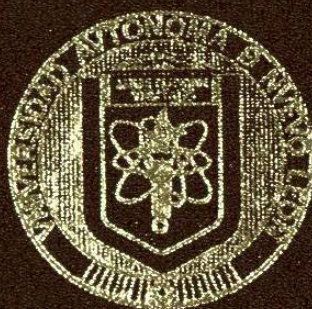


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA  
SUSTANCIA PRODUCIDA POR MACROFAGOS  
CON ACTIVIDAD QUIMIOTACTICA  
PARA LINFOCITOS"

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN:  
INMUNOBIOLOGIA

FOR

O.B.P. RICARDO ALBERTO GOMEZ FLORES

MONTERREY, N. L.

JULIO DE 1989



TM

Z5320

FCB

1989

G6



1020091623

TM  
25320  
FCB  
1989  
G6



FONDO TESIS

62911

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

" AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA SUSTANCIA  
PRODUCIDA POR MACROFAGOS CON ACTIVIDAD  
QUIMIOTACTICA PARA LINFOCITOS "

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN :

I N M U N O B I O L O G I A

POR

Q.B.P. RICARDO ALBERTO GOMEZ FLORES

COMISION DE TESIS:

APROBADA:

DIRECTOR:

  
DR. REYES S. TAMEZ GUERRA

SECRETARIO:

  
DRA. CRISTINA RODRIGUEZ PADILLA

VOCAL:

  
DRA. LAURA M. TREJO AVILA

**El viento, la palabra.  
Para que' me la has dado  
si no puedo parir  
huracanes al alba.**

**S. Fernández**

A la Dra. Enriqueta Fernández, por el gran  
cariño que le tengo y por que hemos compartido  
vivencias inolvidables.

A mis hermanos, Carlos, Rogelio, Perlita y Mónica, así como a mis padres, por el apoyo eterno que recibo inmerecidamente de ellos.

A mis inseparables amigos, Leonardo y José Luis porque han estado conmigo en los momentos de éxito y en la adversidad en forma desinteresada.

A mis compañeros del laboratorio de Inmunología y Virología, por la importancia que tuvo para mí, sus críticas en todo momento constructivas.

A todas aquellas personas que involuntariamente omito, que de una u otra forma me apoyaron cuando de alguna manera lo necesitaba.



## AREA DE TRABAJO

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

# I N D I C E

	<b>Página</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>4</b>
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	<b>8</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>14</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>18</b>
<b>FIGURAS Y TABLAS</b>	<b>21</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>32</b>

## INTRODUCCION

Los fagocitos mononucleares en cultivo secretan una gran variedad de moléculas con importantes funciones biológicas. Estas moléculas secretadas incluyen a proteasas bien definidas capaces de afectar proteínas extracelulares (tal como colagenasa, elastasa, activador de plasminógeno)(1-3), moléculas involucradas en procesos de inflamación y defensa (las proteínas del complemento C<sub>2</sub> o C<sub>4</sub>, interferon, lisozima)(4-6), y una variedad de moléculas definidas principalmente por su capacidad para influenciar en la conducta de otras células. Incluidas en el último grupo se encuentran moléculas linfoestimuladoras las cuales podrían ser importantes en modular algunas etapas de la respuesta inmune (7-10). La interacción macrófago-linfocito es un evento central tanto en el inicio como en la regulación de la respuesta inmune (11). El contacto entre el macrófago y el linfocito puede ser facilitado por un factor quimiotáctico producido por los linfocitos T el cual atrae macrófagos (12). Por otro lado, se ha demostrado que la interleucina-1 producida por macrófagos tiene efecto quimiotáctico sobre neutrófilos, monocitos, y linfocitos T y B (9,10,13,14). Ward reportó que los sobrendantes de 24 horas de cultivos de macrófagos estimulados con antígeno eran capaces de inducir quimiotaxis en neutrófilos, macrófagos y linfocitos (15). Estos factores quimiotácticos podrían jugar no sólo un papel importante en la regulación de la migración y tráfico celular *in vivo*, sino también actuar en la etapa inductiva de la

respuesta inmune. Se ha demostrado que inmediatamente después de la entrada del antígeno, se incrementa la cantidad de células de la corteza profunda de los ganglios linfáticos (16-18). Bajo la hipótesis de que durante la fase temprana de la respuesta inmune, la interacción entre el macrófago y el linfocito podría facilitarse por la producción de sustancias quimiotácticas por parte de los macrófagos, se realizó el presente trabajo, encontrando actividad quimiotáctica en los sobrenadantes de 6 y 24 horas de los macrófagos estimulados con eritrocitos de carnero, siendo los linfocitos pequeños las principales células respondedoras al sobrenadante de 6 horas, mientras que a los sobrenadantes de 24 horas también respondieron neutrófilos en forma significativa. Las células respondedoras al sobrenadante de 6 horas parecen ser linfocitos T ya que células de bazo de ratas desnudas nu/nu son incapaces de responder a dicho estímulo, mientras que las células de los padres heterocigotos si lo hacen. La producción de sobrenadantes con actividad quimiotáctica está asociada a la presencia de antígeno en los cultivos de células adherentes de exudado peritoneal. Aunque la actividad quimiotáctica de los sobrenadantes de 24 horas se ha reportado previamente, no existen reportes de actividad quimiotáctica a las 6 horas. Esta actividad quimiotáctica de los sobrenadantes de 6 horas es producida aún después de tratar células adherentes de exudado peritoneal con anticuerpos anti células T y B, indicando que es un producto neto de los macrófagos. En la caracterización inicial, hemos encontrado que la actividad en los sobrenadantes de 6 horas es inhibida por tripsina,



quimiotripsina, papaína, papaína con urea 8M y a 70 °C/30' y  
100 °C/10'.

## ANTECEDENTES

Ultimamente ha recibido mucha atención el estudio de la cinética y factores solubles producidos por los macrófagos, así como la importancia de la interacción de estas células con los linfocitos T y B.

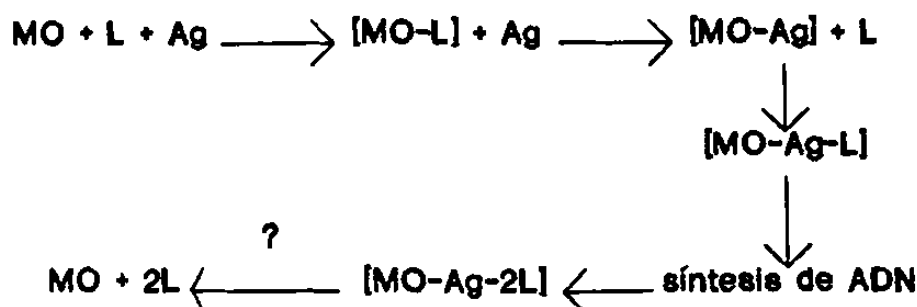
En los 60's, Fishman y Adler enfocaron su atención al probable procesamiento del antígeno por el macrófago. Sus trabajos se fundamentaron en que el ARN de macrófagos incubados previamente con bacteriófagos, era capaz de estimular la síntesis de anticuerpos contra dichos fagos, por células de gánglios linfáticos en cámaras de difusión (19).

