

~~612.017 (043.e)  
HER  
EST  
T~~

1/  
205

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

ESTUDIO DEL SISTEMA MONONUCLEAR FAGOCITICO EN UN MODELO DE  
ENFERMEDAD CRONICA POR INMUNOCOMPLEJOS EN LA RATA. EVIDENCIA DE UNA  
DISMINUCION DE LA FUNCION DE LOS RECEPTORES Fc.

TESIS DOCTORAL

GABRIEL HERRERO-BEAMONT CUENCA

1986

Reg. F.M. 7813

A Mercedes  
A mis Padres

# FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

CLÍNICA DE NUESTRA SEÑORA DE LA CONCEPCION

Avd. Reyes Católicos 2 - Ciudad Universitaria

MADRID-28040

TELEFONOS

2441600 - 2440100

4491007 - 4491100

D. JESUS EGIDO DE LOS RIOS, PROFESOR TITULAR DE MEDICINA DE  
LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID:

CERTIFICA: que D. Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca, licenciado en Medicina por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo mi dirección, en el Laboratorio de Nefrología de la Fundación Jiménez Díaz, el presente trabajo que creo reúne las condiciones para ser presentado como Tesis Doctoral. Y para que conste, firmo la presente en Madrid a veinte de mayo de mil novecientos ochenta y seis.

Fdo. Dr. J. Egido de los Ríos

INDICE	IV
AGRADECIMIENTOS	IX
ABREVIATURAS	XI
1. INTRODUCCION	
1.1. Modelos animales de enfermedad por inmuno complejos (IC)	2
1.1.1. Modelos inducidos de enfermedad	2
1.1.2. Modelos espontáneos de enfermedad	4
1.2. Biología de los IC	7
1.2.1. Factores que influyen en la formación de IC	7
1.2.2. Propiedades biológicas de los IC	10
1.2.3. Aclaramiento sérico de IC	12
1.3. Sistema mononuclear fagocítico (SMF)	14
1.3.1. Definición del SMF	15
1.3.2. Heterogeneidad del SMF	15
1.3.3. Problemas planteados en el estudio del SMF	17
1.3.4. Modificación de la actividad del SMF por tratamientos enzimáticos y por drogas	20
1.4. Receptores Fc para la IgG	20
1.4.1. Función de los receptores Fc	20
1.4.2. Importancia de la afinidad y del número de receptores Fc	21

1.4.3. Heterogeneidad de los receptores Fc	22
1.4.4. Pérdida de expresión de los receptores Fc	24
1.4.5. Cooperación en la función de los receptores Fc y C3b	25
1.5. Estudios de la función del SMF	27
1.5.1. Estudios de la función del SMF en modelos animales	27
1.5.2. Aclaramiento esplénico de IC particulados	27
1.5.3. Función monocitaria	29
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAL Y METODOS	34
3.1. Técnicas generales.	35
3.1.1. Inmunodifusión doble dimensional	35
3.1.2. Inmunodifusión radial	35
3.1.3. Inmunolectroforesis	36
3.2. Purificación y aislamiento de la IgG de rata	37
3.3. Preparación de agregados de IgG de un tamaño determinado	37
3.3.1. Marcaje de la IgG con $^{125}\text{I}$ por el método de la Cloramina T	37
3.3.2. Preparación de agregados de IgG de un tamaño definido	38
3.3.3. Caracterización de los agregados de IgG por ultracentrifugación en gradiente de	

sacarosa	38
3.4. Modelo de enfermedad crónica por IC	39
3.4.1. Inducción de la enfermedad	39
3.4.2. Estudios anatomopatológicos	40
3.5. Aislamiento de células	40
3.5.1. Separación y purificación de monocitos circulantes	40
3.5.2. Separación de células hepáticas	41
3.5.3. Purificación de las células de Kupffer	42
3.6. Estudios de la función del SMF "in vivo"	42
3.6.1. Aclaramiento sanguíneo de agregados de IgG marcados con $^{125}\text{I}$	42
3.6.2. Localización tisular de los agregados de IgG	44
3.6.3. Captación "in vivo" de los agregados de IgG por hepatocitos y células no parenquimatosas	44
3.7. Estudio de los receptores Fc para la IgG "in vitro"	45
3.7.1. Cinética y constante de afinidad de la unión de los agregados de IgG a hepatocitos células de Kupffer y monocitos	45
3.7.2. Cálculo de la constante de asociación	46
3.7.3a. Caracterización de la especificidad de la unión de los agregados de IgG a hepatocitos y células de Kupffer	46
3.7.3b. Cálculo de la constante de afinidad	47
3.7.4. Estudio de la expresividad de los receptores	

Fc mediante la formación de rosetas	47
3.7.4.a) Preparación de las partículas de poliacrilamida recubiertas con IgG de rata	47
3.7.4.b) Técnica de las rosetas	48
3.8. Unión y catabolismo de los agregados de IgG por células de Kupffer "in vitro"	49
3.8.1. Cultivo de células de Kupffer	49
3.8.2. Unión, endocitosis y catabolismo de los agregados de IgG	49
3.9. Detección de IC	50
3.9.1. Método de las células Raji	50
3.9.2. Expresión de los resultados	51
3.10. Estudios estadísticos	52
4. RESULTADOS	53
4.1. Purificación y aislamiento de la IgG	54
4.2. Preparación de los agregados de IgG	54
4.3. Inducción y evolución de la enfermedad crónica por inmunocomplejos en ratas Wistar	57
4.3.1. Inducción y curso de la enfermedad	57
4.3.2. Inmunofluorescencia renal	57
4.4. Manejo de los agregados de IgG por el SMF "in vivo"	62
4.4.1. Aclaramiento sanguíneo de los agregados de IgG marcados con $I^{125}$	62
4.4.2. Captación tisular de los agregados de IgG	68
4.4.3. Inmunofluorescencia hepática	74
4.4.4. Captación "in vivo" de agregados de IgG por células no parenquimatosas y hepatocitos	74

4.5. Unión de los agregados de IgG a hepatocitos, células de Kupffer y monocitos aislados	78
4.5.1. Constante de asociación de las tres estirpes celulares y captación por célula	78
4.6. Expresión de los receptores Fc para la IgG en células de Kupffer, hepatocitos y monocitos	80
4.6.1. Formación de rosetas con partículas de poli-acrilamida recubiertas con IgG, de hepatocitos, células de Kupffer y monocitos	80
4.6.2. Caracterización de la especificidad de la unión de los agregados de IgG	84
4.6.3. Constante de afinidad y número de sitios de unión de agregados de IgG en células de Kupffer y hepatocitos en ratas enfermas y controles	84
4.7. Determinación del nivel de IC circulantes	86
4.8. Catabolismo hepático de agregados de IgG	89
5. DISCUSION	95
6. CONCLUSIONES	113
7. RESUMEN	116
8. BIBLIOGRAFIA	119



## AGRADECIMIENTOS.

En el momento de recordar a quiénes debo ofrecer públicamente mi reconocimiento por la ayuda recibida durante la realización de la presente tesis, tras tres años de quehacer continuado, frustraciones y alegrías, acuden a mi mente numerosas personas. Sin embargo, hay tres que constituyen, por diversos motivos, el núcleo principal de mis agradecimientos:

El Dr. Jesús Egido, director de la tesis, por haberme concedido la oportunidad de trabajar con él. Maestro con una creatividad diaria asombrosa, y, con una biografía realmente original en su interpretación de la realidad.

El Dr. Jaime Sancho, por que me ha proporcionado, con gran esfuerzo por su parte, debido a mi mala formación previa, los conocimientos que me han permitido trabajar autónomamente en el laboratorio, y que podrían ser la base, si las circunstancias lo permitieran, de mi continuidad en esta labor.

El Dr. Luis Hernando, Profesor en la Facultad, posteriormente durante la formación posgraduada, y cuyo Servicio es un lugar de atracción permanente para mí, y al que me ha permitido integrarme durante estos tres años.

Tampoco puedo olvidar a la que coetáneamente será doctora conmigo, Eva González, por su maternal crítica científica, su silencioso hacer diario y su capacidad para expresar agrios, pero reales comentarios con dulzura.

Al Dr. Pedro Fernández Vallado, mi Jefe de Servicio en la práctica asistencial, que no me ha puesto impedimento en la participación de las labores de otro Servicio.

A Rosario de Nicolás y Yolanda García de Castro por su ayuda técnica.

A Guillermo del Olmo y su Departamento por sus excelentes fotografías.

A Nicolás González Mangado y Maribel Pérez García, que en un mundo impregnado de egoísmo, me han permitido utilizar sus utensilios de trabajo para mis fines.

Al resto de compañeros y compañeras del laboratorio de Nefrología por su apoyo y amistad durante la realización de este trabajo.

Todas estas personas hemos trabajado, y la mayoría continuamos haciéndolo en la Fundación Jiménez Díaz, Centro especialmente querido por todos nosotros, donde nos formamos como estudiantes, posteriormente como residentes y actualmente nos permite llevar a cabo nuestra actividad profesional diaria con las máximas posibilidades y que nos disgustaría enormemente tener que abandonar por cualquier motivo.

ABREVIATURAS:

A-IgG	IgG agregada
BSA	albúmina sérica bovina
cpm	cuentas por minuto
DEAE	dietil aminoetil
EDAC	1-etil-(3-dimetil amino propil y carbodiimida CLH)
ELISA	enzimo inmunoensayo
IC	inmunocomplejos
OPD	ortofenil diamina
OVA	ovoalbúmina
Pm	peso molecular
SMF	sistema mononuclear fagocítico
TBS	tampón tris salino
TCA	ácido tricloroacético
Tris	tris (hidroximetil)-aminometano
Tris-Tyrode (TBH)	solución Tyrode tamponada con tris

## 1. INTRODUCCION

## 1.1. MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDAD POR INMUNOCOMPLEJOS (IC)

### 1.1.1. MODELOS INDUCIDOS

En la actualidad podemos elegir entre diversos modelos experimentales en animales que, espontáneamente o de manera inducida, desarrollan enfermedades similares a ciertas enfermedades autoinmunes humanas en las que los IC tienen un papel patogénico importante (40,48,76,136). Los conocimientos sobre la naturaleza y el papel patógeno de los IC en modelos experimentales han sido estudiados muy extensamente en los últimos 20 años (169).

Dixon y cols postularon que la presencia continuada de IC circulantes produciría una enfermedad crónica y progresiva en animales (36a). Estos autores inyectaron diariamente dosis variables de antígeno a conejos, observando una clara relación entre la presencia de complejos y la aparición de glomerulonefritis crónica (36a). También sugirieron que las cantidades relativas de antígeno y de anticuerpo en la circulación eran de suma importancia en la aparición de la enfermedad (36a). Posteriormente, Christian y cols mostraron la importancia de ciertas cualidades de los anticuerpos (los conejos que formaban anticuerpos no-precipitantes eran susceptibles al desarrollo de la enfermedad) en la formación de los IC (25).

Más dificultades aparecieron cuando se intentó provocar la enfermedad por IC en la rata (48), animal que en muchos aspectos es más idóneo para su estudio que el conejo. En ratas, a diferencia de lo que ocurría en conejos, fué preciso una inmunización previa subcutánea adecuada con adyuvante de Freund y BSA para producir una respuesta humoral (6). Otras dificultades surgieron para establecer la pauta más idónea para la administración de la BSA, tras la inyección subcutánea del adyuvante de Freund. La dosis intravenosa diaria producía una mortalidad muy elevada por anafilaxia. Por el contrario, la administración semanal de la BSA tardaba en desencadenar la enfermedad 6 meses (6). Fennell y Pardo y, posteriormente, otros grupos desarrollaron nuevas pautas para provocar la enfermedad en la rata (48). En dicha enfermedad se producía una glomerulonefritis difusa, cuya severidad estaba relacionada con la cantidad de antígeno inyectada (48,81), y que oscilaba entre una glomerulonefritis moderada, a otra proliferativa, necrotizante, con denudación del endotelio. También se observaron depósitos de IC en diferentes tejidos: pulmón, corazón, hígado, bazo, intestino, peritoneo y ovario (6,136,176).

En nuestro laboratorio, mediante una modificación de las técnicas existentes previamente se ha podido provocar la enfermedad en las ratas, evitando la vía intravenosa, e introduciendo las siguientes ventajas: desaparición de la anafilaxia mortal, tiempo de inducción de la enfermedad acortado y curso homogéneo de la misma (153). Brevemente, nosotros provocamos la enfermedad inyectando adyuvante completo de Freund y OVA por vía subcutánea, repitiendo otra inmunización por la misma vía, con adyuvante incompleto a la

semana, y tras un lapso de tres semanas con inyecciones diarias intraperitoneales de OVA. La secuencia inmunopatogénica de la enfermedad fue muy homogénea, y podría ser analizada en varias etapas (153). Durante la fase inicial, los anticuerpos, en exceso de antígeno, reaccionan con la ovoalbúmina, produciéndose un depósito mesangial de IC. Posteriormente, disminuye de forma considerable el nivel de anticuerpos, produciéndose la reacción en exceso de antígeno, en cuyo momento aparece la proteinuria, y, a nivel histopatológico la presencia de depósitos inmunes en la membrana basal (76,153). En la tabla 1 pormenorizamos la localización de los complejos inmunes durante la evolución de la enfermedad. La microscopía óptica mostró una glomerulonefritis proliferativa difusa, sin formación de semilunas. La liberación de mediadores de la inflamación durante la inducción de la enfermedad, la causa de la gran incidencia de anafilaxia mortal provocada al desencadenar la enfermedad, se ha obviado con esta técnica (85,155).

#### 1.1.2. MODELOS ESPONTANEOS DE ENFERMEDAD POR INMUNOCOMPLEJOS EN ANIMALES

Dos modelos de enfermedad autoinmune espontánea en animales, muy similares al lupus eritematoso sistémico humano, han servido para profundizar en la etiología y patogenia de esta enfermedad: la desarrollada en el ratón híbrido de Nueva Zelanda blanco/negro (NZB/W) y en el lupus canino (115a,149). Más recientemente se han descrito otras dos nuevas cepas de ratones con alteraciones similares, aunque con particularidades muy interesantes, el MRL/l y el BXSB (tabla 2).

TABLA I

LOCALIZACION DE LOS INMUNOCOMPLEJOS EN LA ENFERMEDAD CRONICA DEL SUERO EN LA RATA

<u>DIA</u>	<u>INMUNOFLORESCENCIA</u>		<u>MICROSCOPIA ELECTRONICA</u>			
	<u>MESANGIAL</u>	<u>MB*</u>	<u>MESANGIAL</u>	<u>SUBENDOTELIAL</u>	<u>IM**</u>	<u>SUBEPITELIAL</u>
1	-	-	-	-	-	-
7	++	-	+++	++	-	-
11	+++	-	+++	++	+	+
15	+++	++	+++	++	++	++
17	+++	+++	+++	+++	+++	+++

\* MB: membrana basal

\*\*IM: intramembranosa



TABLA II

CARACTERISTICAS DEL LUPUS MURINO ESPONTANEO (149)

CEPAS	NZB	NZB/NZW	MRL-1	BXSB
SEXO	poco efecto	efecto marcado andrógenos protegen estrógenos empeoran	andrógenos protegen	mayor gravedad en machos, hor mono-independiente.
Igs incrementadas	IgM	IgG1 e IgM	IgG1 e IgG2a	IgG1 e IgG2b
MANIFESTACION CLINICA	anticuerpos anti-linf T anemia hemolítica Coombs +	anti-DNA GN membrano-proliferativa Sjögren	linfadenopatía marcada anti-DNA, anti-SM artritis GN membrano-proliferativa vasculitis	GN arteriosclerosis coronaria linfadenopatía moderada

La etiopatogenia de estas enfermedades todavía no se conoce bien, como tampoco la secuencia de los trastornos inmunológicos, aunque parece claro que presentan una alteración en la inmunorregulación determinado genéticamente, que predispone a las infecciones virales, autoinmunidad, aparición de IC y producción de tumores (149).

