

1986 B

CODIGO 078261757

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y AMBIENTALES
BIOLOGIA



"EFECTO DEL PERYODATO DE SODIO SOBRE LOS LISOSOMAS
DE LOS MACROFAGOS DEL RATON".

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

HECTOR MANUEL DE ALBA ESQUIVIAS

GUADALAJARA, JAL.

MARZO 1996



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

00182/96

**C. HECTOR M. DE ALBA ESQUIVIAS
PRESENTE . .**

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "EFECTO DEL PERIODATO DE SODIO SOBRE LOS LISOSOMAS DE LOS MACROFAGOS DEL RATON" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha tesis la M.C. Ana María Puebla Pérez.

**ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jal., 04 de Marzo de 1996
EL DIRECTOR

M.C. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ

EL SECRETARIO

OCEAN. SALVADOR VELAZQUEZ MAGAÑA

c.c.p.- M.C. Ana María Puebla Pérez.- Director de Tesis.- pte.
c.c.p.- El expediente del alumno.

AEIR/SVM/mahs*

C.U.C.B.A.



**DIV. DE CS
BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES**

C. M. C. Alfonso Islas Rodríguez
Director de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales
de la Universidad de Guadalajara.

PRESENTE.

Por este conducto me permito solicitar a Usted se corran los tramites necesarios para el registro de mi anteproyecto de tesis titulado: "EFECTO DEL PERYODATO DE SODIO SOBRE LOS LISOSOMAS DE LOS MACROFAGOS DEL RATÓN" (ANEXO).

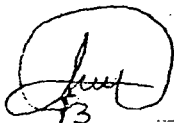
A su mismo pongo a su consideración a C. M. C. Ana María Puebla Pérez como Directora (a) de tesis.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para reiterarle mi consideración mas distinguida.

ATENTAMENTE

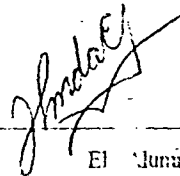
Guadalajara Jalisco 15 de Enero de 1996

No. Bo.



El Director

M.C. Ana María Puebla Pérez



El Jefe

Héctor M. De Alba Esquivias

EXCLUSIVO COMISIÓN DE TESIS

SINODALES

FIRMA ENTERADO Y APROBADO

FECHA

1.- ARTURO OROZCO BAROCTO



14/02/96

2.- GALINA ZAITSEVA PETROVNA



14/02/96

3.- OSWALDO PALACIOS RIVERA



29/02/96

ROS MARIA DOMINGUEZ ARIAS

C. M.C. Alfonso Islas Rodríguez
Director de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales
de la Universidad de Guadalajara.

PRESENTE.

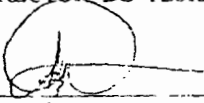
Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el (la) pasante C. BÉTOR MANUEL DE ALBA ESQUIVIAS, código número 78261757, con el título "EFECTO DEL PERIODATO DE SODIO SOBRE LOS LISOSOMAS DE LOS MACROFAGOS DEL RATÓN", consideramos que reúne los méritos necesarios para la impresión de la misma y la realización de los exámenes profesionales respectivos.

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

ATENTAMENTE

Cuadalajara, Jal. A 29 de Febrero de 1996.

EL DIRECTOR DE TESIS



M. en C. Ana María Puebla Pérez

SINODALES

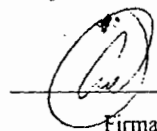
1.- Mra. Galina Tatiana Pedraza

Nombre completo


Firma

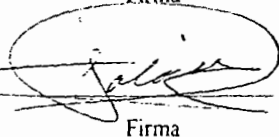
2.- Arturo Orozco Barrera

Nombre completo


Firma

3.- Bernaldo Sigifredo Palacios

Nombre completo


Firma

AGRADECIMIENTOS

- A Dios por permitirme cumplir con este propósito.
- A mis padres, hermanos y familiares políticos que siempre me brindaron su ayuda para llegar a esta meta.
- A la M.C. Ana María Puebla Pérez quien dirigió esta tesis acertadamente aportando valiosas sugerencias, además de una amistad incondicional.
- Al M.C. Arturo Orozco Barocio por su gran ayuda, orientación y aportaciones a este trabajo y aun mas por ser un amigo de verdad.
- A la Dra. Galina Zaitzeva P. y al M.C. Oswaldo Palacios R. quienes fungieron como sinodales e hicieron acertadas sugerencias a esta tesis.
- Al M.C. Pedro Méndez G. y al M.C. Miguel Cházaro B. quienes me transmitieron la motivación y el entusiasmo necesarios para cumplir con este objetivo.
- A Oscar E. Aguirre C. y Andres Castañeda C. por su valiosa cooperación en la transcripción del texto.