Askonas y Rhodes reportaron que tales extractos de ARN contenían antígeno y sugirieron que los macrófagos podían procesar el antígeno para hacerlo altamente inmunogénico (20). Subsecuentemente Adler, Fishman y Dray describieron un segundo tipo de ARN de macrófagos que era capaz de inducir la síntesis de anticuerpos específicos los cuales llevaban un marcador alotípico del macrófago. Esto implicaba que la información genética había sido transferida del macrófago a la célula productora de anticuerpos (21).

Por otra parte, Moiser demostró *in vitro* que la respuesta primaria de anticuerpos por células de bazo de ratón contra eritrocitos de carnero dependía de la interacción de células adherentes al vidrio (fracción rica en macrófagos) y células no adherentes (fracción rica en linfocitos). La remoción de cualquiera de estas fracciones inhibía la respuesta (22). De la misma forma Oppenheim, Leventhal y Hersh demostraron que la

transformación *in vitro* de linfocitos humanos inducida por el antígeno era inhibida marcadamente cuando los macrófagos eran eliminados de las suspensiones de leucocitos humanos al pasar estas a través de columnas con perlas de vidrio (23). La restauración de la respuesta se lograba al agregar macrófagos a las suspensiones de leucocitos (24).

Rosenthal (25) propone un interesante modelo de interacción macrófago-linfocito. En este, el evento inicial es una interacción independiente de antígeno entre el macrófago y el linfocito, la cual es reversible, específica de especie y dependiente del metabolismo del macrófago. Si los macrófagos llevan antígeno para lo cual un linfocito dado posee un receptor específico, entonces ocurre un segundo evento, el cual es irreversible y dependiente de antígeno para la estabilización de la unión macrófago-linfocito. Esta última etapa requiere que el macrófago y el linfocito sean histocompatibles. Finalmente, luego de sintetizar ADN, el linfocito se divide, iniciando la linfoproliferación y por ende la respuesta inmune. Este modelo se resume a continuación. MO, macrófago; L, linfocito; Ag, antígeno :



Recientemente, Oppenheim demostró que muestras de interleucina-1 altamente purificadas no tienen acción quimiotáctica *in vitro*, y que por el contrario existen otras sustancias con actividad quimiotáctica tales como un factor proteico denominado *factor quimiotáctico para neutrófilos derivado de macrófagos (FQNDM)* cuyo peso molecular es de 6500 (27). De igual forma, Wolpe y col., demostraron que una proteína de bajo peso molecular (8000), la cual fué llamada *proteína inflamatoria del macrófago (PIM)*, inducía la quimiocinesis de los neutrófilos (28)..

Existen sustancias que pueden inducir la quimiocinesis de linfocitos *in vitro*. Tales sustancias incluyen a la caseína, el componente del complemento C5a, y el f-Met-Leu-Phe, los cuales son continuamente utilizados como controles en experimentos de migración (29). En este punto debe hacerse una distinción entre quimiocinesis y quimiotáxis. La quimiocinesis es el movimiento al azar de las células, mientras que la quimiotáxis es un movimiento dirigido hacia el agente atrayente y su demostración depende del uso de gradientes (30-31).

Un hecho notable en la interacción macrófago-linfocito es que los linfocitos tienden a adherirse alrededor del macrófago. Los timocitos (32-34), linfocitos de sangre periférica (35-36), y los linfocitos provenientes de gánglios linfáticos y otros tejidos linfoides (32-34), han mostrado adhesión a los macrófagos. La adherencia a los macrófagos peritoneales fué más fuerte que a macrófagos alveolares,



neutrófilos, eosinófilos o fibroblastos (32,37). Además, la adherencia fue mucho mayor en presencia de una reacción inmune. Salvin y col. (34), observaron que los linfocitos de cobayo sensibilizados a antígeno mostraron locomoción tanto en presencia como en ausencia de antígeno y que se adherían a los macrófagos sólo en presencia de antígeno, mientras que los linfocitos no sensibilizados no lo hacían.

Este fenómeno de adhesión de linfocitos inmunes a macrófagos es una forma muy especializada de adhesión intercelular la cual podría jugar papeles muy importantes, como el de permitir el contacto necesario célula-célula para la interacción entre el macrófago y el linfocito T cooperador (38).

## MATERIAL Y METODOS

*Animales.* En los experimentos reportados en este trabajo se utilizaron ratas singénicas de 2-3 meses de las cepas Wistar, nu/nu y nu/+ . Estos animales fueron donados por el Departamento de Inmunología del Hospital Universitario , Monterrey, Nuevo León.

*Preparación de células fagocíticas mononucleares.* Se obtuvieron células de exudado peritoneal de rata mediante lavado peritoneal utilizando medio mínimo esencial estéril (MEM, Gibco Laboratories, Grand Island, N.Y.)(39,40). Las células recuperadas se contaron y se depositaron en cajas petri de vidrio de 60 x 15 mm. a una concentración de  $3 \times 10^6$  células/caja. Las células se incubaron toda la noche a  $37^\circ \text{C}$ . Posteriormente, las células no adherentes se removieron mientras que las células adherentes se lavaron una vez con solución de Gey (41) y tres veces con una solución de NaCl al 0.85 %. Más del 95% de la población final eran macrófagos, determinados así por la morfología celular.

*Producción de sobrenadantes con actividad quimiotáctica.* La población de macrófagos obtenida se incubó con 4 ml de solución de Gey y  $10^6$  eritrocitos de carnero (ECa) a  $37^\circ \text{C}$ . Los sobrenadantes se colectaron desde los 30 minutos hasta las 48 horas de incubación, las células se removieron por centrifugación a 1600 r.p.m. por 10 minutos a  $6^\circ \text{C}$  y los sobrenadantes se mantuvieron congelados a  $-20^\circ \text{C}$  hasta su uso en pruebas de quimiotaxis. Los controles fueron los siguientes: solución de Gey (control negativo), solución de

se probaron para actividad quimiotáctica (45).

*Electroforésis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.* Este tipo de electroforésis se llevó a cabo de acuerdo al método de Laemli (46) utilizando geles separadores al 11 % (2 mm. de grosor y 12 cm. de largo). Las muestras conteniendo proteínas se desnaturalizaron en dodecil sulfato de sodio al 4 % bajo condiciones reductoras, calentándolas a ebullición por 5 minutos. Posteriormente alíquotas de las muestras se depositaron en el gel separador. El gel entonces se corrió a 100 volts, hasta que el frente de migración había alcanzado un 90 % de la longitud del gel. Se utilizaron los siguientes marcadores de peso molecular: albúmina bovina (66 Kd), albúmina de huevo (45 Kd), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (36 Kd), anhidrasa carbónica (29 Kd), tripsinógeno (24 Kd), inhibidor de tripsina (20.1 Kd) y  $\alpha$ -lactalbúmina (14.2 Kd). Estos estándares se obtuvieron de SIGMA.