Por otra parte, los perros con lupus descritos por Lewis y cols tienen una enfermedad con afectación de varios órganos, caracterizada por anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia, nefritis y linfadenopatía. Analíticamente presentan células LE, factor reumatoide anticuerpos anti RNA y anti DNA-histona (169).

## 1.2. BIOLOGIA DE LOS INMUNOCOMPLEJOS

### 1.2.1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FORMACION DE IC

La formación de IC es un componente de la respuesta inmune normal encaminada a eliminar y/o neutralizar antígenos. En determinadas ocasiones se depositan en los tejidos, o bien, se forman "in situ", activando el complemento con la aparición de los mediadores de la inflamación y el posterior daño tisular (24,25,27).

Brevemente, ya que los trabajos que componen la presente Tesis se centran en el aclaramiento y eliminación por los receptores Fc de IC, vamos a definir las condiciones bajo las cuales se forman los mismos.

La concentración de IC en la circulación en un determinado momento depende tanto de la tasa de formación como de la de eliminación. La primera es función de la cantidad del antígeno y la

producción de anticuerpos, mientras que la tasa de eliminación está en función de la captación de IC por el Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF) y la distribución tisular (125,127).

Son múltiples los factores que afectan la formación y el aclaramiento de IC en la circulación (4,15,41,45,46,47,51,60,65,91,126,141,143). (tabla 3). Algunos factores tienen mayor trascendencia patológica que otros. Especialmente importante es el tamaño de la matriz tridimensional que constituye el inmunocomplejo (49,116,145), y que depende en su mayor parte: 1, de la valencia del antígeno; 2, de la concentración del antígeno y del anticuerpo y 3, de la relación de ambos.

1. La porción concreta de una molécula antigénica, que reacciona con el sitio de unión del anticuerpo se define como determinante antigénico. El número de determinantes antigénicos de una molécula determina la valencia con que interactúa con un antígeno específico. Una molécula puede tener determinantes antigénicos diferentes, y por tanto, será capaz de reaccionar con anticuerpos de diferentes especificidades (125). De tal modo que solamente los antígenos multivalentes pueden llegar a formar IC de gran tamaño, complejos y capaces de precipitar en determinadas ocasiones (123,125).

2. La concentración relativa del antígeno y del anticuerpo determina la relación de combinación antígeno-anticuerpo, que puede variar desde un exceso de antígeno, pasando por la equivalencia, hasta un exceso de anticuerpo. En exceso de antígeno los complejos inmunes son solubles y no precipitan. Esto es así, independientemente de la valencia del antígeno, y puede producir la solubilización de inmunoprecipitados. En equivalencia con antígenos oligovalentes se

TABLA III

FACTORES DETERMINANTES DE LA FORMACION Y ELIMINACION DE LOS IC

A.- PROPIEDADES INTRINSECAS DE LOS INMUNOCOMPLEJOS

- cantidad
- tamaño
- fijación de complemento
- carga electrostática
- atracción tisular específica del antígeno
- crioprecipitación
- relación relativa antígeno/anticuerpo
- presencia de antiglobulinas: factor reumatoide  
antiidiotipos
- características del anticuerpo: cantidad  
clase y subclase  
afinidad  
valencia

B.- SISTEMA MONONUCLEAR FAGOCITICO

- déficit funcional condicionado:
  - genéticamente
  - por tratamiento farmacológico
  - por sobrecarga funcional

forman IC de gran tamaño y solubles, y con antígenos multivalentes se forman usualmente precipitados. El efecto de un exceso de anticuerpo en el tamaño de los IC depende de la valencia del antígeno.

También es importante en este sentido la concentración absoluta del antígeno y del anticuerpo, ya que los complejos solubles crecen de tamaño por interacción entre ellos mismos.

3. La avidéz es otro factor a considerar, pues al aumentar la misma se forman grandes IC, mientras que al disminuir la avidéz disminuye el tamaño (61,168).

En la formación y, más en la eliminación de IC es necesario considerar las propiedades intrínsecas del antígeno, tales como su composición, tamaño, configuración óptica y localización de los determinantes antigénicos.

Existen también factores locales que modifican la localización en la que se depositan los IC (tabla 4). Estos tienden a localizarse en los glomérulos, tejido sinovial, plexo coroideo, pulmones, piel y coroides (7,161). Todos estos tejidos comparten algunas propiedades físicas, fisiológicas e histológicas (161). Presentan similitudes funcionales y ultraestructurales, como la existencia de fenestraciones endoteliales, un alto flujo sanguíneo por unidad de masa tisular con una importante red capilar y, en algunas localizaciones la formación de ultrafiltrado (161).

### 1.2.2. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS IC

Las propiedades biológicas más importantes son: la interacción con receptores celulares, la activación del complemento y el depósito en los tejidos. Estas propiedades dependen de la clase y subclase del

TABLA IV

FACTORES TISULARES LOCALES CONDICIONANTES DEL DEPOSITO DE IC

- anatómicos:

estructura microvascular  
membrana basal  
matriz intersticial

- fisiológicos:

mediadores de la permeabilidad vascular  
flujo sanguíneo por unidad tisular  
producción de ultrafiltrado

- físicos:

hidrodinámicos  
temperatura local  
presión  
patología local previa

anticuerpo, del tamaño de los IC y, en menor grado de las propiedades de los antígenos. Se discutirán con mayor profundidad en el apartado 1.4.

### 1.2.3. ACLARAMIENTO SERICO DE IC

El destino de los IC circulantes se ha estudiado cuantitativamente mediante la inyección de IC preformados o agregados de IgG de un tamaño y composición determinados. Los resultados de los trabajos en los que se estudia el aclaramiento de IC en diversas situaciones muestran modelos de curvas de aclaramiento también diferentes (5,18,71,72,123).

En general, las curvas de aclaramiento tienen tres fases bien diferenciadas: primera fase de eliminación inmuno-específica, segunda fase de distribución tisular y, tercera fase de catabolismo tisular (23).

Los IC que desaparecen en la primera fase son más grandes, fijan avidamente el complemento (71) y son eliminados mediante su unión por los receptores Fc del SMF. La desaparición de estos IC sigue una función exponencial, correlacionándose la  $t_{1/2}$  con la dosis inyectada (71). Al incrementar la dosis, la eliminación disminuye y la velocidad de aclaramiento alcanza una meseta indicativa de que el sistema es saturable. Se conocen numerosos factores que influyen sobre la eliminación de IC de manera inmuno-específica por el SMF, y que fundamentalmente son: el tamaño (5,145), la capacidad de fijar complemento (94), la afinidad por el receptor Fc (114,115,158) y las clases y subclases de inmunoglobulina que interviene en el complejo (158). Por tanto, una alteración de la función de los receptores Fc

puede conducir a una prolongación en la circulación de los IC (51,72). Es preciso tener en cuenta la observación aportada por Knutson de que el paso limitante de la fagocitosis de los complejos es la adherencia al receptor Fc (108,109). El segundo componente de la curva de aclaramiento representaría la fase de equilibrio, y por tanto, en los casos en que se produzca, también indicaría la posible existencia de permeabilidad vascular incrementada (72). La diferencia entre estos dos componentes de la curva de aclaramiento es, en ocasiones difícil de dilucidar y, de hecho, se producen interpretaciones dispares entre los autores. Así, Haakenstad señala que la eliminación rápida tras la inyección de IC que fijan complemento es un indicio de vasopermeabilidad incrementada, que daría lugar a la extravasación de plasma y de los complejos inmunes, con la elevación inclusive del hematocrito (72). Esta fase duraría unos 15 minutos. Los mismos autores comprobaron en otro experimento que esta fase no se producía utilizando IC que no fijaban complemento (72). Brennan demuestra que la primera fase está influida por la difusión de moléculas fuera del compartimento vascular, aunque también es dependiente de la eliminación vía los receptores Fc del SMF (18).

Por último, el tercer componente de la curva representa el catabolismo celular (18). Para Brennan, en el aclaramiento de tetrámeros, este componente refleja la velocidad de la fagocitosis, el catabolismo celular, y la difusión que ocurre durante esta fase hacia el componente extravascular (18).

Sin embargo, este esquema es diferente de unos modelos a otros. El número de componentes de la curva de aclaramiento puede estar reducida a dos componentes, por ejemplo, en los casos en que los



complejos no fijan complemento (72); aunque este fenómeno se ha achacado también a que el aclaramiento se hizo en sangre y no en plasma (18). Así, los IC de pequeño tamaño, compuestos por menos de dos moléculas de inmunoglobulinas, que como hemos visto se eliminan más lentamente que otros de mayor tamaño, muestran solamente dos fases exponenciales de eliminación: la primera de equilibrio y la segunda de catabolismo (123). No se sabe con exactitud en la actualidad dónde se lleva a cabo el catabolismo de este tipo de complejos. Cuando los estudios se realizan con IC de pequeño tamaño, que no son aclarados rápidamente por el hígado ni depositados en el riñón o en otros tejidos, la tercera fase de las pruebas de aclaramiento evidencia la persistencia en la circulación de los mismos.

No hay que desdeñar la patogenicidad de los IC pequeños y que unen mal el complemento ya que, como señala Finbloom (51) existen varias posibilidades por las que pueden producir destrucción tisular, a) por sus características de carga se podrían unir a ciertos componentes de los tejidos; b) existen receptores específicos para algunos antígenos; c) los propios carbohidratos de la inmunoglobulina influyen en la posterior unión de la misma.

En lo que respecta a los trabajos presentados en la presente tesis nos interesa revisar especialmente la forma en la que los inmunocomplejos, después de formarse, son eliminados específicamente por el SMF, vía los receptores Fc de la IgG. Primeramente, vamos a describir brevemente el concepto actual del SMF.

### 1.3. SISTEMA MONONUCLEAR FAGOCITICO

### 1.3.1. DEFINICION DEL SMF

Recientemente Van Furth y cols han modificado el concepto de sistema reticulo endotelial, y han incluido los siguientes criterios para definir el sistema mononuclear fagocitico: 1, morfología apropiada, 2, capacidad fagocítica (especialmente para partículas opsonizadas), y 3, derivación de la médula ósea. Excluye a las células dendríticas, células endoteliales y fibrocitos, por lo que no es sinónimo del concepto de sistema reticuloendotelial (31,133a,146).

Sin embargo, no todas las células del SMF cumplen estas condiciones y, por el contrario, existen células que no pertenecen al SMF y tienen receptores Fc (58,59,81,82,83,88,130,131), como los hepatocitos, que son capaces de captar y digerir IC (154). Por estos motivos la discusión sobre como denominar a las células que cumplen esta misión en el organismo parece un tanto superficial, y si hemos elegido la de SMF ha sido por seguir utilizando la empleada en nuestro grupo de trabajo (41,154). Las células que componen el SMF son: el monocito, el histiocito-macrófago, la microglia, la célula de Kupffer, el osteoclasto, el macrófago alveolar, el sinoviocito A y el macrófago esplénico.

Las células de Kupffer, una de las extirpes celulares con las que hemos trabajado, cumplen todas las condiciones que hemos mencionado previamente (31). Los hepatocitos, por otra parte, tienen receptores que pueden servir para la unión del antígeno (58,81,82).

### 1.3.2. HETEROGENEIDAD DEL SISTEMA MONONUCLEAR FAGOCITICO.

En cualquier caso un sistema compuesto de células con una función, estructura y distribución tan variada exige un planteamiento especialmente riguroso para su estudio (133a). Así, los macrófagos de diferentes especies difieren entre sí en algunos aspectos y, a su vez, de los macrófagos humanos (115). Por otro lado, los monocitos periféricos difieren de los macrófagos peritoneales, cuyo metabolismo es muy diferente a su vez del de los macrófagos alveolares, expuestos a altas concentraciones de oxígeno en el alvéolo pulmonar (22,133a). Los resultados de los trabajos sobre estas células cuando se estudian "in vitro" o aisladas, aprovechando ciertas cualidades funcionales tienen que evaluarse muy críticamente (26).

En general podemos afirmar que el macrófago tisular es la unidad funcional más importante del SMF y el monocito periférico es una célula transicional de vida media relativamente corta (171). Numerosos factores tales como el estado de maduración, el grado de estimulación y activación distinguen a los fagocitos mononucleares. Estudios en ratones sugieren la existencia de diferencias entre los macrófagos del bazo y de la médula por un lado, y los del peritoneo y los monocitos circulantes por el otro (151). Incluso existen diferencias entre los mismos macrófagos peritoneales (147). También entre una población de macrófagos residentes no estimulados, puede haber subpoblaciones con características diferentes, probablemente indicando la existencia de varios estadios de diferenciación (170).

Desde el punto de vista funcional existen también importantes variaciones, que unido a la ausencia de una definición correcta de la terminología utilizada, han dado lugar a interpretaciones erróneas de los resultados de algunos autores. Es necesario en los estudios del

SMF explicitar el significado que cada autor da al término activación de los macrófagos. Así, Morlan y cols sugieren que esta situación debe basarse en la presencia de cambios cuantitativos mediante la investigación de parámetros bien definidos: la morfología celular, la actividad enzimática y la actividad fagocítica (133). Cambios en un solo parámetro no se acompañan necesariamente de otros cambios de activación (133).

### 1.3.3. PROBLEMAS PLANTEADOS EN EL ESTUDIO DEL SMF

Antes de valorar los factores que modifican la actividad de los receptores Fc de los fagocitos mononucleares, es preciso discutir la metodología aplicada a su estudio que podría alterar "per se" dicha función. Así, las técnicas utilizadas para el aislamiento de células del SMF ha provocado numerosas controversias, sobre la posibilidad de que se produjera una modificación de algunas de las funciones de estas células durante su estudio, lo que obviamente invalidaría, al menos parcialmente, los resultados.

Ackerman, con un nuevo método de purificación de monocitos y macrófagos mediante un sustrato compuesto por superficies a las que se pegaban microexudados de células tumorales, comprobó que los macrófagos previamente estimulados se pegaban mejor que los no estimulados (1). Este mecanismo podría ser el causante de la selección de un determinado subgrupo de células en algunas experiencias en las que se utiliza la adhesión para el aislamiento de las células del SMF. Por el contrario, Kurlander observó que los monocitos tenían igual capacidad de fijar agregados de IgG (A-IgG), tanto si estaban adheridos al plástico como sueltos (111). Fries, en

un estudio sobre el grado y significado de las alteraciones del receptor Fc en enfermedades humanas caracterizadas por una alteración del SMF evitó la adherencia como método de separación, alcanzando los mismos resultados en este sentido que Kurlander (56).

Otro hecho de difícil valoración, pero quizá de cierta transcendencia, es el que pueda inferirse de las condiciones microambientales en que se encuentran "in vivo" las diferentes células del SMF. Al menos teóricamente los receptores Fc deben sufrir un cierto grado de saturación por la IgG sérica. Este microambiente es destruido con las manipulaciones a las que están sometidas las células durante su estudio, desconociéndose las consecuencias que puedan derivarse de las modificaciones artefactales producidas por este hecho (75).