DEDICATORIA

A mi esposa María y a mis hijos Misael y José Manuel quienes representan para mi la razón, la dedicación, el compromiso y la motivación para cumplir con todo objetivo.

CONTENIDO

	pag.
Agradecimientos-----	
Dedicatoria-----	
Contenido-----	1
Introducción-----	2
Antecedentes-----	4
Planteamiento del problema-----	10
Hipotesis-----	11
Objetivo general-----	12
Materiales y Metodos-----	13
Resultados-----	20
Cuadro I-----	23
Figura I-----	23 a
Discusión-----	24
Conclusiones-----	27
Breviario-----	28
Bibliografía-----	29

I N T R O D U C C I O N

Se ha informado que el peryodato de sodio (NaIO_4), que es un agente oxidante, estimula in vitro la proliferación de los linfocitos T, de manera semejante a la que causan algunos antígenos específicos o mitógenos inespecíficos como la concanavalina-A (Con-A). El mecanismo de acción mitogénica del NaIO_4 parece radicar en que causa la oxidación de los oxidrilos vecinos del ácido N-acetil-neuramínico de la galactosa y de la galactosamina de algunas de las glucoproteínas superficiales de los linfocitos¹⁻⁸. Sin embargo, para que ocurra la estimulación mitogénica del NaIO_4 sobre los linfocitos, se requiere de la presencia de otras células fagocíticas como los monocitos/macrófagos⁹⁻¹¹. En este trabajo se investigó el efecto del NaIO_4 y otros agentes como el nitrito de sodio (NaNO_2), la nitroglicerina (NG) y la concanavalina-A (Con-A) sobre los macrófagos. Para ello, inyectamos a grupos de 10 ratones BALB/c con 0.5 mg de NaIO_4 , 3 mg de NaNO_2 , 0.4 mg de nitroglicerina y 0.5 mg de Con-A por vía intraperitoneal.

A las 48 horas después se obtuvieron los macrófagos por lavado peritoneal y su grado de activación se evaluó por el aumento en la cantidad de lisosomas, medido espectrofotométricamente por la técnica del naranja de acridina, o por la actividad de la peroxidasa evaluada citoquímicamente.

Encontramos una correlación excelente entre el método del naranja de acridina y el de la peroxidasa. Los macrófagos se activaron en orden ascendente con el NaNO_2 , NG, Con-A y NaIO_4 .

Concluimos que los mitógenos linfocitarios como el NaIO_4 y la Con-A tienen un efecto activador de los macrófagos peritoneales en ratones.

A N T E C E D E N T E S

La complejidad que muestra el sistema inmunitario le permite llevar a cabo una gran cantidad de actividades tendientes a mantener la homeostasia y la salud en el organismo. Su funcionamiento es similar al del sistema endócrino ya que sus componentes circulantes son capaces de actuar en lugares distantes a su lugar de origen. Con una variedad relativamente pequeña de células integradas en una red bien comunicada, el sistema inmune puede llevar a cabo numerosas funciones como son disminuir o aumentar una respuesta dada dependiendo de las necesidades del organismo en ese momento, esto gracias al mecanismo regulador inmunitario. La preservación de la salud al evitar el daño que pueden causar agentes extraños como microorganismos patógenos e incluso células propias que hayan sufrido alguna transformación es muestra del funcionamiento normal del sistema inmunitario, lo contrario daría como resultado la enfermedad¹².

Por otro lado, es importante señalar que el sistema inmune posee componentes celulares, moleculares y genéticos; entre los primeros destacan los macrófagos y los linfocitos. Los macrófagos realizan diversas funciones en la respuesta inmune. Aunque se dice que no son específicos a un antígeno determinado, juegan un papel importante en la presentación del antígeno a los linfocitos, ya que

al parecer determinan cuales células T (linfocitos derivados del timo y partícipes en la respuesta inmune celular) serán las encargadas de responder al estímulo de diversos antígenos. Por otra parte los macrófagos también tienen la capacidad de incrementar o suprimir la división celular o la diferenciación, así como la magnitud y el tipo de respuesta tanto de linfocitos T como linfocitos B, esto debido a que secretan mediadores biológicamente activos. Debe destacarse finalmente que el macrófago es la principal célula fagocítica, lo cual le confiere una considerable importancia en el procesamiento del antígeno¹².

Se debe señalar también, que al hablar de fagocitos mononucleares se deben incluir a los monocitos circulantes en la sangre periférica, los promonocitos, las células precursoras en la médula ósea y los macrófagos histiocitos que se encuentran en diversos tejidos, órganos y cavidades serosas¹³.