*Demostración de los macrófagos como las células productoras del factor quimiotáctico de las 6 horas.* Se trataron cultivos de células adherentes de exudado peritoneal con anticuerpos monoclonales anti linfocitos T y timocitos (SEROTEC, MCA 52), más anticuerpos monoclonales anti linfocitos B (SEROTEC, MCA 340) y complemento de cobayo, de la siguiente manera: los cultivos de macrófagos se trataron con una mezcla de anticuerpos monoclonales anti células T y B al 1 %, y se

caseína (0.75-3 mg/ml, control positivo, MERCK, Naucalpan, México) y sobrenadantes de 6 horas de macrófagos incubados sin antígeno o mitógeno (control negativo).

*Preparación de células linfoides de sangre periférica y bazo.*

Se obtuvieron leucocitos de ratas singénicas Wistar, nu/nu y nu/+ de cualquier sexo. En cada experimento se obtuvieron asépticamente el bazo y sangre periférica de una rata y la suspensión de células resultante se centrifugó en solución de Ficoll-Hypaque 1.007. Las células recuperadas se lavaron 2 veces en solución de Gey y finalmente se resuspendieron en la misma solución a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml.

*Prueba de quimiotaxis.* Para la prueba de quimiotaxis se utilizó la prueba de migración en filtros desarrollada por Wilkinson (41). Se utilizaron filtros Gelman (Versapor 3000, Gelman Sciences Inc. Ann. Harbor MI) de 3 micras de tamaño de poro. El compartimiento inferior de cada cámara contenía sólo el material de prueba diluido en solución de Gey (1:2) y fue llevado a un volumen final de 5 ml. El compartimiento superior de cada cámara contenía 0.25 ml. de una suspensión de células de bazo o sangre periférica a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en solución de Gey. Las cámaras se incubaron por tres horas a 37 C. Después de la incubación las cámaras se desensamblaron y los filtros se fijaron con etanol absoluto, siguiéndose el siguiente proceso de tinción: Agua destilada (1 min), hematoxilina (25 seg), agua destilada (1 min), agua corriente (10 min), etanol al 70% (2 min), etanol al 95% (3 min), mezcla de etanol al 80% y butanol al



20% (5 min), y xilol (10 min). (41,42). Para la medición cuantitativa, se utilizó el método de conteo de la superficie inferior de los filtros y se contó el número total de células que migraron en cada filtro. Se registraron los promedios de al menos dos determinaciones por triplicado en cada experimento.

*Pruebas cruzadas (checkerboard assays).* Para detectar si la actividad encontrada en los sobrenadantes de 6 horas era quimiotáctica o quimiocinética se desarrollaron pruebas cruzadas en gradientes. Los sobrenadantes de 6 horas se colocaron sólo en el compartimiento inferior (gradiente positivo del factor quimiotáctico), en ambos compartimientos (ausencia de gradiente), o sólo en el compartimiento superior (gradiente negativo) de acuerdo al método del "checkerboard assay" desarrollado por Zigmond y Hirsch (31).

*Esquema de Inmunización.* Para determinar si la inmunización con el antígeno tenía alguna influencia sobre la respuesta de células de bazo al factor quimiotáctico, se inocularon ratas Wistar bajo el siguiente esquema de inmunización, administrando el antígeno por la vía intraperitoneal: Día 0, 1 ml. de ECa ( $10^8$ ) en Adyuvante Completo de Freund; día 15, 1 ml. de ECa ( $10^8$ ); día 25, 1 ml. de ECa ( $10^8$ ); día 29, se utilizaron células de bazo de estas ratas para pruebas de quimiotáxis previa demostración de la presencia de actividad hemolítica en los sueros de estos animales mediante una prueba directa de hemólisis con el mismo antígeno.

*Determinación de la viabilidad celular.* La viabilidad de las células utilizadas en todos los experimentos fue superior al 95 %. La viabilidad fue determinada por el método de exclusión del azul tripano (43).

*Susceptibilidad a enzimas.* Los sobrenadantes de 6 horas provenientes de cultivos de macrófagos estimulados con eritrocitos de carnero se trataron con tripsina (1 mg/ml, SIGMA Chemical St. Louis MO, EC. 3.4.21.4, tipo I), quimiotripsina (1 mg/ml, SIGMA, EC. 3.4.21.1, tipo I-S), o ribonucleasa (4U/ml, SIGMA, tipo X-A), por 3 horas a 37 °C; dichos sobrenadantes fueron también tratados con papaína (1 mg/ml, SIGMA, EC. 3.4.22.2., tipo III) y con papaína más urea 8M por una hora a 37 °C (44).

*Estabilidad al calor.* Se determinó la estabilidad de los sobrenadantes de 6 horas de macrófagos estimulados antigénicamente, a 56 °C/30', 70 °C/30' y 100 °C/10' (45).

*Efecto de la actinomicina D en la producción del factor quimiotáctico.* Algunos cultivos de macrófagos se trataron con actinomicina D (1 µg/ml, Pharmacia) por una hora a 37 °C y luego se incubaron con eritrocitos de carnero (10<sup>6</sup>) por 6 horas. Los sobrenadantes de estos cultivos se colectaron y se utilizaron para pruebas de actividad quimiotáctica (45).

*Estimulación con LPS.* Se trataron macrófagos peritoneales con lipopolisacárido (10 µg/ml, SIGMA, de *E. coli* 0111:B4) por 6 horas a 37 °C. Posteriormente se colectaron los sobrenadantes y

incubaron a 4 C/30'. Posteriormente los cultivos se lavaron 2 veces con solución de Gey y se les añadió suero de cobayo al 10 %. Los cultivos se incubaron a 37 C/45' y se lavaron 3 veces con la solución de Gey. Finalmente se les añadieron eritrocitos de carnero y se colectaron los sobrenadantes de 6 horas.

*Presentación y análisis de los datos.* Los resultados obtenidos en este estudio representan la media +/- el error estándar de la media de al menos dos determinaciones por triplicado. Se utilizó la prueba F y la prueba t para determinar la significancia estadística de las diferencias observadas en algunos experimentos.

