, A.R. Macnab, -
G.M. and Gear, J.S.S. (1972). Homozygous deficiency of C3 -
in a patient with repeated infection. *Lancet* 2:1179
- 94.- Ward, H.K. and Enders, J.F. (1933). An analysis of the opso-
nic and tropic action of normal and immune sera based on --
experimental with the Pneumococcus. *J. Exp. Med.* 57:527
- 95.- Li, L.W. Mudd, S. and Kapral, F.A. (1963). Dissociation of
phagocytosis and intracellular killing of Staphylococcus --
aureus by human blood leukocytes. *J. Immunol.* 90:804
- 96.- Young, L.S. (1974). The host: humoral and cellular factors.
Role of antibody in infection due to Pseudomonas aeruginosa
J. Infect. Dis. 130:S111
- 97.- Heilman, D.H. (1977). Regulation of endotoxin-induced inhibi-
tion of macrophage migration by fresh serum. *Infect. Immu.*
17:371
- 98.- Griffin, Jr F.M. Bianco, C. and Silverstein, S.C. (1975a).
Characterization of the macrophage receptor for complement
and demonstration of its functional independence from the
receptor for the Fc portion of immunoglobulin G. *J. Exp. Med.*
141:1269
- 99.- Montovani, B. Rabinovitch, M. and Nussenzweig, V. (1972).
Phagocytosis of immune complexes by macrophages. Different -
roles of the macrophage receptor sites for complement (C3) -
and for immunoglobulin (IgG). *J. Exp. Med.* 135:780
- 100.- Theofilopoulos, A.N. Bokish, V.A. and Dixon, F.J. (1974). -
Receptor for soluble C3 and C3b on human lymphoblastoid --
(Raji) cell. Properties and biological significance. *J. Exp.*
Med. 139:696

- 101.- Ehlenberger, A.G. and Nussenzweig, V. (1977). The role of - membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis. J. Exp. Med. 145:357
- 102.- Wellek, B. Hahn, H. and Opferkuch, W. (1976b). Quantitative contributions of IgG, IgM and C3 to erythrophagocytosis and rosette formation by peritoneal macrophages and anti-opsonin activity of dextran sulfate 500. Eur. J. Immunol. 5:378
- 103.- Michl, J. Pieczonka, M.M. Unkeless, J.C. and Silverstein, S.C. (1979). Effect of immobilized immune complexes on Fc - and complement-receptor function in resident and thioglyco-llate elicited mouse peritoneal macrophages. J. Exp. Med. 150:607
- 104.- Rabellino, E.M. Gordon, D.F. Williams, N. and Metcalf, D. (1978). Sequential expression of membrane receptors and phagocytic capacity during leukocyte differentiation. J. Exp. - Med. 147:434
- 105.- Cline, M. (1975). The white cell. Harvard university press. Cambridge pag 345:348
- 106.- Hämmerling, N. Chin, A. and Abbot, J. (1976). Ontogeny or murine B lymphocytes: Sequence of B cell differentiation -- from surface immunoglobulin negative. Precursors to plasma cell. Proc. Natl. Aca. Sci. 73:2003
- 107.- Czop, K. and Austen, F. (1980). Functional discrimination by human monocytes between their C3 receptors. J. Immunol. 125:124
- 108.- Lotem, J. and Sachs, L. (1974). Different blocks in the differentiation of myeloid leukemic cell. Proc. Nat. Aca. Sci. 71:3507

- 109.- Rabellino, E.M. and Metcalf, D. (1975). Receptors for C3 - and IgG on macrophage, neutrophil and eosinophil colony -- cells grown in vitro. J. Immunol. 115:668
- 110.- Weir, D.M. (1978). Application of immunological methods. Handbook of experimental immunology. Blackwell Scientific publications. London pag 273:285
- 111.- Bianco, D. Patrick, R. and Nussinz, W. (1970). A population of lymphocytes bearing a membrane receptors for antigen-complement-complex. J.Exp.Med. 132:702
- 112.- Malcom, A. and More, M. (1976). Regulation of granulopoiesis in vitro. Aca. Press.
- 113.- Mintz, J. and Sachs, L. (1974). Differences in inducing activity for human bone marrow colonies in normal granulocytic -- colonies by mouse marrow cells in vitro. J. Cell.Phisiol. 84:275
- 114.- Williams, N. and Fluznick, D. (1978). Differences in the density characteristics in murine granulocyte-progenitor cells - cloned in the presence of serum and hemolisate. Exp. Hematol 6:383
- 115.- Sheridan, J. and Metcalf, D. (1973). the bone marrow CSF re-- lation of serum CSF to urine CSF. Proc. Soc. Biol. Med. 44:2
- 116.- Lehninger, A. (1976). Biochemistry. 2° Ed. Worth N.Y. pag 157
- 117.- Fischer, L. (1975). Introducci3n a la cromatografia en gel. El manual moderno. pag 1-36
- 118.- Stein, H. and Moore, S. (1951). Chromatography. Sci. Am. 184:3
- 119.- Anders, W. and Hilary, J. (1976). Preparative flat-bed electro fucusing in granulated gel with the LKB Multiphor. Aplicacion note. 198:217.