Los macrófagos de los alvéolos pulmonares y de las cavidades peritoneal y pleural se derivan principalmente de los monocitos circulantes, sin embargo, bajo ciertas circunstancias, hay proliferación local. Las células de la serie de monocitos-macrófagos son activas para matar las bacterias, hongos y células tumorales¹³.

El termino "macrófago activado" fue introducido en la literatura y ampliamente empleado por Mackaness en la decada de los sesentas para describir la aumentada actividad microbicida de macrófagos de animales con inmunidad adquirida por infección por bacterias parásitas facultativas intracelulares¹⁴. Los macrófagos obtenidos de animales inmunizados por infección muestran una función aumentada cuando estas células son cultivadas in vitro. Tienden a desplegar mas sobre el vidrio, son mas adherentes, aumentan su capacidad fagocítica y muestran aumentada actividad bactericida inclusive contra microorganismos antigénicamente no emparentados con aquellos que han infectado al huésped. El estado de activación in vivo de los macrófagos, obtenidos de animales que están atravesando por una infección activa, puede ser simulado in vitro si se exponen los macrófagos a los monocitos de los individuos normales a los mediadores linfocitarios ¹⁵.

Recientemente se ha reportado la activación de macrófagos in-vivo e in-vitro inducida por el interferón gamma liberado por células de bazo de ratones portadores de tumor¹⁶, así como tambien algunos agentes que activan macrófagos in-vitro pero no in-vivo como la N-acetyl-cisteína ¹⁷.

In vitro, el NaIO₄ induce específicamente la proliferación de las células precursoras de los linfocitos T supresores (Ts)^{4,18}, a las que provoca un solo ciclo mitótico que se manifiesta dentro de las siguientes 4 a 48 horas después del estímulo, ya sea como incremento en la síntesis de DNA o de la actividad inmunosupresora de los linfocitos resultantes de esa proliferación⁵.

Las células Ts generadas por el peryodato de sodio son capaces de inhibir inespecíficamente la reactividad inmunológica de otros linfocitos T que ya hayan sido convertidos en efectores por estímulos antigénicos previos o simultáneos a la aplicación del peryodato de sodio^{5,18}.

No obstante, cabe mencionar que aunque la acción del peryodato parece ser muy bien conocida a nivel de las membranas celulares, los que son virtualmente desconocidos son los eventos intracelulares que conducen a las células estimuladas a entrar en mitosis. Así mismo, se desconoce en que radica el efecto permisivo de los macrófagos para que los linfocitos Ts tratados con peryodato puedan entrar en mitosis^{9,10,11,19}.

Las ventajas que presenta el peryodato de sodio cuando se le utiliza in vitro son :

- 1) Es selectivo para la estimulación de los linfocitos Ts.
- 2) Requiere de un tiempo breve de exposición de 10 a 30 min. para actuar sobre ellos .
- 3) Actúa sobre las células en las condiciones de cultivo.
- 4) Es un compuesto soluble y manejable, que permite utilizarlo a concentraciones conocidas para estudiar su mecanismo de acción en diferentes condiciones ambientales.
- 5) Su efecto puede ser suspendido por el simple lavado de las células o por neutralización con agentes reductores sin afectar la viabilidad celular.
- 6) Su concentración puede ser cuantificable en los líquidos extracelulares.
- 7) Su acción oxidativa sobre las células es cuantificable .
- 8) Es un compuesto estable, barato y de síntesis sencilla^{1,3,4,5,11,18}.

La blastogénesis inducida por el peryodato de sodio inhibe la respuesta de formación de anticuerpos in vitro a los inmunógenos usados.

Se había postulado que los linfocitos T estimulados por el peryodato podían actuar ya fuera sobre los linfocitos ayudantes o directamente sobre células B, inhibiéndoles su respuesta inmune in vitro ¹⁸. Recientemente se ha demostrado que el peryodato de sodio

induce la generación de linfocitos supresores que afecta la respuesta inmune in vitro²⁰. A pesar de todo esto, desconocemos las razones por las que no había sido probado su efecto in-vivo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se desconoce si el peryodato de sodio, así como otros agentes oxidantes activan los macrófagos in-vivo.

H I P O T E S I S

El peryodato de sodio activa los macrófagos pulmonares y peritoneales de ratones sanos de la cepa BALB/c.

OBJETIVO GENERAL

Investigar si el peryodato de sodio y otros agentes oxidantes como el nitrito de sodio, la nitroglicerina y la concanavalina-A producen aumento en el contenido lisosomal de los macrófagos peritoneales y alveolares de ratones BALB/c .

M A T E R I A L Y M E T O D O S

Plan general.- Se inyectaron ratones con NaIO_4 , Con-A, NaNO_2 , y NG, por vía intraperitoneal. A las 48 h después, se colectaron sus macrófagos peritoneales y su grado de activación se evaluó por medio de la cantidad de lisosomas que desarrollaron y por la cuantificación histoquímica de su contenido en peroxidasa.