## RESULTADOS

*Producción de sobrenadantes con actividad quimiotáctica.* Los resultados que se muestran en la Figura 1 indican que los macrófagos estimulados *in vitro* con ECa, producen sobrenadantes con actividad quimiotáctica a las 6 y 24 horas después de la estimulación. Resultados similares se obtuvieron cuando se usaron células de sangre periférica como blanco de la actividad quimiotáctica. La única diferencia observada fué que éstas células respondían mejor que las células de bazo a los sobrenadantes de 24 horas (Fig. 2):

*Células blanco de los sobrenadantes con actividad quimiotáctica.* Las principales células respondedoras a los sobrenadantes de 6 horas fueron linfocitos pequeños ( $6\mu$ ), mientras que los neutrófilos también respondieron significativamente a los sobrenadantes de 24 horas (Figs. 2 y 3). En la figura 4 se muestran respuestas de migración de células de bazo a los sobrenadantes de 6 y 24 horas y hacia la solución de Gey. Observamos una mayor respuesta de migración hacia el sobrenadante de 6 horas comparada con el sobrenadante de 24 horas y la solución de Gey. Por otra parte, nuestros experimentos sugieren que las células T son probablemente las principales células blanco hacia el factor quimiotáctico de los sobrenadantes de 6 horas dado que células de bazo de ratas desnudas (nu/nu) no respondieron a este sobrenadante mientras que sus padres heterocigotos si lo hicieron (Fig. 5). La respuesta de nu/+ al sobrenadante de 6 horas fué significativamente mayor que al sobrenadante de 6 horas de

macrófagos incubados con solución de Gey ( $P < 0.01$ ) o a la solución de Gey ( $P < 0.001$ ). La respuesta de nu/+ a cualquier tratamiento fué mayor que la respuesta de nu/nu ( $P < 0.01$ ). Todas las demás diferencias entre grupos experimentales no alcanzaron significancia estadística con una  $P = 0.05$ .

*Dependencia antigénica para producir sobrenadantes con actividad quimiotáctica.* Se demostró también la dependencia antigénica en los cultivos de macrófagos para producir sustancias con actividad quimiotáctica hacia linfocitos. La Figura 6 muestra respuestas de migración de células de bazo de ratas inmunizadas *in vivo* con ECa hacia el sobrenadante de 6 horas proveniente de macrófagos estimulados *in vitro* con ECa (1A) o de macrófagos no estimulados (1B) y las respuestas de células de bazo de ratas no sensibilizadas hacia sobrenadantes de 6 horas proveniente de macrófagos estimulados *in vitro* (2A) o de macrófagos no estimulados (2B). Como se puede observar sólo los sobrenadantes provenientes de macrófagos estimulados *in vitro* produjeron actividad quimiotáctica. No hubo diferencia en la respuesta hacia el estímulo quimiotáctico de las células linfoides de animales inmunizados o no. Las diferencias entre los grupos 1A o 2A con los grupos 1B, 2B o solución de Gey fueron significativas con una  $P = 0.05$ .

*Caracterización parcial de sobrenadantes de 6 horas con actividad quimiotáctica.* El producto activo en los sobrenadantes de 6 horas parece ser una proteína, la cual es susceptible a varias enzimas como tripsina, quimiotripsina y

papaína y es inestable a 70 °C/30' y 100 °C/10'. La tabla I muestra las diferencias observadas entre las respuestas de migración hacia el material de prueba más tratamiento y controles sin tratamiento. Los resultados mostrados corresponden al porcentaje de reducción de la actividad comparando muestras del mismo lote del sobrenadante. La adición de actinomicina D a los cultivos de macrófagos antes de la estimulación con ECa, inhibió la producción del factor de las 6 horas, indicando que su producción depende de síntesis activa de proteínas bajo estímulo antigénico. El tratamiento con lipopolisacárido no estimula la producción del componente activo en los sobrenadantes de 6 horas (Tabla II).

Hemos llevado a cabo corrimientos electroforéticos con y sin DodecilSulfato de Sodio y hemos encontrado una proteína de aproximadamente 17,000 daltones presente sólo en los sobrenadantes de 6 horas de macrófagos estimulados por 6 horas con ECa. (Fig. 7).

*Pruebas de tablero (Checkerboard assays).* Como se muestra en la Fig. 8, se demostró actividad quimiotáctica en pruebas de gradientes. La mayor respuesta de migración de células de bazo se encontró en gradientes positivos, mientras que las respuestas hacia el gradiente negativo o en ausencia de este, fueron comparativamente menores. Todas las diferencias entre grupos experimentales tuvieron significancia estadística con una  $P < 0.01$ .

Demostración de los macrófagos como las células productoras del factor quimiotáctico de las 6 horas. En la tabla III se puede apreciar que el tratamiento de células adherentes de exudado peritoneal con anticuerpos anti células T y B no tiene ningún efecto sobre la producción del factor quimiotáctico de las 6 horas, sugiriendo que los macrófagos son la fuente de dicho factor. En ésta tabla se puede también observar las respuestas de migración de células de bazo hacia sobrenadantes de 6 horas de cultivos de macrófagos de ratas Wistar o nu/nu incubados con ECa. Además se puede apreciar la respuesta de migración hacia suero de cobayo al 10 % y hacia solución de Gey. Los tratamientos A, B o C mostraron diferencias significativas con respecto a los tratamientos E o D con una  $P = 0.05$ . Todas las demás diferencias entre tratamientos no alcanzaron significancia estadística con una  $P = 0.05$ .

62911

## DISCUSION

Se ha demostrado previamente (47,48) que las células T activadas pueden producir sustancias quimiotácticas para macrófagos de modo que la interacción linfocito-macrófago se facilite.

Nuestros experimentos se diseñaron para demostrar el efecto opuesto, es decir, que los macrófagos producen algún (os) factor (es) quimiotáctico (s) para linfocitos T después de un estímulo antigénico en la etapa temprana de la respuesta inmune.

Las células adherentes de exudado peritoneal produjeron al menos dos sustancias (S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub>) las cuales atraen linfocitos. S<sub>1</sub> se produce 6 horas después de estímulo antigénico, mientras que S<sub>2</sub> se produce luego de 24 horas de estimulación.

La sustancia producida a las 24 horas podría ser interleucina-1 (IL-1), una molécula bien estudiada por Miossecc y otros (9,10,13,14,44) la cual tiene actividad quimiotáctica para linfocitos, neutrófilos y monocitos.

Este hecho hizo enfocar nuestra atención al factor de las 6 horas debido a que no ha sido reportado aún.

Las células de bazo respondieron bien a los sobrenadantes de 6 horas, mientras que las células de sangre periférica también respondieron a los sobrenadantes de 24 y 25 horas. Parece haber una selección de las células para responder a dichos sobrenadantes, ya que nosotros encontramos que linfocitos pequeños (6 $\mu$ ) responden preferencialmente a los sobrenadantes de 6 horas, mientras que neutrófilos respondieron en forma significativa a los sobrenadantes de 24



horas. La presencia de al menos dos sustancias producidas en diferentes etapas de la respuesta inmune pueden promover respuestas de migración de diferentes células.

La sustancia producida a las 6 horas parece estimular sólo a células T ya que las células de ratas desnudas (nu/nu) no respondieron al tratamiento, mientras que las de sus padres (nu/+) sí lo hicieron.

Por otro lado, parece ser que los macrófagos son los responsables de producir la sustancia quimiotáctica de las 6 horas ya que células adherentes de exudado peritoneal tratadas con anticuerpos monoclonales anti células T y B continúan produciendo dicha sustancia. Otra evidencia es que las células adherentes de ratas nu/nu (carentes de timo y por tanto de linfocitos T) producen sobrenadantes de 6 horas con actividad quimiotáctica, después de estímulo antigénico.