El significado "in vivo" de los receptores Fc en monocitos permanece poco claro, pues cantidades menores que las fisiológicas de IgG inhiben completamente su interacción con hematíes sensibilizados (5,84). Debido a la especialmente "alta" afinidad de los receptores Fc de los monocitos y macrófagos por la IgG monomérica, los inmunocomplejos que se unen deben hacerlo con interacciones altamente multivalentes y con la participación del complemento (56). En el mismo sentido, Bar Eli sugiere que durante el aislamiento de monocitos de la sangre, los IC pueden ser eliminados inadvertidamente de la superficie de las células (9). Concretamente, señalaba este autor que el estudio de los monocitos en la artritis reumatoide podría estar artefactado por este mecanismo, por lo que no se pondrían de manifiesto mediante los estudios "in vitro" posibles alteraciones de la fagocitosis ni de la citotoxicidad celular

dependiente de anticuerpo, que sin embargo, sí existirían "in vivo" (9).

Los monocitos normales tienen aproximadamente 10.000 receptores, mientras que los monocitos de enfermos con lupus eritematoso sistémico tienen 100.000. En cualquier caso, con la concentración sérica normal de IgG "in vivo" estos receptores deben estar saturados. Es más, Hardin comprobó que en contraste con lo que sucedía con los monocitos, los polimorfonucleares unían débilmente la IgG y los fragmentos Fc, sin poderse alcanzar la saturación de los receptores. Aunque los A-IgG se unían a ambas células, en el caso de los monocitos esta unión fué fácilmente inhibida por la IgG (75). Así, bajo circunstancias fisiológicas, los monocitos pueden estar protegidos de la activación por IC circulantes (75).

Kurlander demostró cómo la IgG1 en solución inhibía la interacción de monocitos con hematíes recubiertos con anticuerpo, probablemente por competición de la IgG con los hematíes. Cuando se eliminaba la IgG mediante varios lavados, la función de los receptores Fc se restauraba completamente (111). Sin embargo, cuando los monocitos se adherían al plástico la inhibición era total y no reversible (111).

En resumen, estos estudios confirman la importante repercusión que puede tener la presencia de las condiciones ambientales existentes "in vivo" en la función de los receptores Fc en los monocitos periféricos y, probablemente también, en todas las células del SMF en contacto con el torrente circulatorio. Por otro lado, alertan sobre la posibilidad de producir alteraciones artefactales por la metodología utilizada para el estudio de estas células.

#### 1.3.4. MODIFICACION DE LA ACTIVIDAD DEL SMF POR EL TRATAMIENTO ENZIMATICO Y POR DROGAS

Existe una serie de estímulos celulares previos a los estudios de los receptores Fc, así como de tratamientos que pueden alterar su expresión. La expresión de los receptores Fc del macrófago de ratón está influida por la inflamación inducida químicamente, y por drogas antiinflamatorias, concretamente por corticosteroides (79,174). El tratamiento de monocitos con enzimas proteolíticas aumenta la adherencia de hematíes recubiertos con anticuerpos. Así mismo, el tratamiento de macrófagos alveolares con enzimas proteolíticas produce un incremento de la adherencia de inmunocomplejos solubles (3). Tanto los monocitos como los macrófagos pulmonares muestran un aumento de la afinidad al ser preincubados con pronasa (30). El tratamiento con tripsina aumenta la afinidad de los receptores en monocitos y el pH bajo incrementa la afinidad y el número de los receptores de estas células (29).

Los animales tratados con corticosteroides presentan una disminución del aclaramiento de hematíes recubiertos con anticuerpos (6a). En el hombre, también se ha descrito este fenómeno. Así, los monocitos de los enfermos con artritis reumatoide tratados con corticosteroides muestran una disminución de la unión y fagocitosis de hematíes recubiertos con anticuerpos (79).

#### 1.4. RECEPTORES Fc

##### 1.4.1. FUNCION DE LOS RECEPTORES Fc

La capacidad de los fagocitos mononucleares para reconocer material extraño o autólogo dañado, las respuestas desencadenadas en las células por tal reconocimiento y el gran flujo de membrana durante la fagocitosis han dirigido los estudios de muchos investigadores hacia la membrana plasmática (163). El papel potencial en la regulación inmune, en el sistema defensivo y en el proceso inflamatorio de los receptores específicos que unen e ingieren materiales circulantes inmunológicamente activos debe ser de gran importancia fisiopatológica (140). La interacción de la fracción Fc de la IgG con su receptor Fc produce varias respuestas celulares, entre las que destacan la endocitosis de los complejos, la exocitosis de varios factores, la lisis de células cubiertas con anticuerpos y la variación de la síntesis de anticuerpos (85).

En los siguientes apartados comentaremos algunos aspectos de la función Fc relacionados con los trabajos realizados por nosotros.

#### 1.4.2. IMPORTANCIA DE LA AFINIDAD Y DEL NUMERO DE RECEPTORES Fc

La afinidad para la IgG varía con cada extirpe celular de la misma especie y entre especies (4).

En general las variaciones en cantidad, configuración y subclases de los anticuerpos que recubren los hematíes sensibilizados influyen en la velocidad de la destrucción de éstos por los leucocitos (111).

Estudios comparativos de receptores Fc para la IgG en diversos tipos celulares muestran diferencias en cuanto a la afinidad por la IgG monomérica y los A-IgG o IC de IgG, siendo más alta para estos dos últimos. El número de receptores en macrófagos varía entre  $10^5$



6 y 10 y la constante de afinidad para la IgG monomérica entre  $10^6$  y  $10^7$ , para los A-IgG disminuye el número de receptores pero aumenta la afinidad (133a). En general hay que tener presente que existe una correlación negativa entre el número de receptores por un lado, y su afinidad por el otro (55), incluso cuando el número de receptores sea normal (55). Quizás este fenómeno refleje la relación intrínseca entre el número y la afinidad de los receptores cuando se calculan por la prueba de Scatchard (156).

Arend comprobó que el aumento de la adherencia de los inmunocomplejos a células estimuladas estaba relacionado primeramente a variaciones de la afinidad de los receptores y en ciertas condiciones también por el número, dependiendo fundamentalmente del sexo del animal estudiado: en machos se producía por aumento de la afinidad, mientras que en las hembras permanecía igual la afinidad, pero aumentaba el número (4). La actividad de los receptores Fc, para la adherencia de IC, estaba relacionada con la afinidad de los receptores, y no con su número (3), lo que se podría justificar por una accesibilidad mayor de los receptores a la IgG ambiental (3). Sin embargo, en ciertas circunstancias, el número de receptores también contribuiría a la afinidad.

Según las subclases y clases de IgG la afinidad de los receptores varía. En hombres existe mayor afinidad para la IgG 1 y 3. En ratón, sin embargo, es para la IgG 2a e IgG 2b (133a).

#### 1.4.3. HETEROGENEIDAD DE LOS RECEPTORES Fc

La existencia de una o dos clases de receptores Fc es un tema controvertido y que por el momento no está aclarado en los fagocitos mononucleares de todos los animales (148).

En numerosos trabajos se sugiere la existencia de dos receptores, porque los resultados son discordantes con respecto a los esperados y de esta manera podrían justificarse. Hoch llegó a sugerir la existencia de dos receptores Fc diferentes porque encontró una disparidad entre el aumento de la unión de hematies recubiertos con anticuerpos y la captación normal de A-IgG por monocitos de enfermos con artritis reumatoide (79).

En el macrófago de ratón se han descrito dos tipos de receptores Fc (32,113,174). Uno de ellos une monómeros de IgG de ciertas clases (IgG2a), es sensible al tratamiento con tripsina y las IgG que une son citofílicas (es decir, se unen a la célula sin haber interactuado con el antígeno). El otro tipo de receptores une IC, A-IgG1 e IgG2b, y es tripsina resistente (175). La unión de IC es más firme que la de los anticuerpos citofílicos (51).

Otras evidencias indican, sin embargo, que la especificidad de estos receptores Fc no es absoluta, especialmente cuando se usan monómeros de proteína de mieloma. En este sentido, Segal y Tites han demostrado que la IgG2a, IgG2b e IgG1 de ratón compiten igualmente por la unión a los receptores en la línea macrofágica P388D1 (158). Hecho no observado si se usan agregados solubles (158). En el cobaya se ha mostrado la existencia de dos receptores diferentes, uno que une IgG2 exclusivamente, y otro, IgG1 e IgG2 (133a). En macrófagos alveolares de rata se ha sugerido la existencia de un receptor tripsina resistente que une IgG2a, pero no otras subclases, y un

receptor tripsina sensible que une IgG1 e IgG2, con igual afinidad pero que no une IgG2a o IgG2c (174,175).

En resumen, podemos afirmar que existen poderosas razones para pensar que realmente hay dos tipos diferentes de receptores Fc en los fagocitos mononucleares de rata, que en gran parte podrían justificar los resultados discordantes obtenidos por diversos autores en estudios similares.

#### 1.4.4. PERDIDA DE EXPRESION DE LOS RECEPTORES Fc

Las consecuencias de la saturación de los receptores Fc, ya sea por IC o por A-IgG, son de especial importancia para comprender la cinética de aclaramiento de los IC (16). Schmidt comprobó que 30 minutos después de haber fagocitado partículas inertes, entre el 80 al 90% de los monocitos mostraban pérdida de los receptores Fc que se reexpresaban entre 2 a 6 horas más tarde (157). Varios experimentos utilizando IC o IgG apuntan en la misma dirección:

-los IC que contienen IgG pueden reducir el número de los receptores Fc de monocitos humanos, y mediante un paso subsiguiente dependiente de energía, pueden perderse irreversiblemente (111).

-los A-IgG unidos a los receptores pueden permanecer en la membrana hasta 18 horas sin ser ingeridos (111).

-un anticuerpo monoclonal dirigido contra uno de los dos receptores Fc en ratones, producía un descenso significativo del nivel de IC 1,5 horas después de su infusión, persistiendo este efecto durante 72 horas (111a).

Los trabajos publicados muestran variaciones del tiempo de reexpresión de los receptores previamente endocitados. Este fenómeno puede obedecer a varias causas: características intrínsecas de los IC o de los A-IgG, la extirpe celular estudiada, incluso se han evidenciado en trabajos con IC particulados, diferencias en el nivel de recuperación de los receptores Fc, según las características de los hematíes utilizados.

#### 1.4.5. COOPERACION EN LA FUNCION DE LOS RECEPTORES Fc Y C3b

Uno de los aspectos más debatidos en el terreno de los receptores de membrana para la IgG y la fracción C3b del complemento es la posible existencia de una cooperación en la actuación de ambos (165).

Parece ser que el receptor C3b no está involucrado en el proceso fagocítico de los IC, siendo los receptores Fc los que jugarían un papel primordial (112,138). Esto estaría de acuerdo con los resultados de Arend y Mannik, en los que la depleción de complemento con veneno de cobra o A-IgG humana en conejos no alteraba la captación hepática "in vivo" (5)

Otros autores utilizando otros medios de estudio han alcanzado conclusiones diferentes. La capacidad del complemento para incrementar la unión de IC particulados (hematíes recubiertos con anticuerpos) se ha demostrado "in vitro" e "in vivo" (103). Para este tipo de IC la unión y la fagocitosis están relacionadas con la cantidad de C3 unido (103). Incluso "in vitro" el complemento incrementa la unión y subsiguiente degradación de IC solubles y A-IgG por macrófagos (102,177).

El número de moléculas de C3b por agregado determinaba el grado de aumento de la degradación de los agregados de IgG2 solubles. La inhibición de la degradación ocurría cuando el C3b estaba presente en los agregados, pero no había receptores para el C3b en los macrófagos (33). En estos casos probablemente el C3b inhibía la degradación interfiriendo la interacción entre los Fc de los A-IgG y los receptores Fc (33). Según Daha, por tanto, el complemento facilita la unión de IC sin alterar la velocidad de endocitosis.

Para otros autores, sería posible que los receptores C3b de las células de Kupffer pudieran promover la fagocitosis de IC sin la ayuda de los receptores Fc (166). Esto ocurriría en situaciones de estimulación de dichas células (135). Así, se ha visto que la fagocitosis mediada por complemento es realizada por macrófagos peritoneales estimulados, pero no por los no-estimulados, aún cuando estas últimas células unen ávidamente hematíes recubiertos por IgM y complemento (12). También otros autores señalan que los receptores C3b facilitarían la adhesión de inmunocomplejos, mientras que los receptores Fc serían responsables de la endocitosis (12,13).

En resumen, existe discrepancia en la literatura sobre la importancia funcional que pueda tener la interrelación de ambos receptores. En principio no existiría una interrelación funcional apreciable entre ambos receptores, aunque en ciertas circunstancias podría darse. Parece que el tamaño de la matriz del IC o el número de moléculas de los A-IgG serían los factores más importantes en determinar la facilidad de su captación por los receptores C3b de los fagocitos mononucleares (13,28,36).

## 1.5. ESTUDIOS DE LA FUNCION DEL SMF "in vitro"

### 1.5.1. ESTUDIOS DE LA FUNCION DEL SMF EN MODELOS ANIMALES

En animales crónicamente enfermos se han realizado pocos estudios de la función "in vivo" del SMF, proporcionando, además, resultados dispares. Así, en un modelo murino de lupus sistémico eritematoso, en ratones NZB/NZW, la saturación del SMF era un prerrequisito preciso para que se produjera la glomerulonefritis observada durante la evolución espontánea de la enfermedad (80,101). Sin embargo, Fimbloom y Plotz recientemente, utilizando como marcadores IC unidos covalentemente, no observaron diferencias en los aclaramientos entre ratones híbridos F1 NZB/NZW y controles (50). Grace y Brennan tampoco encontraron alteraciones en el aclaramiento de IC (estos autores hicieron las pruebas con dímeros unidos covalentemente de IgG), aunque en el estudio tisular observaron una disminución en la captación de A-IgG por el hígado en las ratas enfermas, y en algunos animales también por el bazo (64)

### 1.5.2. ACLARAMIENTO ESPLENICO DE IC PARTICULADOS

Si bien el interés por el estudio del SMF no es reciente, como tampoco la necesidad de cuantificar su función, los primeros estudios a los que vamos a referirnos proceden de finales de los años cincuenta en que se comenzó a medir el aclaramiento de la circulación de oro coloidal marcado (10). Durante los siguientes años aparecieron modelos de aclaramiento con otros materiales: thorotrast, emulsión lipídica con gotas de triglicéridos y albúmina humana agregada marcada (11,54). En general los enfermos reumatológicos, inflamatorios mostraban un incremento en la función del SMF (54).

A mediados de los años setenta Frank y cols comenzaron a estudiar en cobayas el aclaramiento de hematíes marcados, recubiertos con anticuerpo y componentes del complemento (54). Los hematíes recubiertos con IgG mostraban una desaparición progresiva de la circulación. Los hematíes sin anticuerpo tenían una vida normal. Las células con anticuerpo desaparecían en el bazo. La activación del complemento aceleraba el aclaramiento (54).

Posteriormente, el mismo grupo a comienzos de esta década aplicó la misma metodología en el estudio de ciertas enfermedades humanas, concretamente en la anemia hemolítica autoinmune (54,57). Estos estudios dieron lugar a un intenso desarrollo de los métodos para valorar la capacidad funcional de los receptores Fc y C3b del SMF.

Estudios "in vivo" de pacientes con trastornos autoinmunes, con la misma metodología, han comprobado un aclaramiento retardado en: lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, crioglobulinemia, vasculitis, etc (34,74,105,142,160). En la artritis reumatoide, los resultados han sido discordantes, encontrando algunos autores una función disminuida (77,178), mientras que otros la encuentran normal (62,121).