Ratones.- Se utilizaron ratones machos BALB/c de 20 a 25 g. de peso, de ocho a doce semanas de edad, a los que se les proporcionó alimento comercial para roedores (Purina, México) y agua purificada para consumo voluntario. Con ellos se formaron seis grupos de 10 ratones cada uno.

Inyecciones intraperitoneales.- El primer grupo de ratones no fué inyectado, se tomo como control. El segundo grupo se inyectó sólo con 1 ml de solución de Hank a pH de 7.4 ya que fué el vehículo en el cual se disolvieron los reactivos. Al tercer grupo se le inyectó con 3.0 mg de NaNO_2 (Monterrey, México) disuelto en 1 ml de solución de Hank. Al cuarto grupo se le aplicó 0.4 mg de nitroglicerina (Sánchez, México). El quinto grupo fué inyectado con 500 microgramos de Con-A (Sigma, USA) disueltos en la misma solución. El sexto grupo de ratones recibió una dosis de 0.5 mg de NaIO_4 disuelto en 1 ml de solución de Hank a pH de 7.4 .

Marcaje de los lisosomas.- Para evaluar el grado de activación de los macrófagos, se consideró que estos desarrollan un mayor contenido de lisosomas a mayor grado de activación. Para cuantificar el número de lisosomas formados en los macrófagos activados se siguió el Método de Urban²¹. Este se basa en que los lisosomas son teñibles in vivo e in vitro con el naranja de acridina y que después de haber tomado el colorante pueden ser lisados y cuantificado el naranja de acridina, como un índice de activación.

Para esto a las 48 h después de haber inyectado a los ratones de los grupos anteriores, se les inyectó 1 ml de una solución al 0.05 % (p/v) de naranja de acridina (Sigma, USA) disuelto en la solución de Hank sin rojo fenol y aplicada por vía intraperitoneal.

Obtención de los macrófagos peritoneales.- Diez minutos después de la inyección del naranja de acridina, se inyectaron 5.0 ml de solución de Hank adicionada de 2.5 g (p/v) de albúmina humana (Albumex, México) y de 5.0 unidades de heparina pura (Sigma, México) por ml. Enseguida se dió masaje abdominal suave a los ratones por dos minutos para permitir que la solución se difundiera a toda la cavidad peritoneal. Enseguida los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se les drenó el líquido peritoneal. Este se depositó en tubos siliconizados para evitar la adherencia de las

células al vidrio, y protegidos de la luz para evitar la decoloración del naranja de acridina. Las células se lavaron tres veces en 60 volúmenes de solución de Hank por centrifugación a 500 G por 5 minutos para eliminar el naranja de acridina que no hubiera sido captado por las células y permaneciera en exceso en la solución. La viabilidad celular se evaluó por tinción con azul tripano al 0.1 % un minuto. Una alícuota de las células lavadas se tiñó con colorante de Wright para cuenta diferencial de las células. La suspensión de macrófagos se contó en una cámara cuantaglobulos y se estandarizó repetida en alícuotas de 2×10^6 células en 0.1 ml.

Cuantificación de la activación macrofágica con naranja de acridina. - Nos basamos en el método de Urban²¹ con algunas modificaciones. Los macrófagos peritoneales se observaron en un microscopio de luz ultravioleta para comprobar que habían captado el naranja de acridina. Enseguida, cada alícuota de 2×10^6 células se mezcló con 1.0 ml de una solución de desoxicolato de sodio (Difco, USA) al 0.1 % (p/v) durante 10 minutos para lizar las membranas celulares y liberar el naranja de acridina que se encontraba unido a los lisosomas. Las células así tratadas fueron nuevamente observadas al microscopio de fluorescencia para comprobar la degranulación lisosomal. Los tubos se centrifugaron a

5000 G por 10 minutos y los sobrenadantes se transfirieron a cubetas de cuarzo y su densidad óptica para el naranja de acridina se leyó a 495 nm en un espectrofotómetro (PMQ 3, Zeiss). Cada una de estas muestras se efectuó por duplicado o triplicado de cada ratón. Las lecturas se compararon contra las de soluciones de naranja de acridina de concentración conocida y contra blancos de reactivos.