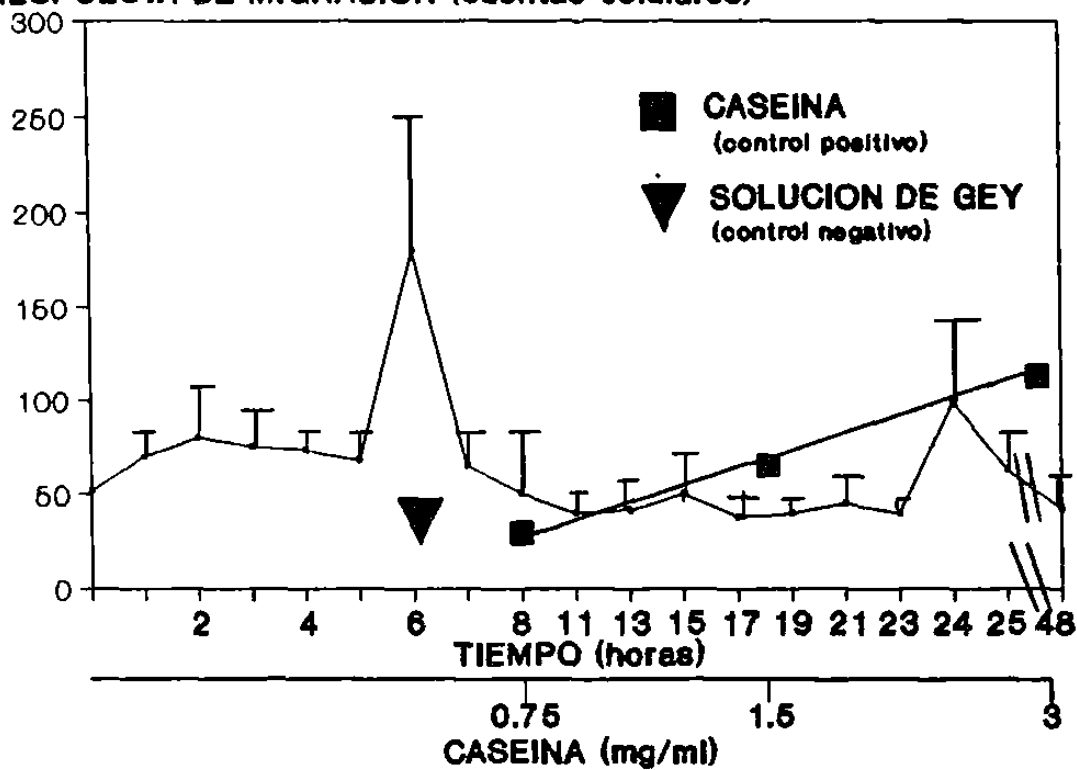
Otro aspecto importante de este trabajo fué demostrar si el factor responsable de la actividad quimiotáctica en los sobrenadantes de 6 horas, era IL-1. La caracterización parcial ha mostrado una alta susceptibilidad a la digestión por tripsina, quimiotripsina y papaína, estos datos no concuerdan con aquellos reportados para interleucina-1, la cual es relativamente resistente al tratamiento con estas enzimas (44). Más aún nuestra sustancia no es producida bajo estimulación mitogénica utilizando LPS el cual es un potente inductor de IL-1. La única característica en común es que los pesos moleculares de la IL-1 y de nuestra sustancia son similares, la IL-1 murina y humana pesa 17,450 daltones (49), mientras que nuestra sustancia pesa aproximadamente 17,000

daltones.

Se concluye que las células adherentes de exudado peritoneal (macrófagos), produjeron una sustancia quimiotáctica en la etapa temprana de la respuesta inmune (sobrenadantes de 6 horas), cuyo blanco probable son los linfocitos T. Esta sustancia podría jugar un papel en la activación inicial de la respuesta inmune y puede ser responsable de la acumulación específica de linfocitos T en los órganos periféricos después de un reto antigénico. Esta molécula no tiene efectos específicos de antígeno debido a que células sensibles al antígeno y no sensibles responden de la misma manera a esta sustancia. Es necesario establecer si ésta sustancia también colabora en la activación de células T.

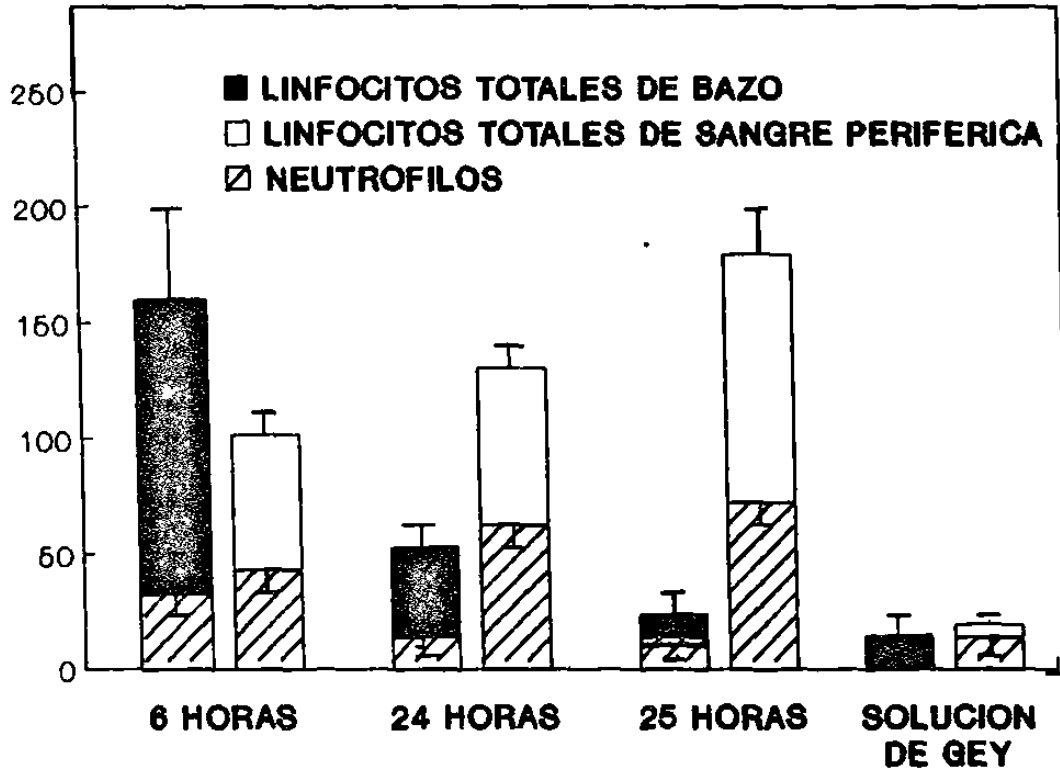
FIGURA 1

RESPUESTA DE MIGRACION (cuentas celulares)