En general, el aclaramiento defectuoso está en relación con la presencia de IC circulantes y la actividad de la enfermedad (74,105). Claramente, sin embargo, la presencia de IC como único factor, no es suficiente para bloquear el SMF (160). Lawley y cols comprobaron que incluso, los individuos con el haplotipo HLA B8/DRW3 (haplotipo que predispone a diversas enfermedades autoinmunes), sin IC circulantes, tenían un aclaramiento defectuoso (53,106,180). Un déficit genético de los receptores C3b podría ser responsable del aclaramiento

disminuido de IC en el lupus eritematoso sistémico (179). El mismo fenómeno ha sido observado en ratones autoinmunes (119). Esta disminución de receptores, sin embargo, no ha sido confirmada "in vitro" por Fries (56).

Los resultados previamente mencionados provienen de estudios hechos con una misma metodología que, aunque pueda ser utilizada como un índice de la función del SMF, existen razones por las que se puede dudar sea la más adecuada para el estudio de este sistema.

En primer lugar, lo que medimos con esta técnica es la función esplénica para eliminar hematíes recubiertos con anticuerpos, es decir IC particulados. Hay que tener presente, que en muchas enfermedades autoinmunes humanas la función esplénica está alterada (57). En general, en todos los estados de hemólisis crónica el SMF se hipertrofia. Tanto en el lupus eritematoso en actividad, como en la artritis reumatoide se produce una disminución de la vida de los hematíes por destrucción periférica incrementada (57). Por otro lado, los IC solubles, son eliminados por el hígado no por el bazo (5). Además, tenemos insuficientes conocimientos sobre la cinética de los IC en la enfermedad lúpica humana ya que, por razones obvias de carácter ético, es imposible la realización de estudios secuenciales y frecuentes en el hombre.

### 1.5.3. FUNCION MONOCITARIA EN LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES HUMANAS

Por las razones previamente mencionadas se ha intentado afrontar el estudio del SMF en el hombre con otras técnicas. Una de las más utilizadas en los últimos años se basa en la investigación de los monocitos periféricos (57,107). Ya hemos comentado previamente los



inconvenientes de utilizar estas células como marcadores de la función, en un determinado momento, del resto del SMF. Los factores positivos son que, además de compartir otras propiedades con el resto del SMF, son células precursoras y fácilmente obtenibles para investigación, hecho que permitiría realizar estudios repetitivos y prolongados (8).

Los estudios de los monocitos en enfermedades autoinmunes humanas han proporcionado resultados muy dispares. En la artritis reumatoide algunos autores han observado una función fagocítica normal (9). Otros han encontrado un incremento en el número de receptores Fc, sobre todo en enfermos con afectación extraarticular (19), de la fagocitosis y de la actividad metabólica (95). Respecto a la citotoxicidad mediada por anticuerpo ha habido resultados contrapuestos: unos autores la encuentran elevada (79), y otros descendida (9). Hoch encontró un aumento de la unión y de la fagocitosis de hematíes recubiertos con IgG, mientras que los enfermos sometidos a tratamiento con corticosteroides tenían estas funciones disminuidas (79). Sin embargo, la misma autora no encontró diferencias con respecto a controles en la captación de A-IgG (79).

En el estudio de los monocitos en el lupus eritematoso sistémico también se han alcanzado resultados dispares. Svensson utilizando una prueba "in vitro" de fagocitosis de levaduras por los monocitos, observó que éstos eran efectivos en la fagocitosis, pero que el suero de los enfermos lúpicos inhibía esta actividad (167a). También se ha descrito una disminución (96), así como, un aumento del número de receptores (99) y de la unión y endocitosis de hematíes recubiertos con IgG (97). Este último autor encontró una disminución de la fagocitosis no mediada por mecanismos inmunes (98).

## 2. OBJETIVOS

1. La eliminación específica de IC de la circulación por el SMF, vía los receptores Fc de la IgG, es uno de los factores claves para la comprensión de la patogenia de las enfermedades por inmunocomplejos. En animales crónicamente enfermos se han realizado muy pocos estudios, proporcionando, además, resultados dispares. El primer objetivo de esta Tesis fue estudiar las pruebas de aclaramiento de agregados de IgG marcados con  $^{125}\text{I}$ , así como, su variación con respecto al nivel de IC circulantes en un modelo de enfermedad crónica por IC.

2. El hígado es la principal víscera implicada en la captación de IC de la circulación, por lo que su estudio parecía imprescindible para poder analizar las causas de la saturación del SMF en la enfermedad crónica por IC en la rata. Esta situación nos llevó a estudiar la función de los receptores Fc en las células de Kupffer, "in vitro", en una situación de sobrecarga del SMF, como la producida en la enfermedad crónica por IC. En este sentido estudiamos la unión de los receptores Fc de las células de Kupffer a agregados de IgG, en diferentes condiciones. Por último, comprobamos las capacidades endocíticas y fagocíticas de estas células con A-IgG solubles.

3. Existen varias razones para sospechar que el aclaramiento de hematíes recubiertos por anticuerpos no es el método adecuado para medir la función global de los receptores Fc del SMF. El tercer objetivo de la presente tesis consistió en buscar un método de fácil realización en células periféricas, concretamente monocitos, que nos

permitiese obtener un índice adecuado del funcionamiento de los receptores Fc del SMF. Para lo cual comparamos la función de los receptores Fc de los monocitos y de las células de Kupffer (célula fija del SMF), en la enfermedad crónica del suero en las ratas.

### 3. MATERIAL Y METODOS

## TECNICAS GENERALES

### 3.1.1. INMUNODIFUSION DOBLE DIMENSIONAL.

Se utilizó el método de Ouchertlony (139) con placas de agar (Difco-bacto agar noble) al 1% en PBS. En cada placa se hicieron unos pocillos enfrentados de forma que el antígeno y el anticuerpo depositados en ellos pudieran migrar uno hacia el otro y formar una línea o banda de precipitación al alcanzar el punto de equivalencia. Para ello se incubaron 18 horas a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

### 3.1.2. INMUNODIFUSION RADIAL

Se utilizó el método de Mancini y cols (122) con placas comerciales (Kallestad, USA), que ya tenían incorporado el antisuero. Se construyó una curva de calibrado con concentraciones conocidas del antígeno, utilizando al menos tres pocillos. El resto de los pocillos se rellenaron con 5 microl de soluciones de antígeno de concentraciones desconocidas. Se dejó la placa en una cámara húmeda durante 18 horas y se determinó el diámetro de cada anillo con una lupa dotada de una escala micrométrica. Como la concentración del antígeno está relacionada con el diámetro del anillo de precipitación, se representó gráficamente el diámetro obtenido frente al logaritmo de la

concentración del antígeno de las soluciones standard. Los puntos se ajustaron a una recta y se obtuvo la concentración de las muestras desconocidas mediante esta curva de calibrado.

### 3.1.3. INMUNDELECTROFORESIS

Se realizó por el método de Grabar y Williams (63) utilizando placas de 11 por 15 cm de gel de agarosa al 1,5 % en solución tampón veronal 0,035 M, pH 8,6 (Kallestad). En cada pocillo se pusieron 3 microlitros de la muestra a identificar alternando con un suero humano normal que servía de referencia. A este suero se le añadió una gota de azul de Coomassie para ver la migración de la albúmina. Se corrieron las muestras en una cubeta de electroforesis que tenía un litro de tampón veronal 0,05 M, pH 8,6, durante 1 hora aproximadamente, a una intensidad de 100 voltios. Transcurrido ese tiempo se pusieron 100 microlitros de diferentes anticuerpos específicos en las seis trincheras disponibles y se incubaron durante 18 horas en una superficie plana, a temperatura ambiente y en una atmósfera saturada de humedad. Después se observaron los arcos de precipitación y se procedió a la tinción. Para ello las placas se lavaron con una solución salina 0,15 M, pH 7,3, tres veces durante 24-48 horas, para eliminar las proteínas no precipitadas. Se trasladaron luego a un recipiente con agua destilada y se agitaron durante 4-6 horas para eliminar el ClNa del gel. Se dejaron secar a temperatura ambiente hasta obtener una fina película de agarosa y se tiñeron cubriéndolas con una solución de azul brillante de Coomassie al 0,05% durante un par de minutos. Después se

decoloraron con una solución de etanol al 95% y ácido acético al 5% durante 30-60 minutos, hasta que sólo quedaron teñidas las bandas de precipitación.

### 3.2. PURIFICACION Y AISLAMIENTO DE LA IgG DE RATA

Se utilizó el método de Reif (150). La IgG se obtuvo del suero de 30 ratas normales, de raza Wistar, que se diluyó al 1/2 con PBS y se precipitó con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 50%, pH 7,4. Las proteínas precipitadas (fracción gamma-globulínica) se centrifugaron, redisolviéron y posteriormente se dializaron frente a tampón fosfatos 0,001 M, pH 7,5, sometiéndose a una cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna de DEAE celulosa (DE-52 Whatman) equilibrada con tampón fosfatos 0,001, pH 7,5 (5 gr de DE-52 por cada ml de suero). La preparación purificada se concentró a 7,8 mg/ml.

La pureza de la IgG se comprobó por inmunodifusión doble dimensional y electroforesis a la concentración de 7,8 mgr/ml. La concentración de la IgG se determinó por inmunodifusión radial.

### 3.3. PREPARACION DE AGREGADOS DE IgG DE UN TAMAÑO DETERMINADO

#### 3.3.1. MARCAJE DE IgG POR EL METODO DE LA CLORAMINA T

Se utilizó el método de Hunter y Greenwood (66,86) con las modificaciones de McCOnahey Y Dixon (117) para pruebas biológicas en las que se necesitan actividades específicas bajas y un mínimo de desnaturalización.



Se incubaron de 6 a 7 mg de IgG de rata, en un volumen de 1 ml de tampón de fosfatos 0,5 M, pH 7,3 con 1 mCi de  $^{125}\text{I}$  (disuelto en 20 microlitros de tampón fosfatos 0,05M, pH 7,3) y 50 mgr de cloramina T a una concentración de 1 mgr/ml, durante 40 segundos a temperatura ambiente y 1 min a 4 grados C. Transcurrido este tiempo se hizo parar la reacción añadiendo 50 microlitros de metabisulfito sódico (1 mgr/ml) y 200 microlitros de IK, 1 M, con BSA al 1%.

### 3.3.2. AGREGACION DE LA IgG

La IgG marcada previamente con  $^{125}\text{I}$ , a una concentración de 7,8 mgr/ml, se agregó calentándola durante 30 minutos a 63 grados C. Posteriormente se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 15 minutos para eliminar los agregados insolubles

La separación de los agregados de IgG marcados con  $^{125}\text{I}$  de la IgG no agregada se llevó a cabo mediante cromatografía utilizando una columna de ultragel ACA 22(LKB) equilibrada con TBS a pH 7,4, conteniendo BSA al 0,5% para evitar la autoagregación de la IgG (89). Se obtuvieron agregados solubles de un tamaño aproximado a  $3 \times 10^6$  daltones, que fueron almacenados en alícuotas a -20 grados C.

El tamaño, homogeneidad y estabilidad de los agregados se revisó mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

### 3.3.3. ULTRACENTRIFUGACION EN GRADIENTE DE SACAROSA

El gradiente se realizó mediante un formador de gradientes (Isco,USA) en tubos de nitrato de celulosa de 5 ml de volumen (Beckman). La sacarosa se disolvió en tampón tris-CLH, 0,15 M, pH 7,4. Se aplicaron alícuotas de 50 microlitros de los agregados solubles. Se centrifugaron a 170000 g durante 2 horas a 4 grados C, en una ultracentrífuga Spinco L-2 de Beckman con un rotor SW-50. Se utilizaron como marcadores IgM (coeficiente de sedimentación 19 S), IgG (7S) y albúmina sérica bovina (4,5S). Se recogieron fracciones de 200 microlitros a partir del final del tubo. A cada una de las fracciones se le añadieron 1,5 ml de PBS a pH 7,5 y se leyeron en un espectrofotómetro a 280 nm de longitud de onda. Se contaron las c.p.m. de cada fracción en un contador gamma. Para el cálculo del coeficiente de sedimentación se utilizó el método de Martin y Ames (128):

### 3.4. MODELO DE ENFERMEDAD CRONICA POR INMUNOCOMPLEJOS

#### 3.4.1. INDUCCION DE LA ENFERMEDAD

La enfermedad se provocó en 60 ratas Wistar de un peso aproximado de 200 gr, con una modificación de las técnicas previamente utilizadas (153). Se inyectó una dosis subcutánea de 5 mgr de ovoalbúmina disuelta en 250 microlitros de adyuvante completo de Freund y 250 microlitros de suero fisiológico. A las tres semanas se administró, por la misma vía, la misma cantidad disuelta en adyuvante incompleto de Freund. Al cabo de una semana y, diariamente, se administraron 10 mgr de ovoalbúmina intraperitonealmente, disueltos en 0,5 ml de suero fisiológico.

Al cabo de las 3 o 4 semanas de haber iniciado la inmunización intraperitoneal se comenzaron a hacer proteinurias de la orina recogida durante 18 horas. Se utilizó el método del sulfosalicílico para la determinación de la proteinuria.

#### 3.4.2. ESTUDIOS ANATOMOPATOLOGICOS

Las muestras para los estudios de inmunofluorescencia renal y hepática fueron cortadas en secciones de 3 micras con un criostato y después depositadas en un portaobjetos. Posteriormente se incubaron con antisueros comerciales anti-IgG y anti-C3 de rata conjugados con fluoresceína (Cappel Laboratories), a una dilución 1/10 en PBS, durante 45 minutos en una cámara húmeda y a temperatura ambiente. Después se lavaron varias veces y se observaron en un microscopio de inmunofluorescencia.

#### 3.5. AISLAMIENTO DE CELULAS

##### 3.5.1. SEPARACION Y PURIFICACION DE MONOCITOS CIRCULANTES

Se extrajo la sangre de las ratas con jeringas de plástico heparinizadas, a través de la Aorta. Se diluyó 1/2 con PBS. Las células mononucleares fueron separadas mediante centrifugación en gradiente de densidad con lymphoprep (Nyegaard and Co. A/S). Sobre 3 ml de lymphoprep se añadieron 6 ml de sangre diluida a 1/2 en PBS centrifugándose a 1800 r.p.m. durante 30 minutos a 4 grados C.

Para obtener una población enriquecida de monocitos, y basándonos en la capacidad de estas células para adherirse al plástico, se incubaron 500.000 células, recogidas de la interfase, en placas de cultivo de 24 pocillos de 16 mm de diámetro (placas Costar), durante 2 horas, a 37 grados C, en una atmósfera saturada de humedad con un 5% de CO<sub>2</sub>, eliminando las células no adherentes con 2 lavados. La viabilidad contrastada por tinción con azul tripán fue mayor del 90%.

### 3.5.2. SEPARACION DE CELULAS PARENQUIMATOSAS Y NO PARENQUIMATOSAS HEPATICAS

Se utilizó el método de Seglan (159) ligeramente modificado. A ratas Wistar, hembras, de un peso aproximado de 200 gr anestesiadas con éter, se les perfundió el hígado mediante un catéter de teflon (Angiocath, Desert, Med. Inc.) a través de la Porta, durante unos 5 min, a una velocidad de 25 ml/min, con una solución de TBH, pH 7,4 y 0,15 M, a 37 grados C, saturada de oxígeno y sin calcio. Después se perfundió con TBH pH 7,4 a 37 grados C, saturado de oxígeno, conteniendo 2,5 mM de calcio, 0,5% (p/v) de colagenasa (tipo I, Sigma), 0.04% (p/v) de inhibidor de tripsina (Sigma), durante 30 min a una velocidad de 25-50 ml/min. Finalizada la perfusión con colagenasa se hizo una filtración a través de una gasa de algodón, centrifugándose el filtrado a 60 g durante un min a 4 grados C. El precipitado, donde se encontraban las células parenquimatosas, se resuspendió en TBH-BSA al 1%, pH 7,4, 0,15 M y se volvió a centrifugar a 60 g durante un min a 4 grados C. Finalmente se resuspendieron en TBH-BSA al 1%.