Cuantificación citoquímica de la activación macrofágica por el contenido de peroxidasa. Para evaluar el contenido de peroxidasa de los macrófagos se siguió el método citoquímico de Kaplow²². Para esto, se depositaron 0.6 ml de la suspensión de macrófagos sobre cubreobjetos de vidrio y se incubaron 30 minutos a 37° C en cámara húmeda para permitir la adherencia de los macrófagos al vidrio. Enseguida, los cubreobjetos se lavaron suavemente con solución de Hank y se cubrieron con 0.6 ml de una solución de formol al 10 % con etanol por 1 minuto. Luego se cubrieron por 1 minuto con 0.6 ml de una solución de diclorhidrato de bencidina (Merck, México) al 0.3 % (p/v) disuelta en una mezcla de 100 ml de alcohol etílico al 30 % (v/v) adicionado de 1.5 ml de hidróxido de sodio (NaOH) 1.0 N, 0.7 ml de peróxido de hidrógeno al 3.0 % (v/v), 1.0 g de acetato de sodio, 1.0 g de sulfato de zinc al 3.8 % (p/v) y zafranina al 0.2 % (p/v). Enseguida, las preparaciones se enjuagaron con agua

destilada, se secaron y se montaron invertidos sobre portaobjetos. La intensidad de la reacción de la peroxidasa se evaluó en una escala de 0 a 4 puntos por cada macrófago de acuerdo a la cantidad de gránulos oscuros que contuvieron, de acuerdo al criterio establecido²². De cada caso se hicieron dos lecturas de 100 células por dos observadores independientes y los resultados de ambos se promediaron. Así, si la activación de la peroxidasa en las 100 células hubiera sido la máxima de 4 puntos, la lectura hubiera sido de 400 puntos. El grado de activación de la enzima se expresó como un valor dentro de esos límites de 0 a 400 puntos.

Obtención de macrófagos pulmonares. Después de sacrificados los ratones, se les disecó la tráquea y por ella se instiló 1.6 ml de una solución al 0.5 % (p/v) de naranja de acridina disuelta en solución de Hank sin rojo fenol, se dió masaje pulmonar suave a través de la pared torácica por 1 minuto y luego se recuperó la solución instilada. Los macrófagos pulmonares que se obtuvieron se procesaron de manera semejante a los peritoneales para la determinación de su grado de activación, mediante el naranja de acridina y de la peroxidasa.

Otras pruebas. En otros grupos adicionales de 5 ratones cada uno se investigó el desarrollo de la activación de los macrófagos

peritoneales y pulmonares a las 8, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 horas de la aplicación subcutánea de dichos reactivos. Se observó la evolución de las poblaciones celulares que aparecían en el líquido peritoneal. Además, se investigó si la inyección intraperitoneal de los reactivos causaba estimulación de los macrófagos pulmonares y si las inyecciones subcutaneas de ellos causarían la activación de los macrófagos peritoneales y pulmonares.

A N A L I S I S E S T A D I S T I C O

Los resultados fueron analizados mediante la prueba "t" de Student para experimentos apareados y entre grupos por ANOVA.

RESULTADOS

Las observaciones seriadas de las células peritoneales después de las inyecciones de los diferentes reactivos permitieron comprobar que el fenómeno de activación macrofágica evoluciona progresivamente hasta llegar a un máximo entre las 24 horas (h) y decrece entre las 72 y 96 h. Entre las 12 y 24 h después de las inyecciones el contenido peritoneal contuvo entre 30 y 40 % de leucocitos polimorfonucleares y del 60 al 70 % mononucleares (macrófagos). A las 48 h, los polimorfonucleares se habían reducido a menos del 10 % y los macrófagos fueron mas del 90 %, por lo que la cuantificación de la actividad macrofágica decidimos efectuarla a las 48 h posteriores a la inyección de los reactivos.

Los lisosomas de los macrófagos y de los polimorfonucleares captaron el naranja de acridina y fluorescieron en color anaranjado. La cantidad de lisosomas fluorescentes se correlacionó ópticamente con el grado de activación macrofágica y con las lecturas espectrofotométricas de la captación del naranja de acridina. No se observaron otras estructuras intracitoplasmáticas que se tiñeran con este colorante.

Los resultados del grado de activación de los macrófagos peritoneales por el incremento en el desarrollo de lisosomas fue evaluado por la captación del naranja de acridina y por el contenido de peroxidasa y se resume en el Cuadro y Figura I. En el puede verse que los macrófagos activados por los diferentes reactivos captaron en orden ascendente las siguientes cantidades de naranja de acridina expresada en microgramos (μg): NaNO_2 4.14 ± 0.6 , NG 7.23 ± 1.26 , Con-A 7.33 ± 1.25 , NaIO_4 9.0 ± 0.95 .

Los macrófagos peritoneales de los ratones inyectados con solución de Hank dieron valores de 2.87 ± 0.65 . Los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal en reposo, que no habían sido inyectados con ningún reactivo dieron un valor de 1.69 ± 0.82 microgramos de naranja de acridina.

Por otra parte, la inyección intraperitoneal de los reactivos, ninguno de ellos causó activación de los macrófagos alveolares, ni en cortos tiempos, ni en largos. Tampoco la inyección subcutánea causó activación de los macrófagos peritoneales ni de los pulmonares.