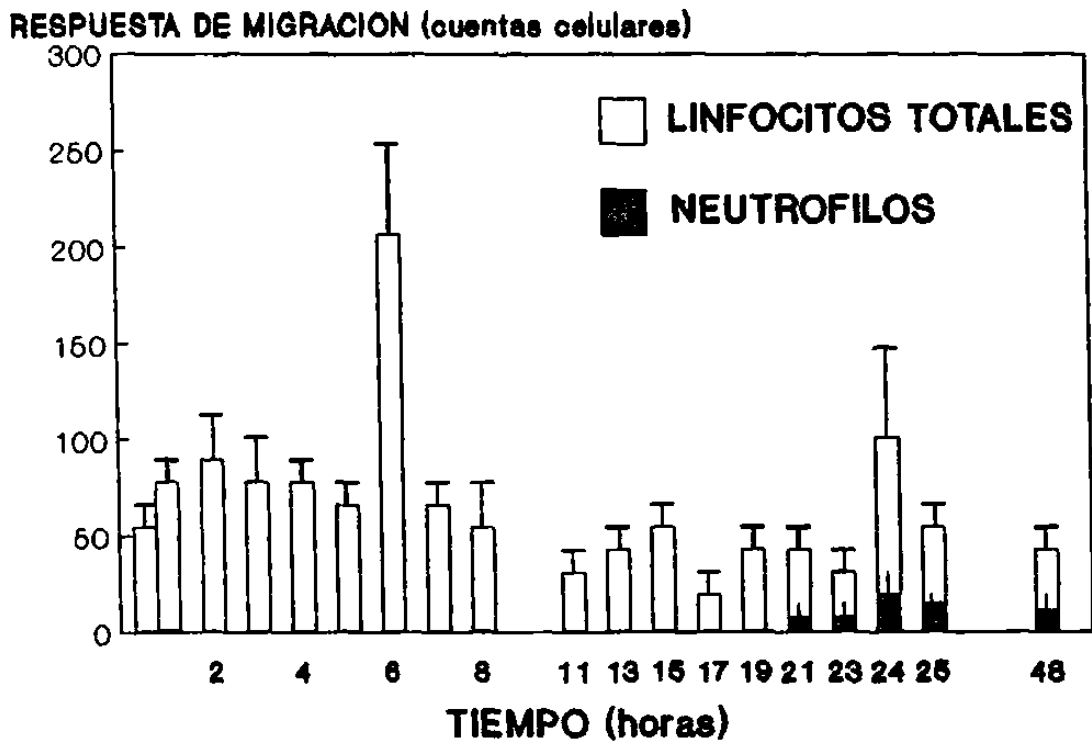


**FIGURA 2**

**RESPUESTA DE MIGRACION (cuentas celulares)**



**FIGURA 3**

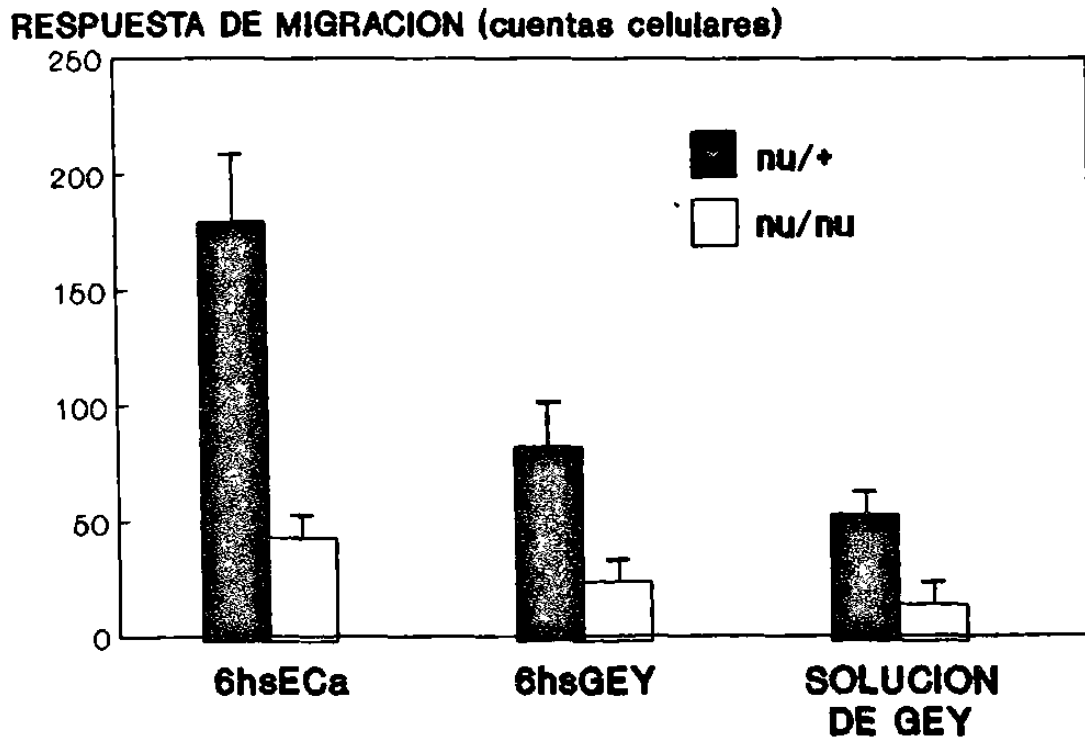


# FIGURA 4



- A ECa-6hs
- B ECa-24hs
- C Solución de Gey

FIGURA 5



**FIGURA 6**

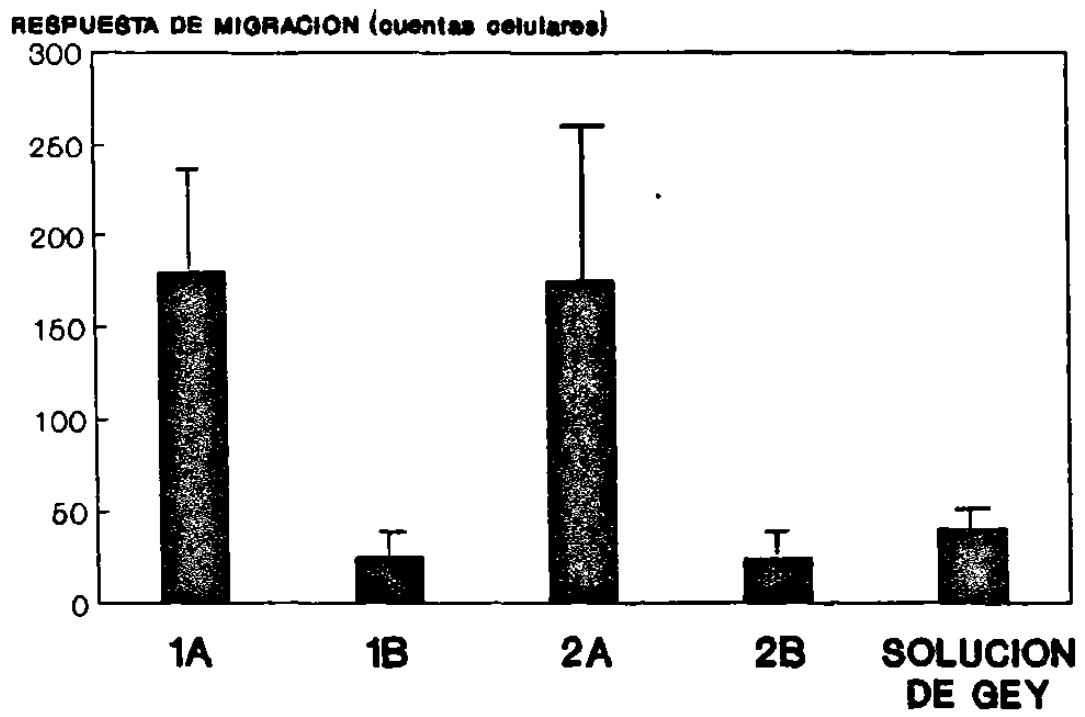
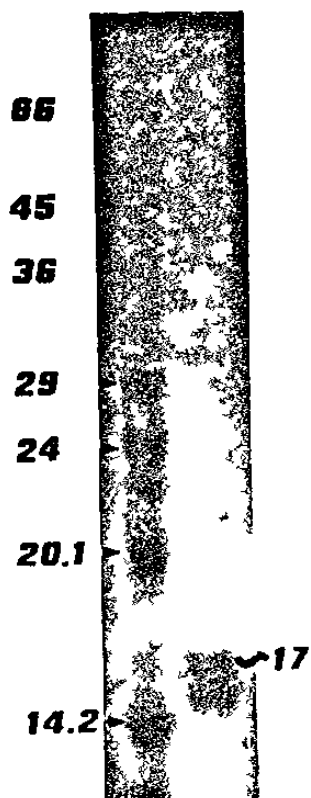


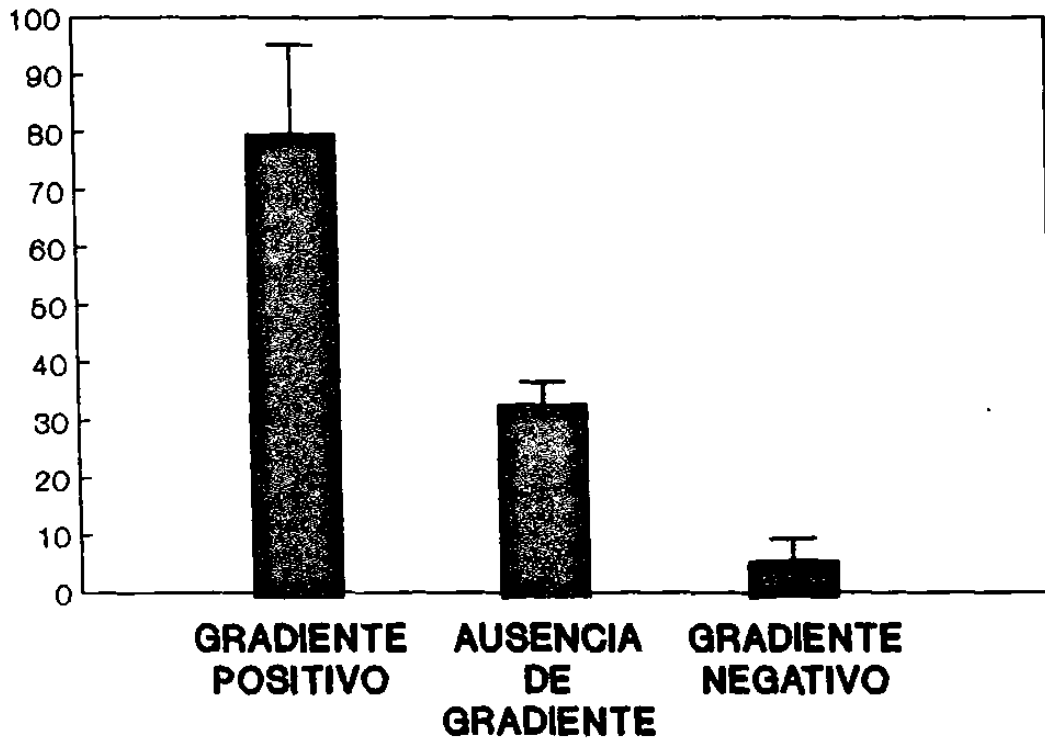


FIGURA 7



**FIGURA 8**

**RESPUESTA DE MIGRACION (cuentas celulares)**



**TABLA I**

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>REDUCCION DE LA ACTIVIDAD (%)</b>
<b>TRIPSINA</b>	<b>95</b>
<b>QUIMIOTRIPSINA</b>	<b>95</b>
<b>RNasa</b>	<b>0</b>
<b>PAPAINA</b>	<b>70</b>
<b>PAPAINA + UREA 8M</b>	<b>70</b>
<b>56 °C/30'</b>	<b>1</b>
<b>70 °C/30'</b>	<b>70</b>
<b>100 °C/10'</b>	<b>93</b>

**TABLA II**

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>RESPUESTA DE MIGRACION (cuentas celulares)</b>
<b>ECa-6hs</b>	<b>140 ± 27</b>
<b>ACTINOMICINA D<sup>*</sup> + ECa</b>	<b>57 ± 13</b>
<b>LPS-6hs</b>	<b>45 ± 11</b>
<b>SOLUCION DE GEY</b>	<b>74 ± 2</b>

<sup>\*</sup> Se cultivaron macrofagos previamente con actinomicina D por 1 hora e inmediatamente se incubaron con ECa por 6 horas.

**TABLA III**

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>RESPUESTA DE MIGRACION (cuentas celulares)</b>
<b>A Anti-células T/B</b>	<b>44 +/- 10</b>
<b>B ECa-6hs</b>	<b>57 +/- 10</b>
<b>C Nu/nu-6hs</b>	<b>55 +/- 24</b>
<b>D Suero de cobayo</b>	<b>9 +/- 5</b>
<b>E Solución de Gey</b>	<b>18 +/- 13</b>