El primer sobrenadante, que incluía a las células no parenquimatosas, se centrifugó dos veces a 1000 r.p.m. durante 10 min a 4 grados C, en TBH-BSA al 1%. Resuspendiéndose al final en el mismo tampón.

Los hepatocitos se identificaron por su tamaño y características morfológicas. La viabilidad contrastada por tinción con azul tripán fue mayor del 85% en hepatocitos y 90-95% en células no parenquimatosas.

La contaminación de hepatocitos en la suspensión de células no parenquimatosas, y la de células no parenquimatosas en la preparación de hepatocitos, determinadas contando 100 células de cada preparación, fue menor del 1%.

### 3.5.3. PURIFICACION DE LAS CELULAS DE KUPFFER

Para obtener una población enriquecida de células de Kupffer, y basándonos en la capacidad de dichas células para adherirse al plástico, incubamos en placas de poliestireno de 24 pocillos de 16 mm de diámetro (Costar, Cambridge) 500.000 células no parenquimatosas, durante dos horas a 37 grados C, en una atmósfera saturada de humedad con una concentración al 5% de CO<sub>2</sub>. Después se lavaron tres veces las placas con Tris completo con BSA al 1% para eliminar las células no adheridas (entre 40-60%).

## 3.6. ESTUDIOS DE LA FUNCION DEL SISTEMA MONONUCLEAR FAGOCITICO "IN VIVO"

### 3.6.1. ACLARAMIENTO SANGUINEO DE LOS A-IgG MARCADOS CON <sup>125</sup>I

Se inyectaron en la vena yugular 40 microgramos de A-IgG marcados con  $^{125}\text{I}$  en 0,25 ml de TBS-BSA en las ratas previamente anestesiadas con éter. Las muestras sanguíneas se obtuvieron de la arteria de la cola de la rata a cada minuto durante el primer cuarto de hora, posteriormente cada 2 o 3 minutos hasta la media hora y, por último, cada 10 minutos. A la hora del inicio de la prueba, se sacrificó al animal. Las muestras sanguíneas se recogieron directamente en micropipetas calibradas y heparinizadas (Dade Diagnostic, Inc). Posteriormente cada micropipeta fue centrifugada, midiéndose el hematocrito y cortándola a través de la interfase hematies/suero. El suero y los hematies fueron contados por separado en un contador gamma.

El aclaramiento sanguíneo de la sustancia inyectada se ajusta a una función exponencial, siendo la tasa de aclaramiento dependiente de la dosis inicial, proporcional a la concentración en sangre e inversamente proporcional a la cantidad ya fagocitada. Representando gráficamente el logaritmo del % de la dosis en sangre frente al tiempo obtendremos una recta cuya pendiente  $K$  nos dará una idea de la tasa de aclaramiento. Para cada sustancia se obtiene la ecuación de la recta:

(1)  $Y = \log S = Kt + \log S_0$ , donde  $S$  es el porcentaje de la sustancia en un tiempo determinado,  $S_0 = 100$  para  $t=0$  (ordenada en el origen),  $K$  es la pendiente de la recta y  $t$  es el tiempo.

En su forma exponencial:

(2)  $S = S_0 10^{-Kt}$ ; diferenciando respecto al tiempo obtendremos la velocidad de aclaramiento:  $V = dS/dt = -2,3026 K S_0 10^{-Kt}$ . Para  $t=0$ ,

(3)  $V=dS/dt=2,3026KSo$ . De esta forma la velocidad de aclaramiento se calculó para cada sustancia al  $t=0$ .

De (1)  $K= \log S - \log So/t$ , nos da la tasa de aclaramiento, y

De (3)  $t_{1/2}=0,693/2,3026K$ , llamada vida media, representa el tiempo al cual la mitad de la dosis inyectada ha sido aclarada de la circulación.

Las pruebas de aclaramiento de A-IgG se realizaron en un grupo de ratas enfermas a la 1/2 hora de haberles inyectado la ovoalbúmina intraperitonealmente. En otro grupo a las 18 horas de la inyección de ovoalbúmina.

### 3.6.2. LOCALIZACION TISULAR DE LOS A-IgG

A la hora de haber inyectado los A-IgG por la yugular en ratas enfermas y, en ratas controles, se sacrificaron los animales mediante exanguinación bajo anestesia con éter. Se extrajeron el hígado, bazo, riñón, pulmones; se pesaron y se contaron en un contador gamma, así como un trozo de piel. Lo mismo se hizo con otro grupo de ratas que fueron sacrificadas a los 5 minutos de haberlas inyectado los A-IgG. La localización tisular se calculó según el porcentaje depositado con respecto a la dosis inyectada y a la encontrada en el primer minuto del aclaramiento sanguíneo.

### 3.6.3. CAPTACION DE A-IgG POR HEPATOCITOS Y CELULAS NO PARENQUIMATOSAS.

A los 5 y 60 minutos después de inyectar los A-IgG en la yugular se separaron y se aislaron los hepatocitos y células no parenquimatosas, según el método descrito previamente.

Se contaron 300.000 células en un contador gamma, para determinar el porcentaje unido a cada tipo celular

### 3.7. ESTUDIO DE LOS RECEPTORES Fc PARA LA IgG "IN VITRO"

#### 3.7.1. CINÉTICA Y CONSTANTE DE AFINIDAD DE LA UNIÓN DE LOS A-IgG A HEPATOCITOS, CELULAS DE KUPFFER Y MONOCITOS.

Se incubaron 300.000 hepatocitos en TBH-BSA al 1% con una concentración fija de A-IgG marcados (5 microgr), en un volumen final de 200 microlitros a 4 grados C, a diferentes tiempos desde 5 minutos a 2 horas. Igualmente los hepatocitos se incubaron con cantidades variables de A-IgG marcados durante 1 hora a 4 grados. Finalizada la incubación el contenido de cada tubo se centrifugó durante 1 minuto con 200 microlitros de Ficoll al 6% en PBS, en tubos de polietileno de 400 microlitros, especiales para microcentrífuga (Beckman, Instruments). El sobrenadante de la centrifugación se recogió con una micropipeta y tanto el sobrenadante como el precepitado se contaron en un contador gamma.

La unión a células de Kupffer se realizó en placas de cultivo de 24 pocillos de 16 mm de diámetro. Se incubaron 300.000 células adherentes con una concentración fija de A-IgG marcados, en un volumen final de 250 microlitros de TBS-BSA al 1%, a diferentes tiempos, desde 5 minutos hasta 2 horas, a 4 grados C. Igualmente



las células de Kupffer se incubaron con concentraciones variables de A-IgG marcados durante 1 hora a 4 grados C. Transcurrido el tiempo de incubación se lavó la placa varias veces con el mismo tampón y se añadió Tritón x100 al 1% (0,5 ml por pocillo), raspándose posteriormente la placa con una goma dura con el fin de liberar las células adheridas. Finalmente el sobrenadante se recogió y se contó en un contador gamma.

El aislamiento de monocitos se realizó según lo comentado previamente, estudiándose posteriormente la unión de A-IgG, incubando la proteína con monocitos adheridos a placas de cultivo, similares a las utilizadas con las células de Kupffer. El resto de la experiencia para calcular la constante de asociación se realizó según lo señalado para las células de Kupffer.

### 3.7.2. CALCULO DE LA CONSTANTE DE ASOCIACION

El cálculo de la constante de asociación se hizo usando la ecuación propuesta por Shiu y Friesen (164), para una reacción de segundo orden reversible.

#### 3.7.3.a CARACTERIZACION DE LA ESPECIFICIDAD DE LA UNION DE LOS A-IgG A HEPATOCITOS Y CELULAS DE KUPFFER

Para determinar la especificidad de la unión de  $^{125}\text{I}$ -A-IgG a hepatocitos y células de Kupffer se hicieron diversas pruebas de inhibición con diferentes proteínas no marcadas radiactivamente.

Los hepatocitos o las células de Kupffer se incubaron una hora, a 4 grados C, con una cantidad fija de proteína marcada y concentraciones variables de proteína sin marcar. Igualmente para determinar si la unión se llevaba a cabo a través del fragmento Fc de la IgG, se hicieron diversos ensayos de inhibición con el fragmento F(ab') de la IgG.

### 3.7.3.b CALCULO DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD

Una vez calculado el tiempo en que se lograba el equilibrio de la unión de las proteínas a las células, se calculó la constante de afinidad por la ecuación de Scatchard, con las correcciones para la unión no específica de Charnes y McGuire (23,156).

$$r/c = nK - rK$$

donde: r = número de moles unidos a células en el equilibrio.

c = número de moles libres.

n = número de sitios de unión.

K = constante de afinidad.

Se representó gráficamente r/c frente a r.

### 3.7.4. ESTUDIO DE LA EXPRESIVIDAD DE LOS RECEPTORES Fc MEDIANTE LA FORMACION DE ROSETAS

#### 3.7.4.A. PREPARACION DE LAS PARTICULAS DE POLIACRILAMIDA RECUBIERTAS CON IgG.

Se realizaron otras pruebas para valorar la expresividad de los FcR en hepatocitos y Kupffer, mediante partículas de poliacrilamida recubiertas con IgG de rata.

Las partículas de poliacrilamida de 1 a 3 micras de diámetro (Affigel 701 Bio-Rad) se resuspendieron en agua destilada y se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 15 minutos. Finalizada la centrifugación se resuspendieron en agua destilada. Se incubaron 0,5 ml de esta suspensión con 1 ml de IgG (7,8 mg/ml) y se ajustó el pH a 5, añadiéndose a continuación 10 mgr de EDAC y volviéndose a ajustar el pH a 5, e incubándose durante 4 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación se lavaron dos veces, centrifugándose a 3000 r.p.m. durante 15 minutos, y resuspendiéndose al final en 1,5 ml de PBS con azida. Para comprobar el porcentaje de IgG unida a las partículas se recogió el sobrenadante de la primera centrifugación y se midió en un espectrofotómetro a 280 nm de longitud de onda.

#### 3.7.4.B. TECNICA DE ROSETEO

Para realizar la prueba de las rosetas en hepatocitos se mezclaron, en una proporción 1:50, 300.000 células con partículas recubiertas con IgG en un volumen de 250 microlitros, durante 5 minutos a 37 grados C y, posteriormente 1 hora, a 4 grados. Se resuspendieron suavemente, se añadió colorante basófilo y se contaron en un hematocitómetro. Se contaron al menos 100 células, considerándose positivas las que tenían pegadas 3 o más partículas.

Este mismo procedimiento se utilizó para las células de Kupffer y monocitos, que fueron adheridos previamente a placas de poliestireno de 2x3 cm (Costar, Cambridge).

La especificidad de la unión al receptor se determinó con la incubación de las células de Kupffer y de hepatocitos con partículas de poliacrilamida y A-IgG (300 microg) y se calculó según el porcentaje inhibido.

### 3.8. ESTUDIO DEL CATABOLISMO DE LOS A-IgG POR LAS CELULAS DE KUPFFER "IN VITRO"

#### 3.8.1. CULTIVO DE CELULAS DE KUPFFER

Una vez obtenida una población enriquecida de células de Kupffer, según se ha indicado previamente(3.5.3.), éstas se cultivaron durante 18 horas en RPMI 1640, suplementado con BSA al 1%, penicilina (100 unidades/ml), estreptomycin (100 microg/ml), 2,4 mM de glutamina y 2,5 mM de Hepes en las mismas placas de poliestireno, a 37 grados C, en una atmosfera saturada de humedad, con una concentración al 5% de CO<sub>2</sub>. Al cabo de este tiempo, el 80% de las células adherentes fueron capaces de fagocitar zymosán y partículas de látex. La viabilidad medida por tinción con azul tripán fue del 90%.

#### 3.8.2. UNION, ENDOCITOSIS Y CATABOLISMO DE LOS A-IgG

Las células de Kupffer (300.000) se incubaron con una cantidad fija de A-IgG marcados (5 microgramos) durante diferentes periodos de tiempo, 1, 2, 3, 4 y 5 horas a 37 grados C, en RPMI-BSA en una atmósfera saturada de humedad y un 5% de CO<sub>2</sub>, en un volumen final de 250 microlitros. Finalizado el periodo de cada incubación se recogió el sobrenadante y se precipitó con TCA

al 10%. El porcentaje de A-IgG catabolizados se calculó de la siguiente forma:

$\% \text{ de catabolismo} = \text{cpm del sobrenadante del TCA} \times 100 / \text{cpm de la dosis de } ^{125}\text{I A-IgG.}$

Para determinar el porcentaje de A-IgG unidos a las células, se incubaron las células adheridas con tripsina, 0,25 mg/ml (Merk, Darmstadt) en RPMI a 37 grados C, durante 20 minutos. El sobrenadante de la incubación, conteniendo la radioactividad unida a las células se recogió y se contó en un contador gamma. Las células de Kupffer no se despegaron por el tratamiento con tripsina. La radioactividad que permaneció en las células (captación intracelular y endocitosis) fué medida después de la solubilización con 0,5 ml de tritón x100 al 1%. La radioactividad de cada duplicado se midió en un contador gamma. La variación entre los valores de los duplicados fué siempre menor de un 15%. El  $^{125}\text{I}$  libre en los controles permanecía constante en cada experiencia.

La unión, endocitosis y catabolismo se expresó como porcentaje de la dosis original de A-IgG.

### 3.9. DETECCION DE INMUNOCOMPLEJOS

#### 3.9.1. METODO DE LAS CELULAS RAJI

Se investigó la posible existencia de inmuno complejos circulantes por el método de las células Raji (173), modificado por nosotros para utilizar anti-IgG marcada enzimáticamente, en lugar de la anti-IgG marcada con  $^{125}\text{I}$  (42,78). Los sueros se

diluyeron al 1/4 con Tris-Tirode completo con BSA al 0,5% y glucosa al 0,1%. Se incubaron 30 microlitros del suero diluido con 2 millones de células (en 50 microlitros) durante 45 minutos a 37 grados C. Después las células se lavaron tres veces con el mismo tampón centrifugando a 1000 r.p.m., 10 minutos y se incubaron con anti-IgG marcada con peroxidasa (Nordic) durante 30 minutos a 4 grados C. Después las células se volvieron a lavar tres veces, trasladándose el contenido de cada tubo a un pocillo de una placa de ELISA, añadiéndose 200 microlitros de sustrato (100 mgr OPD/10 ml de metanol), parándose la reacción con 100 microlitros de ácido sulfúrico 4 N. Posteriormente las placas se leyeron en un lector de absorbancias (Titertek Flow).

### 3.9.2. EXPRESION DE LOS RESULTADOS

El análisis estadístico fué realizado según el método de Hall (73). Muestras de sueros de 10 ratas normales se probaron por duplicado en 9 días diferentes. Se escogieron cuatro ratas con media representativa de los valores normales como controles de todos los experimentos. De esta forma se obvió la variación diaria. Con la media de los controles en cada prueba, se estableció un límite de confianza del 95%:

$$U_i = C_i + 2,2697 \sqrt{SE_C^2 + SE_p^2}$$

La expresión que está debajo de la raíz cuadrada representa la suma de las variaciones de la media de los cuatro controles y de los sueros problemas. 2,2697 es el punto más alto de la distribución t de Student para 8 grados de libertad y el 95% de confianza. La media de los duplicados de los sueros problema se

dividió por  $T_i/U_i$  representa la relación fraccional del suero problema para el límite de confianza más alto de la población control. Si  $T_i/U_i$  está por encima de 1,0 el valor del suero problema sobrepasa el límite de confianza del 95% y se considera anormal.