Los resultados del grado de activación de los macrófagos peritoneales evaluados por la cantidad de peroxidasa aparecen también en el Cuadro y Figura I.

En el Cuadro I se observa que los macrófagos activados por los diferentes reactivos presentaron el mismo comportamiento, es decir cantidades ascendentes: NaNO_2 57.9 ± 24.6 ; NG 147.9 ± 27.5 ; Con-A 175.6 ± 20.27 ; NaIO_4 231 ± 23.3 . Los macrófagos de los ratones inyectados con solución de Hank dieron valores de 0.5 ± 1.26 . Los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal en reposo, que no habían sido inyectados con ningún reactivo dieron valores de 0.4 ± 0.69 . Estos valores corresponden a la escala de 0 a 400 puntos de peroxidasa.

El analisis estadístico mostró diferencial altamente significativa (p 0.001) por la "t" de Student como por el análisis entre grupos (ANOVA).

En la Figura I puede apreciarse que hubo una excelente correlación entre los grados de activación valorados por naranja de acridina y peroxidasa.

CUADRO I

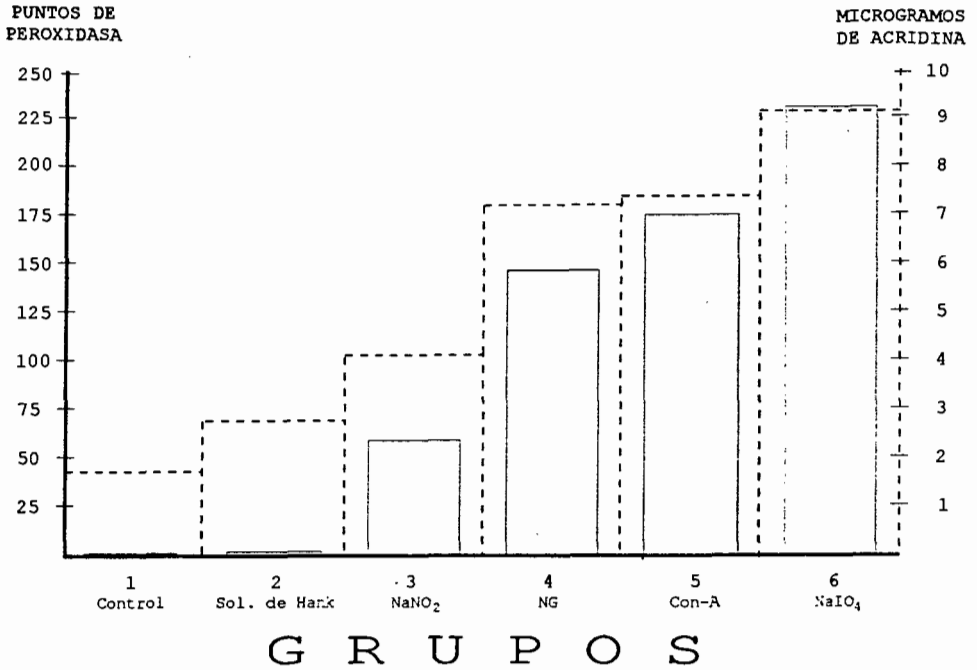
Resultado de la activación de los macrófagos peritoneales de los ratones BALE/c con diferentes reactivos inyectados 48 h antes por vía intraperitoneal. La activación se cuantificó por la cantidad de lisosomas que desarrollaron los macrófagos, evaluada por la técnica de naranja de acridina (NA) y por la técnica de la peroxidasa (PO).

Resultados (X+S)

Grupo	Reactivo	N.A. (ug)	PO
1	Ninguno	1.69 \pm 0.82	0.4 \pm 0.69
2	Solución de Hank	2.87 \pm 0.65	0.5 \pm 1.26
3	NaNO ₂	4.16 \pm 0.6	57.9 \pm 24.64
4	Nitroglicerina	7.23 \pm 1.26	147.9 \pm 27.5
5	Concanavalina-A	7.33 \pm 1.25	175.6 \pm 20.27
6	NaIO ₄	9.03 \pm 0.95	231.2 \pm 23.3

Cada grupo fue de 10 ratones. Los valores de NA representan microgramos de colorante fijado en los lisosomas. Los valores de PO son los resultados de la evolución citoquímica (gránulos oscuros) en escala de 0 a 400 puntos.