## BIBLIOGRAFIA

1. Gordon, S., Unkeless, J., Z.A. Cohn. 1974. Induction of macrophage plasminogen activator by endotoxin stimulation and phagocytosis. Evidence for a two-stage process. *J. Exp. Med.* 104:995.
2. Werb, Z., S. Gordon. 1975. Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. *J. Exp. Med.* 142:346.
3. Werb, Z., S. Gordon. 1975. Elastase secretion by stimulated macrophages. *J. Exp. Med.* 142:361.
4. Colten, H.R. 1974. Biosynthesis of serum complement, in Brent L, Holborow J (eds): *Progress in Immunology*, Amsterdam, North-Holland, Publishing Company, pp 183.
5. Smith, T.J., R.R, Wagner. 1967. Rabbit macrophages interferons. I. Conditions for biosynthesis by virus-infected and uninfected cells. *J. Exp. Med.* 125:559.
6. Gordon, S., Todd, J., Z.A, Cohn. 1974. *In vitro* synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 139:1228.
7. Gery, I., Gershon, R.K., B.H, Waskman. 1972. Potentiation of the T lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. *J. Exp. Med.* 136:128.
8. Calderon, J., E.R, Unanue. 1975. Two Biological activities regulating cell proliferation found in cultures of peritoneal exudate cells. *Nature (Washington)*. 253:359.
9. Miossec, P., Yu-Cha, L., M. Ziff. 1984. Lymphocyte chemotactic activity of human interleukin-1. *J. Immunol.* 133:2007.
10. Sauder, D.N., Movnessa, N.L., Katz, S.I, Dinarello, C.A, J.I, Gallin. 1984. Chemotactic cytokines: the role of leukocytic

pyrogen and epidermal cell thymocyte-activating factor in neutrophil chemotaxis. *J. Immunol.* 132:828.

11. Rosenthal, A.S, Lipsky, P.E, E.M, Shevach. 1975. Macrophage-lymphocyte interaction and antigen recognition. *Fed. Proc.* 34:1743.
12. Ward, P.A., Remold, H.G, J.R. David. 1969. Leukotactic factor produced by sensitized lymphocytes. *Science.* 163:1079.
13. Granstein, R.D., Mizel, M.S, D.N, Sauder. 1985. *In vivo* chemotactic activity of epidermal cell-derived thymocyte activating factor (ETAf) and interleukin-1 in the mouse. *J. Leuk. Biol.* 37:709.
14. Luger, T.A, Charon, J.A, Colot, M., Micksche, M., J.J, Oppenheim. 1983. Chemotactic properties of partially purified human epidermal cell-derived thymocytes activating factor (ETAf) for polymorphonuclear cells. *J. Immunol.* 131:816.
15. Ward, P.A, Unanue, E.R, Gorainick, S.J, G.F, Schreiner. 1977. Chemotaxis of rat lymphocytes. *J. Immunol.* 119:416.
16. Cahill, R.N.P, Frost, H., Z. Trnka. 1976. The effects of recirculating lymphocytes through single lymph nodes. *J. Exp. Med.* 143:870.
17. Cutler, J.E. 1974. A simple *in vitro* method for studies on chemotaxis. *Proc. Soc. Exp. Med.* 147:471.
18. Ward, P.A, R.W, Yurt. 1985. Respuesta inflamatoria y papel del complemento. *Infectologia.* num.10:p.265.
19. Fishman, M., F.L. Adler. 1963. Antibody formation initiated *in vitro* . II Antibody synthesis in X-irradiated recipients of diffusion chambers containing nucleic acid derived from macrophages incubated with antigen. *J. Exp. Med.* 117:595.

- protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. J. Exp. Med. 167:570.
29. El-Naggar, A.K., Van Epps, D.E., R.C., Williams Jr. 1980. Human-B and T-lymphocyte locomotion in response to casein, C5a, and f-met-leu-phe. Cellular Immunology. 56:365.
30. Russell, R.J., Wilkinson, P.C., Sless, F., D.M.V., Parrot. 1975. Chemotaxis of lymphoblasts. Nature (London). 256:646.
31. Zigmond, S.H., J.G., Hirsh. 1973. Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. J.Exp.Med. 137:387.
32. Lipsky, P.E., A.S., Rosenthal. 1973. Macrophage -lymphocyte interaction. I. Characteristics of the antigen-independent binding of guinea pig thymocytes and lymphocytes to syngeneic macrophages. J.Exp.Med. 138:900.
33. Lopez, L.R., Vatter, A.E., D.W., Talmage. 1977. The requirement of viable thymocytes for species-specific attachment to and release from macrophages. J. Immunol. 119:1668.
34. Salvin, S.B., Sell, S., J. Nishio. 1971. Activity *in vitro* of lymphocytes and macrophages in delayed hypersensitivity. J. Immunol. 107:655.
35. Berman, L. 1966. Lymphocytes and macrophages *in vitro*. Their activities in relation to functions of small lymphocytes. Lab. Invest. 15:1084.
36. Mc Farland, W., D.H., Heilman. 1965. Lymphocyte foot appendage: Its role in lymphocyte function and immunological reactions. Nature (London). 205:887.
37. Siegel, I. 1970. Natural and antibody-induced adherence of



- guinea pig phagocytic cells to autologous and heterologous thymocytes. *J. Immunol.* 105:879.
38. Parrot, D.M.V., P.C., Wilkinson. 1981. Lymphocyte locomotion and migration. *Prog. Allergy.* 28:193.
39. Calderon, J., Kiely, J-M, Lefko, J.L, E.R. Unanue. 1975. The modulation of lymphocyte functions by molecules secreted by macrophages. Description and partial biochemical analysis. *J.Exp.Med.* 142:151.
40. Unanue, E.R., Kiely, J-M, J. Calderon. 1976. The modulation of lymphocyte functions by molecules secreted by macrophages. II. Conditions leading to increased secretion. *J.Exp.Med.* 144:155.
41. Wilkinson, P.C. 1977. Neutrophil leukocyte function tests, in Thompson RA (ed): *Techniques in Clinical Immunology*, Oxford, Blackwell Scientific Publications, p 201.
42. Ward, P.A., Offen, C.D., J.R Motgomery. 1971. Chemoattractants of leukocytes, with special reference to lymphocytes. *Fed. Proc.* 30:1721.
43. Mishell, B.B, Shiigi, S.M., Henry, C., Chan, E.L., North, J., Gallily, R., Slomich, M., Miller, K., Marbrook, J., Parks, D., A.H. Good. 1980. Preparations of mouse cell suspensions, in Mishell BB, Shiigi SM (eds): *Selected Methods in Cellular Immunology*, San Francisco, Freeman WH and Company, p. 3.
44. Mizel, S.B.. 1982. Interleukin 1 and T cell activation. *Immunol. Rev.* 63:51.
45. Takeda, Y., Shimada S., Sugimoto M., Woo H.J., Higuchi M., T. Osawa. 1985. Purification and characterization of a cytotoxic factor produced by a mouse macrophage hybridoma. *Cell. Immunol.* 96:277.

46. Laemli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680.
47. Ward, P.A., R.W. Yurt. 1985. Respuesta Inflamatoria y papel del complemento. *Infectologia*, año V, Num.10, p.265.
48. Unanue, E.R. 1976. Secretory function of mononuclear phagocytes. *Am. J. Pathol.* 83:396.
49. Hopp, T.P., Dower, S.K., C.J. March. 1986. The molecular forms of interleukin-1. *Immunol. Res.* 5:271.