### 3.10. ESTUDIOS ESTADISTICOS

Salvo cuando se señale explícitamente las pruebas estadísticas se hicieron con la  $t$  de Student para datos no emparejados.

#### 4. RESULTADOS



#### 4.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LA IgG

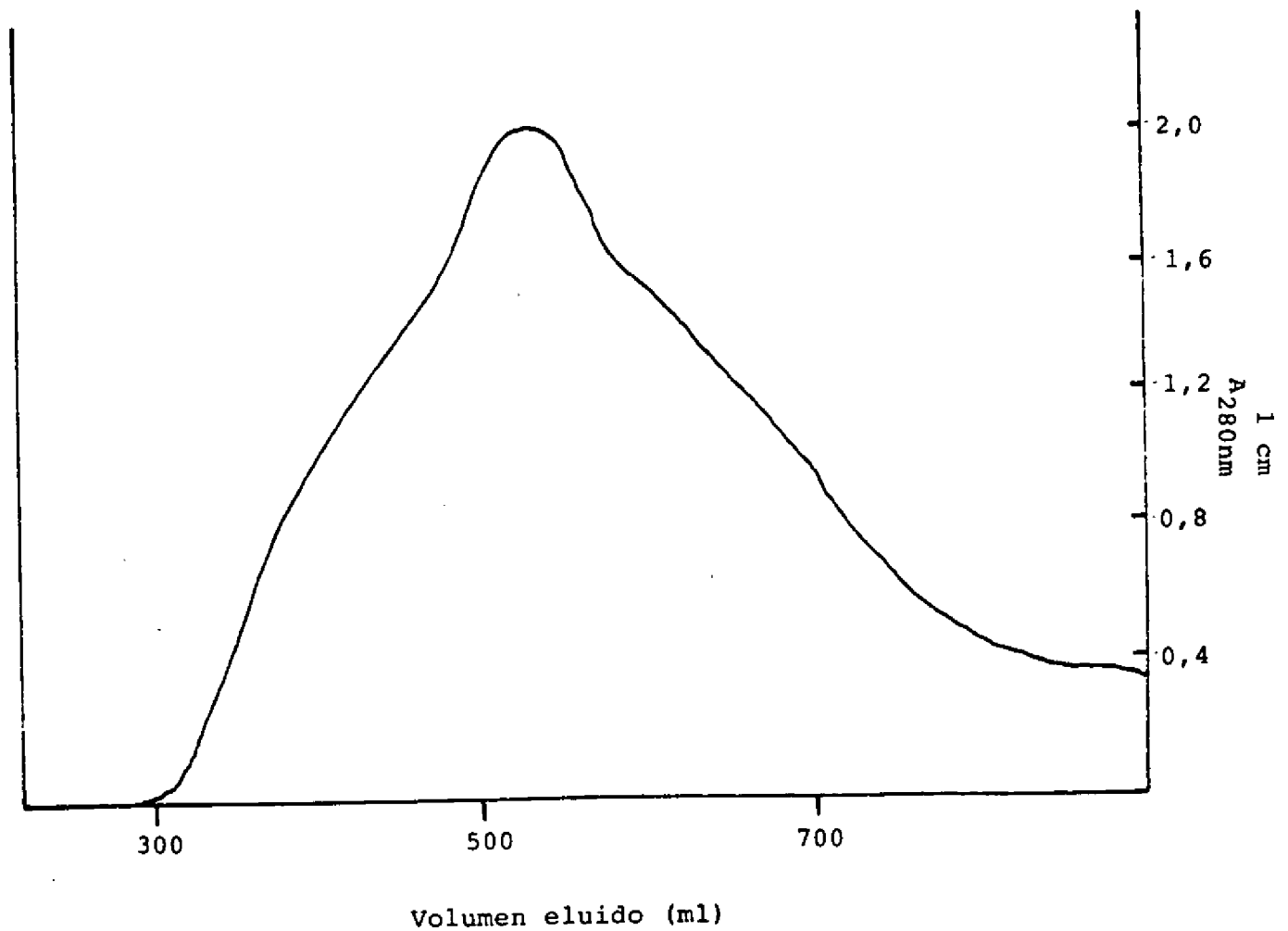
En la Figura 1 se muestra el perfil de elución de la IgG de rata obtenida después de pasar por una columna de celulosa DEAE (DE-52) equilibrada con tampón fosfatos 0,01 M, pH 7,5, un suero de rata precipitado previamente con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 50%, pH 7,4 y equilibrado en el mismo tampón (Figura 1). La IgG se concentró por ultrafiltración hasta una concentración de 7,8 mgr/ml y se comprobó su pureza por inmunolectroforesis con diversos antisueros mono-específicos (anti-IgG, anti-IgM y anti-IgA) y con antisuero total de rata normal, dando un sólo arco de precipitación frente a antisuero de rata normal y frente a un antisuero mono-específico de conejo anti-IgG de rata.

Asimismo se realizó una inmunodifusión doble dimensional frente a un suero de conejo anti-IgG de rata y otro antisuero total de rata normal, observándose una sola banda de precipitación.

#### 4.2. PREPARACION DE A-IgG SOLUBLES, MARCADOS CON $^{125}\text{I}$ , DE UN PESO MOLECULAR DETERMINADO

La IgG se marcó con  $^{125}\text{I}$  con una actividad específica de 0,2 a 0,3 mCi/mg por el método de la Cloramina T (117). Posteriormente se prepararon agregados solubles por calentamiento de la IgG marcada a 63 grados C durante 30 minutos, seleccionando aquéllos que tenían un peso molecular similar, mediante filtración en columna de Ultrogel ACA 22 (Figura 2).

FIGURA 1. Perfil de elución de la IgG de rata de una columna de DEAE (DE-52 Whatman, 5x30 cm), equilibrada con fosfatos 0,015 M, pH 7,5.



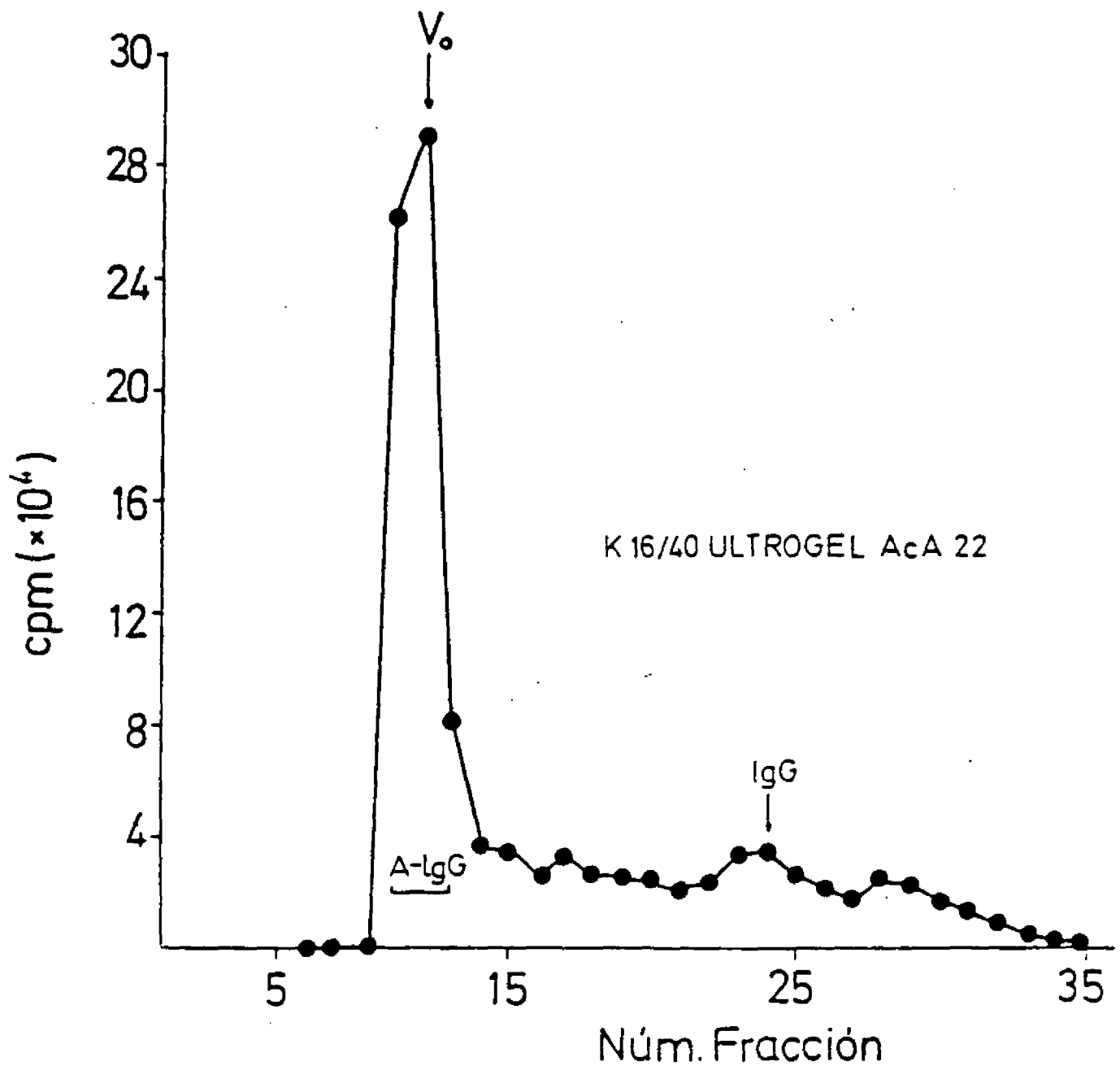


FIGURA 2. Perfil de elución de los A-IgG de una columna de Ultrogel AcA 22 equilibrada con TBS-BSA al 0,5% para evitar la autoagregación. El volumen de exclusión de la columna es para sustancias de un peso molecular mayor de  $3 \times 10^6$  daltones.

El coeficiente de sedimentación se determinó mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (5-40%) a 170.000 g durante 2 horas a 4 grados C, siendo de 30 S (Figura 3). A partir de este coeficiente se estimó el peso molecular aproximado de los A-IgG, que fue de 3.000.000 de daltones.

#### 4.3. DESARROLLO Y EVOLUCION DE LA ENFERMEDAD CRONICA POR INMUNOCOMPLEJOS EN RATAS WISTAR

##### 4.3.1. INDUCCION Y CURSO DE LA ENFERMEDAD

Se comenzó a desencadenar la enfermedad en 60 ratas Wistar hembra (Figura 4). El curso de la misma se caracterizó por el comienzo súbito de la proteinuria, en general a partir de la 4 a 5 semanas del inicio de las inmunizaciones intraperitoneales. En las ratas controles la proteinuria fué de  $8,9 \pm 1,2$  mg/24 horas. . Todas las ratas enfermaron según los criterios expuestos más abajo, mostrando una disminución evidente de la vitalidad

##### 4.3.2. INMUNOFLUORESCENCIA RENAL

Los estudios de inmunofluorescencia renal realizados a partir de la segunda semana de haber comenzado la inyección diaria de ovoalbúmina intraperitonealmente mostraron depósitos mesangiales de IgG (Figura 5). Los estudios realizados posteriormente, a partir de la tercera o cuarta semanas comenzaron a mostrar una proteinuria mayor de 80 mg/24 horas. La inmunofluorescencia mostraba depósitos granulares de IgG y C3 en las paredes capilares del glomérulo y en el mesangio (Figura 6).

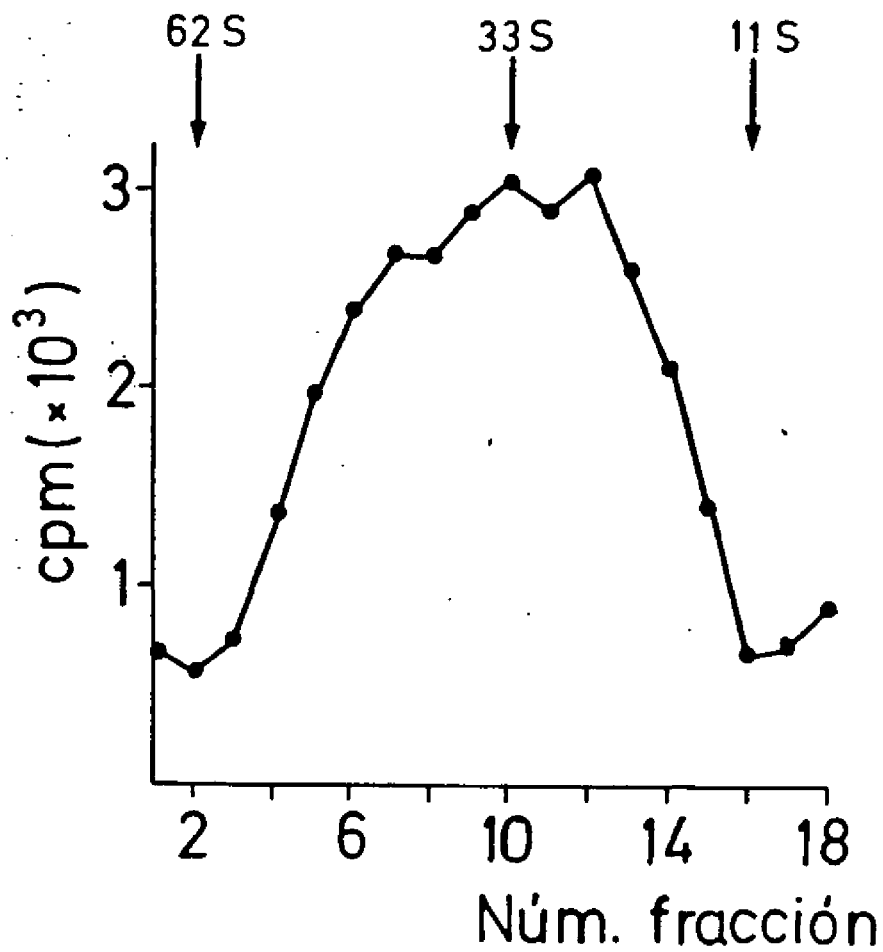
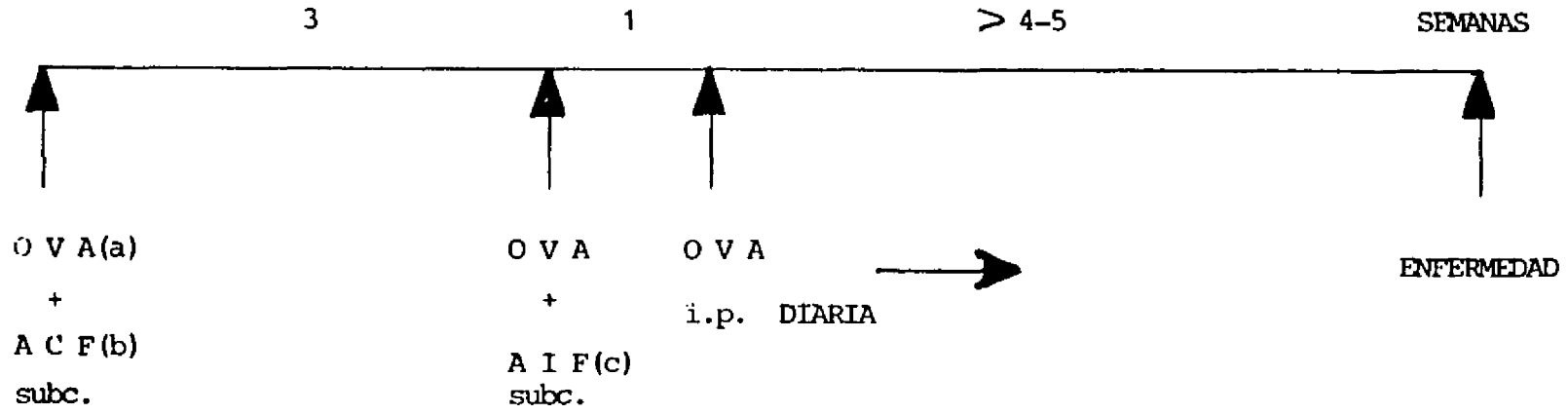


FIGURA 3. Perfil de los A-IgG aislados mediante filtración en Ultrogel ACA 22 y, sometidos a ultracentrifugación a 170.000 g durante 2 horas a 4 grados C, en un gradiente de sacarosa 5-40%. La posición de los marcadores IgA polimérica está indicado: 11S.