FIGURA I



NaNO₂ -Nitrito de sodio
NG -Nitroglicerina
Con-A -Concanavalina-A
NaIO₄ -Peryodato de sodio

D I S C U S I O N

En este trabajo comprobamos que el grado de activación de los macrófagos puede ser evaluado mediante la cuantificación de la cantidad de lisosomas desarrollados, por la captación del naranja de acridina, la observación de los lisosomas al microscopio de fluorescencia, por espectrofotómetro²¹ o mediante el método citoquímico de la peroxidasa ^{22,23}.

Entre estos métodos se observó una correlación excelente, la cual indica que durante la activación de los macrófagos ocurre un incremento paralelo entre la cantidad de lisosomas y el contenido de su peroxidasa.

Encontramos que el grado de activación de los macrófagos peritoneales que causaron estos reactivos fué en orden ascendente: NaNO_2 , Nitroglicerina, Con-A y NaIO_4 .

El mecanismo de acción mitogénica del NaIO_4 sobre los linfocitos, radica en que oxida los oxidrilos vecinos del ácido N-acetilneuramínico, de la galactosa y de la galactosamina de algunas proteínas superficiales^{1-a}.

Para que ocurra la estimulación mitogénica de los linfocitos, se requiere la presencia de otras células fagocíticas como son los monocitos, macrófagos o células dendríticas⁹⁻¹¹.

Sin embargo, la acción del NaIO_4 y de la Con-A sobre las células fagocíticas es desconocida, así como también el papel de estas células en el proceso mitogénico de los linfocitos.

En este trabajo encontramos que los mitógenos linfocitarios como el NaIO_4 y la Con-A también causaron activación de los macrófagos peritoneales de los ratones BALB/c; pero el mecanismo de acción de estos reactivos sobre los macrófagos y la relación que esto pudiera tener con la mitogénesis de los linfocitos queda por investigarse.

El NaIO_4 tiene acción oxidativa y estimula la mitogénesis de linfocitos T supresores y citotóxicos¹⁸⁻²⁰. Nosotros hemos encontrado que la administración parenteral del NaIO_4 causa abolición de la reacción de hipersensibilidad celular que causa la sensibilización al dinitrofluorobenceno. Se ha informado que otros agentes oxidantes nitrosos y nitrados tienen acción inmunosupresora²⁴⁻²⁷. Por este motivo, en este trabajo se incluyeron el nitrito de sodio y la nitroglicerina, para investigar si también podrían tener algún efecto sobre los macrófagos y encontramos que el NaNO_2 y la

nitroglicerina también causaron activación macrofágica.

En base a estas observaciones podemos decir que el NaIO_4 tiene dos efectos inmunológicos: Activa a los macrófagos peritoneales y estimula la proliferación de los linfocitos T supresores. En ambos efectos, el NaIO_4 tiene acción estimulante, aunque parecen opuestos de inmoestimulación e inmunosupresión. Estos hallazgos ameritan seguir estudiando en el futuro.

Finalmente, llamó la atención que el NaIO_4 y los otros reactivos tuvieron solo un efecto estimulante local sobre los macrófagos de la cavidad peritoneal donde se inyectaron estas sustancias; pero no tuvieron un efecto sistémico por ejemplo sobre los macrófagos pulmonares.

En resumen podemos decir que el NaIO_4 , la Con-A, la NG y el NaNO_2 activaron los macrófagos peritoneales. Esta activación pudo cuantificarse por las técnicas del naranja de acridina y de la peroxidasa.

CONCLUSIONES

Los mitógenos linfocitarios como el NaIO_4 y la Con-A tienen efecto activador de los macrófagos peritoneales en ratones.

El NaIO_4 aplicado intraperitonealmente no activa a los macrófagos pulmonares.

La aplicación subcutánea no tiene efecto sistémico sobre los macrófagos pulmonares y peritoneales.

B R E V I A R I O

Con-A : Concanavalina-A

DNA : Acido desoxirribonucleico.

I.P. : Intraperitoneal.

N.A. : Naranja de acridina.

NaIO₄ : Peryodato de sodio.

NG : Nitroglicerina.

nm : Nanometros.

NaNO₂ : Nitrito de sodio.

NaOH : Hidroxido de sodio.

PO : Peroxidasas.

S.C. : Subcutanea

Ts : Linfocitos T supresores.

ug : Microgramos.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Novogrodsky, A.: Induction of lymphocyte transformation by periodate. In: Proceedings of the sixth leucocyte culture conference. M.R. Schwarz (Ed) Academic Press N.Y. pp. 167.
- 2.- Parken J.W., O'Brien, R.L., Lukas, R.J., Steiner, J.: Transformation of human lymphocytes by sodium periodate. Lancet 1972; 1: 103.
- 3.- Novogrodsky, A., Katchalsky, E.: Membrane site modified on induction of the transformation of the lymphocytes by periodate Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 1972; 69: 3207.
- 4.- Turman, G.B. Giovanella, B., Goldstein, A.L.: Evidence for the T cell specificity of sodium periodate-induced lymphocyte blastogenesis. J. Immunol. 1993; 113: 810.
- 5.- O'Brien, R.L., Parken, J.W., Paolilli, P., Steiner, J.: Periodate-induced lymphocytes upon autologous lymphocytes. J. Immunol. 1974; 112: 1884.
- 6.- Greineder, D.K., Rosenthal, A.S.: Activation of the T lymphocytes proliferation by sodium periodate on neuramini-

dasa galactose oxidase. Fed. Proc. 1975; 34: 958.