FIGURA 4.

DESENCADENAMIENTO DE LA ENFERMEDAD  
 =====



(a) OVA:ovoalbumina ; (b) ACF:adyuvate completo de Freund ; (c) AIF:adyuvante incompleto

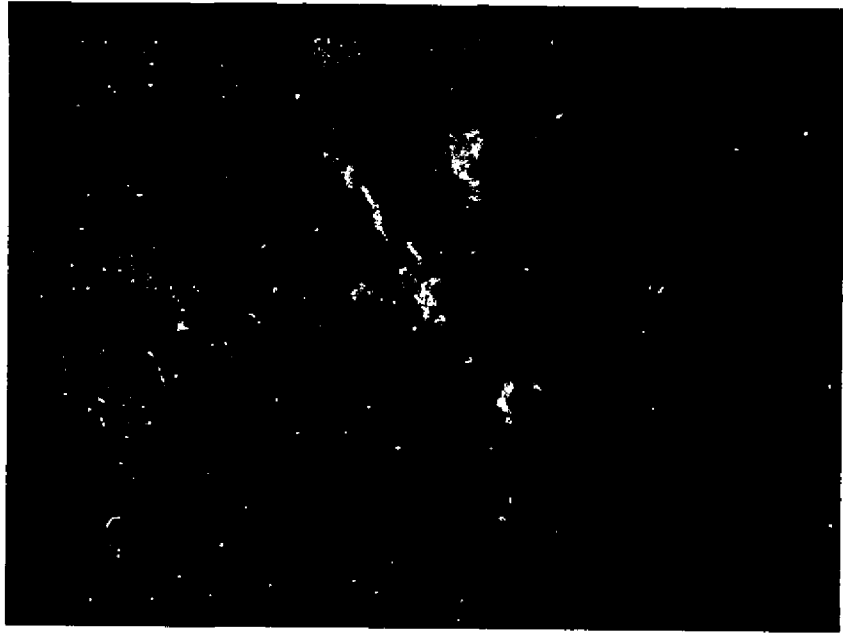


FIGURA 5. Inmunofluorescencia renal positiva mostrando un patrón mesangial, observado al inicio de la enfermedad.

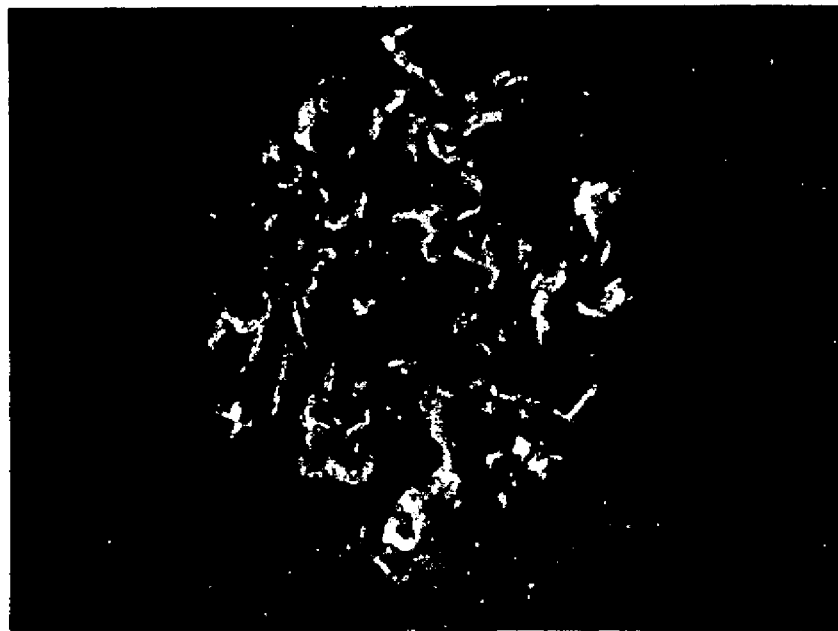
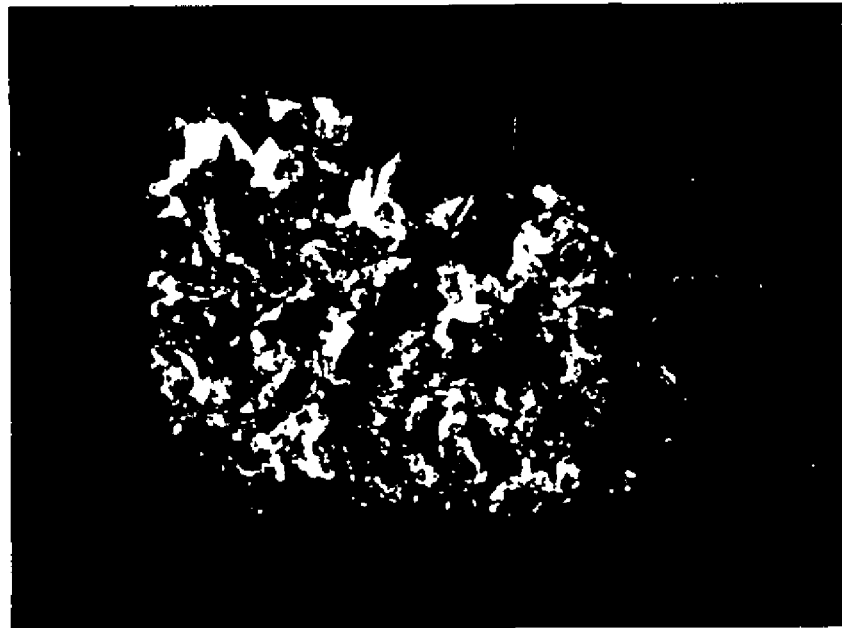


FIGURA 6. Depósito difuso de IgG en las paredes capilares del riñón, detectado con antisuero anti-IgG.  
En la foto de abajo se observa el mismo caso estudiado con antisuero anti-C3.



Todas las ratas que presentaban una proteinuria mayor de 80 mg/24 horas, tenían depósitos granulares de IgG y C3 en las paredes capilares del glomérulo y en el mesangio. Por tanto, fueron éstos los criterios establecidos para considerar que la enfermedad estaba establecida (Tabla 6)

#### 4.4. MANEJO DE LOS A-IgG POR EL SISTEMA MONONUCLEAR FAGOCITICO "IN VIVO"

##### 4.4.1. ACLARAMIENTO SANGUINEO DE LOS A-IgG MARCADOS CON $^{125}\text{I}$

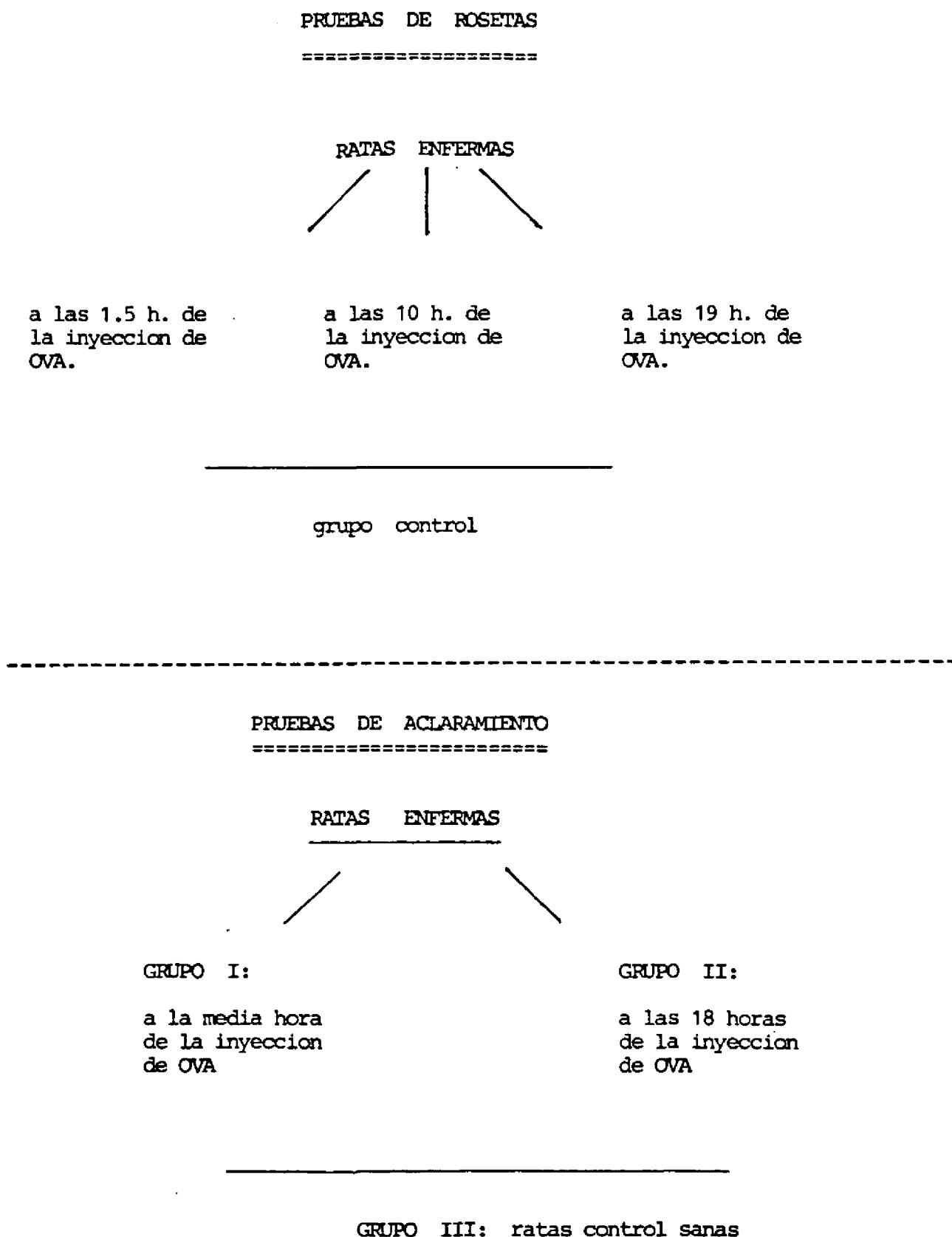
Se inyectaron 40 microgramos de A-IgG marcados, como dosis trazadora, a través de la yugular, para estudiar el aclaramiento de los A-IgG por el sistema mononuclear fagocítico. Las pruebas de aclaramiento se realizaron en seis ratas enfermas, levemente anestesiadas con éter, a la 1/2 hora de la inyección de la ovoalbúmina intraperitoneal según se esquematiza en la figura (Figura 7). Como se observa en la figura 9 las curvas de aclaramiento mostraban una fase de eliminación rápida de A-IgG marcados con  $^{125}\text{I}$  en los primeros 10 a 15 min, estabilizándose posteriormente y alcanzando una meseta hasta los 60 minutos en los que se tomaban las últimas muestras de sangre. La vida media ( $t_{1/2}$ ) del componente de eliminación rápida de los A-IgG marcados fué de  $4,6 \pm 2,3$  minutos significativamente más lenta que en las ratas controles sanas:  $2,4 \pm 0,8$  (Tabla 7 y Figura 8). Se consideró la  $t_{1/2}$  el tiempo necesario para eliminar el 50% del nivel de radioactividad observado al primer minuto del estudio. El porcentaje de A-IgG aclarados cuando la curva

TABLA VI

CRITERIOS DIAGNOSTICOS DE LA NEFRITIS

- PROTEINURIA MAYOR DE 80 mg/18 h (Controles 8.9 + 1.2)
- INMUNOFLOURESCENCIA RENAL POSITIVA
  - DEPOSITOS GRANULARES DE IgG EN EL MESANGIO Y EN LAS PAREDES CAPILARES.

FIGURA 7. Esquema que representa gráficamente el momento en el que se practicaron las pruebas de rosetas, y el aclaramiento de A-IgG, en ratas enfermas, a las que se les seguía inyectando OVA i.p. diariamente.



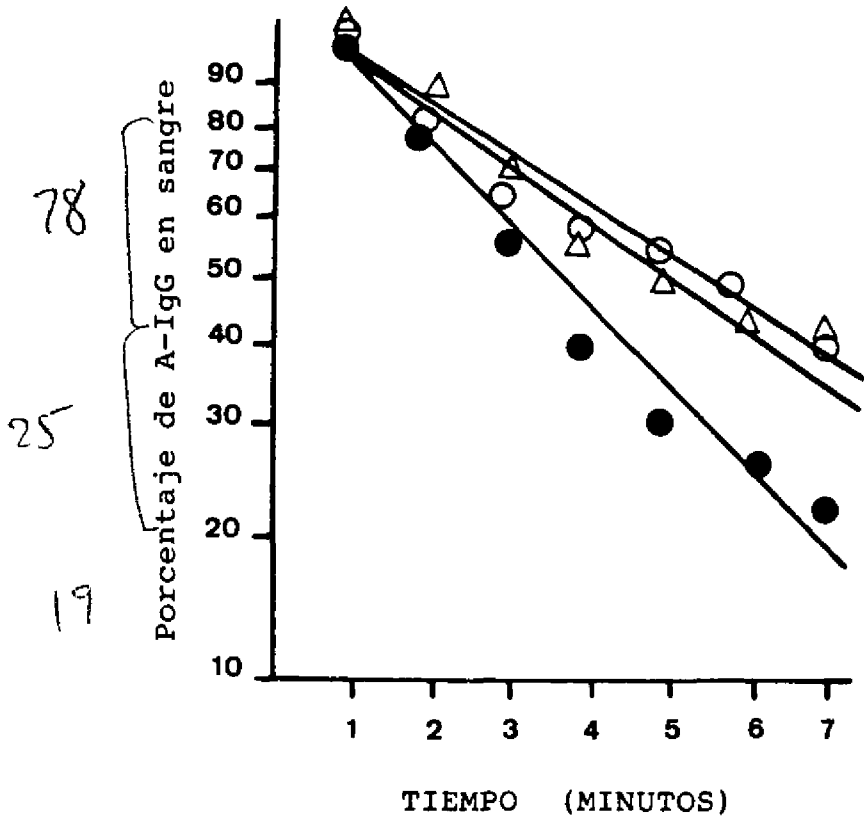


FIGURA 8. Pruebas de aclaramiento. T1/2 del componente rápido de eliminación de A-IgG.

- △ = Grupo I
- = Grupo II
- = Controles

Cada línea corresponde a la t1/2 de un caso representativo de cada grupo de ratas.

*Handwritten note:* d. de una P. h. en 2 puntos

FIGURA 9. Modelo de curvas de aclaramiento de A-IgG. Cada curva es un ejemplo representativo de los diferentes grupos.