- 7.- Schatz, M., Patterson, R., Sommers, H.M., Harris, K.E.:
Mitogen induced lymphocyte and cutaneous reactions in dogs.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 1977; 54: 121.
- 8.- Brunner, C.J., Johnson, D.W., Musioplaf, C.C.: Induction
of blastogenesis in bovine peripheral blood lymphocyte.
Am. J. Vet. Res. 1979; 40: 1386.
- 9.- Greineder, D.K. Rosenthal, A.S.: The requeriment of
macrophage lymphocyte interaction in T lymphocyte
proliferation induced by generation of aldehydes on cell
membranes. J. Immunol. 1975; 115: 932.
- 10.-Klimbert, W.E.F., Bowers, W.E.: Dendritic cells from
different rat tissues are potent accesory cells in oxidative
mitogenesis. J. Cell. Biol. 1980; 87: 62a.
- 11.-Phillips, M.L., Parker, J.W., Frelinger, J., O'Brien, R.L.:
Characterization on responding cells in oxidative mitogen
simulation. II. Identification of an Ia - bearing adherent
accesory cell. J. Immunol. 1980; 124: 2700.
- 12.-Unanue E.R.: The regulatory role of macrophage in antigenic

- stimulation. Adv. Immunol. 1972; 15:95.
- 13.-Stites D., Fudenberg H.H., Stobo J.D., Wells J.:
Immunología Básica y Clínica. 1983; 7: 84.
- 14.-North Robert J.: The Concept of the Activated Macrophage.
Opinions. The Journal of Immunology. 1978; 21: 3.
- 15.-David J.R.: Macrophage Activation by lymphocyte mediators.
Fed. Proc. 1975. 34:1730.
- 16.-Zicari, A., Lipari, M., Di Renzo, L., Longo, A., Antonelli,
G., Pontieri, G.M.: In vivo and in vitro macrophage
activation induced by IFN gamma spontaneously released by
spleen cells from tumor bearing mice. J. Biol. Regul.
Homeost. Agents. 1992; 6: 65-72.
- 17.-Vecchiarelli, A., Dottorini, M., Pietrella, D., Cociani, C.,
Eslami, A., Todisco, T., Bistoni, F.: Macrophage activation
by N-acetyl-cysteine in COPD patients.
Chest. 1994; 105 (3): 806-11.
- 18.-Guenounou, M., Agneray, J.: Induction of suppressor cells by
sodium periodate the opposite expression of periodate induced
lymphocyte activation in spleen cells of normal and nude
mice. Immunology. 1979; 37: 53.

- 19.-Binimianow M. Ramot B., Novogrosky A.: Effect of macrophage on periodate-induced transformation of normal and chronic lymphatic leukemia lymphocyte. Clin. Exp. 1974; 16: 235.
- 20.-Limmitzer, R., Rabson, A.R.: Induction of suppressor cells after activation of human peripheral blood mononuclear cells with periodate sodium. J. Immunol. 1982; 45: 7.
- 21.-Urban, J.L.: Macrophage-induced enhancement of endogenous tumor lysosome activity. Cancer Res. 1981; 41: 2221.
- 22.-Kaplow, L.S.: Simplified myeloperoxidase stain used benzidine dihydrochloride. Blood. 1965; 26: 215.
- 23.-Adams, D.O.: Macrophage activation and secretion. Fed. Proc. 1982; 41: 2193.
- 24.-Gómez, E.H., Daneri, N.A.: Inhibición de la reacción de hipersensibilidad celular al dinitrofluorobenceno con peryodato de sodio. Arch. Invest. Med. (Méx.) 1983; 14: 351.
- 25.-Drickrey, H., Preussman., Ivankovic, S.: Nitroso compounds in organotropic and transplacental carcinogenesis. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1969; 163: 713.

26.-Jorginson K.A., Lawesson S.O.: Amyl nitrite and kaposi sarcoma in homosexual men. N. Engl. Med. 1982, 307:893.

27.-Oswald, G.A., Theodosi Gazzard, B.G., Byoom, N.A., Fisher Hoch, S.P.: Attempted immune stimulation in the "gay compromise syndrome". Br. J. Med. 1982; 285-1082.