- = rata del grupo I
- × = rata del grupo II
- = rata del grupo control

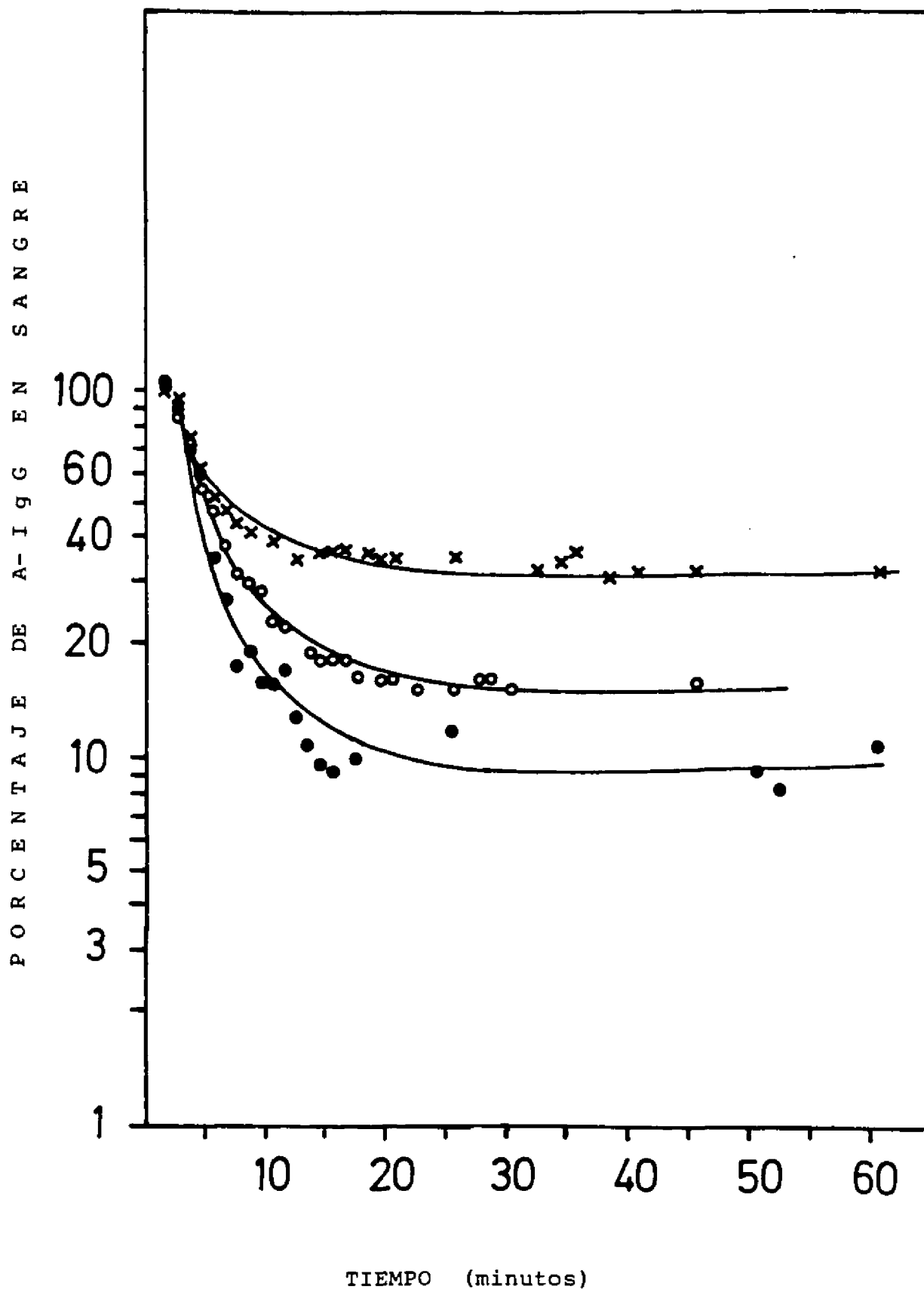


TABLA VII ACLARAMIENTO DE A-IgG MARCADOS CON  $I^{125}$ : VIDA MEDIA (t 1/2)

		Nº DE RATAS	t 1/2 (en minutos)	P. (a)
GRUPO	I (b)	6	4,69 $\pm$ 2,3 (c)	<p>&lt;0,05</p> <p>&lt;0,05</p>
GRUPO	II	6	4,07 $\pm$ 1,2	
GRUPO	III	6	2,40 $\pm$ 0,8	

(a) t de Student para datos no apareados

(b) grupos constituidos según lo descrito en los resultados

(c) media  $\pm$  una desviación standard

de aclaramiento alcanzaba la meseta en las ratas enfermas fue del  $87,30 \pm 8,51 \%$ , similar a la observada en controles  $89,30 \pm 3,53 \%$  (Tabla 8).

Para valorar la dinámica de la función del SMF, y teniendo en cuenta que la disminución de la actividad de los receptores Fc observada tras la inyección de una dosis de inmunocomplejos, se normalizaba a las 18 horas (135), decidimos realizar los aclaramientos a las 18 horas de haber inyectado la ovoalbúmina intraperitoneal. La  $t_{1/2}$  de la fase de eliminación rápida volvió a estar significativamente alargada  $4,1 \pm 1,2$  minutos con respecto a los controles ( $p < 0,05$ ) (Tabla 7 y Figura 8). Por otro lado, el porcentaje de A-IgG aclarados cuando la curva de aclaramiento alcanzaba la meseta estaba significativamente disminuida con respecto a controles  $64,87 \pm 5,75$  vs  $89,30 \pm 3,51$  ( $p < 0,005$ ) (Tabla 8 y Figura 9). El componente lento de la curva de aclaramiento no sufría modificaciones notables a lo largo de la hora que duraba el estudio (Figura 9).

Las c.p.m. contadas en sangre en estos estudios se consideraron que correspondían a A-IgG porque más del 93% de las c.p.m. precipitaban al añadirles ácido tricloroacético al 10%.

#### 4.4.2. CAPTACION TISULAR DE A-IgG MARCADOS

A la hora de haber inyectado los A-IgG marcados con  $^{125}\text{I}$  y de haber iniciado los aclaramientos de A-IgG se sacrificaron a los animales por exanguinación extirpándoles el bazo, hígado, riñones, pulmón y un trozo de piel según lo descrito en el apartado 3.

TABLA VIII ACLARAMIENTO DE A-IgG MARCADOS CON I<sup>125</sup>: PORCENTAJE DE LA DOSIS ACLARADA

		NO DE RATAS	% ACLARADO	% PERSISTENTE EN SANGRE	p(a)
GRUPO I	(b)	6	87,30 ± 8,51 (c) (d)	11,37 ± 9,7	 <0,005
GRUPO II		6	64,87 ± 5,75	31,96 ± 8,7	
GRUPO III		6	89,30 ± 3,5	10,68 ± 3,5	 <0,005

(a) t. de Student para datos no apareados

(b) grupos constituídos según lo descrito en los resultados

(c) media ± una desviación standard

(d) se escogió el punto de la curva en el que el porcentaje de aclaramiento de A-IgG alcanzaba la meseta



La captación por gr de tejido estaba aumentada en pulmón, piel y riñones de los grupos de ratas enfermas con respecto a controles (Tabla 9), aunque sólomente a nivel renal, ambos grupos de ratas enfermas mostraban una captación de A-IgG estadísticamente significativa mayor que los controles ( $p < 0.05$ ). La captación por gr de tejido hepático y esplénico fué similar. Cuando la captación se calculó en valores absolutos (es decir, lo captado por toda la viscera), los resultados fueron similares, existiendo únicamente una diferencia significativa a nivel renal (figura 13). En las ratas del grupo I se observó una cierta correlación entre el porcentaje aclarado de A-IgG marcados y el porcentaje de captación renal de A-IgG marcados.

Los porcentajes de captación más elevados se observaron en hígado y bazo, sin existir diferencias apreciables entre ellos cuando se valoraron por gr de tejido. Sin embargo, en valores absolutos el hígado captaba 14 veces más que el bazo (Tabla 10).

Teniendo en cuenta que la captación y fagocitosis hepática de A-IgG de gran tamaño, como los utilizados por nosotros es rápida, alcanzando sus valores máximos antes de la hora, estudiamos en otro grupo de ratas, la captación hepática a los 5 minutos de haber inyectado los A-IgG marcados. La captación por gr de tejido, respecto a las cuentas totales determinadas en el suero del primer minuto del aclaramiento, fué mayor en las ratas enfermas 19,14 % frente al 15,76 % en ratas control (Figura 11). Estos valores son 6,5 y 5 veces mayores a los observados en las ratas que se estudiaron a la hora (Figura 11). En cualquier caso, la captación hepática en cada rata fué bastante desigual y la diferencia entre los tres grupos no fué significativa.

TABLA IX

CAPTACION POR LOS DIFERENTES ORGANOS DE A-IgG (a)

	BAZO	PULMON	RIÑON	PIEL	HIGADO
GRUPO I (b)	3,78 ± 1,74	0,98 ± 0,03	2,71 ± 1,56*	0,21 ± 0,30	3,55 ± 1,15
GRUPO II	3,83 ± 1,86	1,92 ± 1,51	2,60 ± 0,77*	0,66 ± 0,38	3,03 ± 1,44
GRUPO III	2,47 ± 1,13	0,88 ± 0,22	1,29 ± 0,89	0,39 ± 0,10	3,10 ± 0,92

(a) los resultados vienen expresados en porcentaje captado por gramo de tejido, con respecto a la concentración obtenida en la primera muestra sanguínea.

(b) grupos constituidos según lo descrito en los resultados.

(c) media ± una desviación standard.

\*  $p < 0,05$ .

TABLA X

## CAPTACION DE A IgG POR EL HIGADO Y BAZO (a)

	Nº DE RATAS	BAZO	HIGADO
GRUPO II (b)	6	1,5	22,9
GRUPO III	6	1,5	22,9

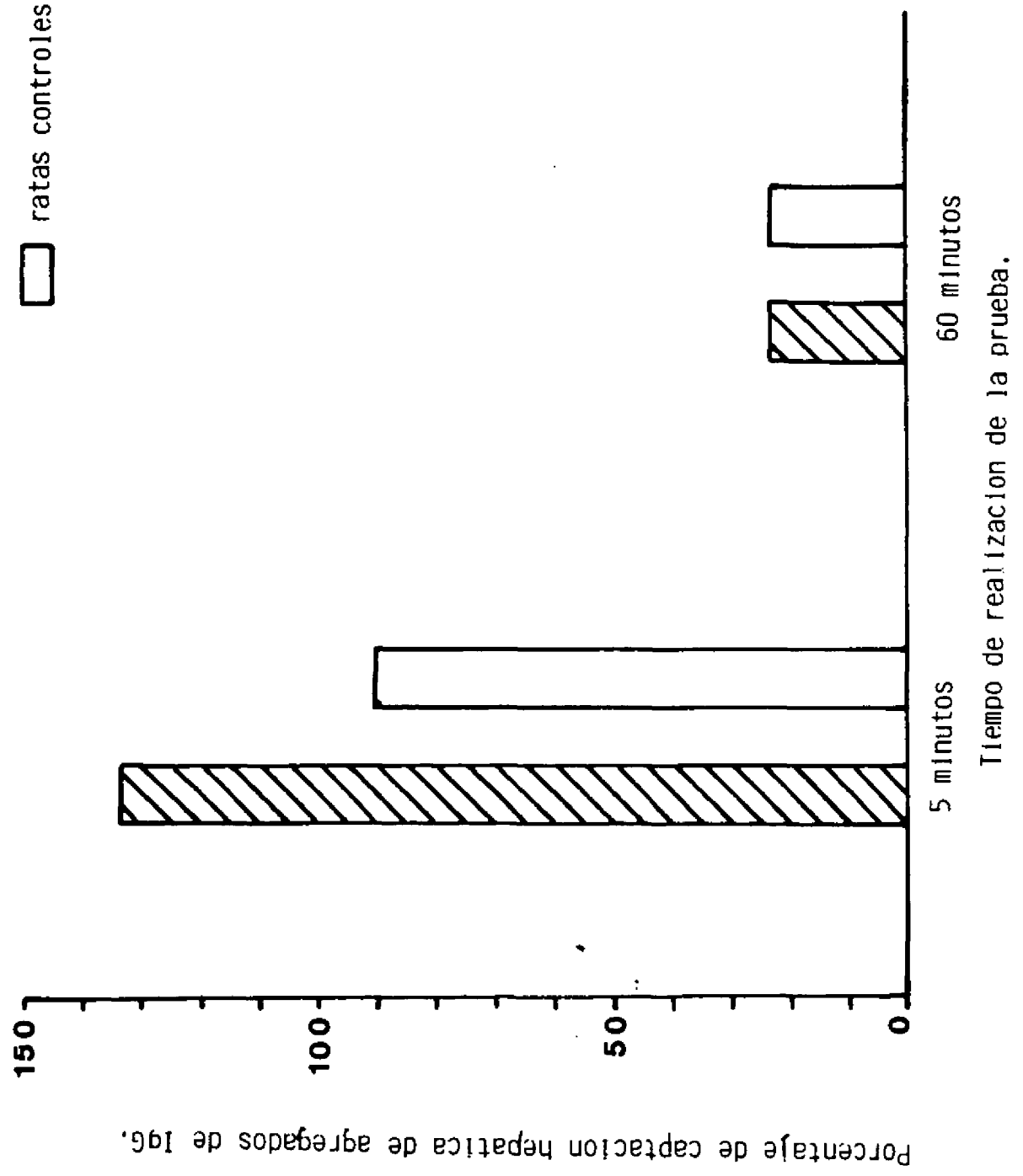
(a) LOS RESULTADOS FUERON EXPRESADOS COMO PORCENTAJE, CON RESPECTO  
A LA CONCENTRACION OBTENIDA EN LA PRIMERA MUESTRA SANGUINEA

(b) GRUPOS CONSTITUIDOS SEGUN LO DESCRITO EN LOS RESULTADOS

FIGURA 11. Porcentaje de captacion hepatica de A-IgG respecto a la concentracion serica, realizado a los 5 y 60 minutos de la inyeccion de los agregados de IgG.

▨ ratas con nefritis

□ ratas controles



#### 4.4.3. CAPTACION "IN VIVO" DE A-IgG MARCADOS POR HEPATOCITOS Y CELULAS NO PARENQUIMATOSAS

Se inyectaron 40 microgramos de A-IgG, a través de la yugular a ratas previamente anestesiadas con éter. A los 5 minutos se les extrajo el hígado, separándose los hepatocitos de las células no parenquimatosas (células de Kupffer y endoteliales fundamentalmente), por el método descrito previamente. La captación en las ratas enfermas fué mayor en las células no parenquimatosas 81% vs 19% que en hepatocitos. En controles los porcentajes fueron más parecidos, 67% vs 33% (Figura 12).

#### 4.4.4. INMUNOFLUORESCENCIA HEPATICA

Los estudios de inmunofluorescencia hepática se practicaron en 12 ratas con antisueros anti-IgG y anti-C3 de rata. Cinco pertenecían al grupo de ratas que se sacrificaron a la hora y media de haber recibido la inyección intraperitoneal de ovoalbúmina (Grupo I); las otras 7 pertenecían al grupo que la habían recibido 19 horas antes (Grupo II). La inmunofluorescencia fué claramente positiva en 4 ratas del primer grupo y en el límite de la positividad en la quinta para el antisuero anti-IgG (Tabla 11 y Figura 13). Por el contrario fué negativa en las 7 ratas enfermas del grupo II (Tabla 11).

El patrón de inmunofluorescencia fué difícil de definir, en unas ratas parecía tener una distribución sinusoidal (figura 13), mientras que en otras parecía más difuso. Todos los estudios para detectar C3 fueron negativos.

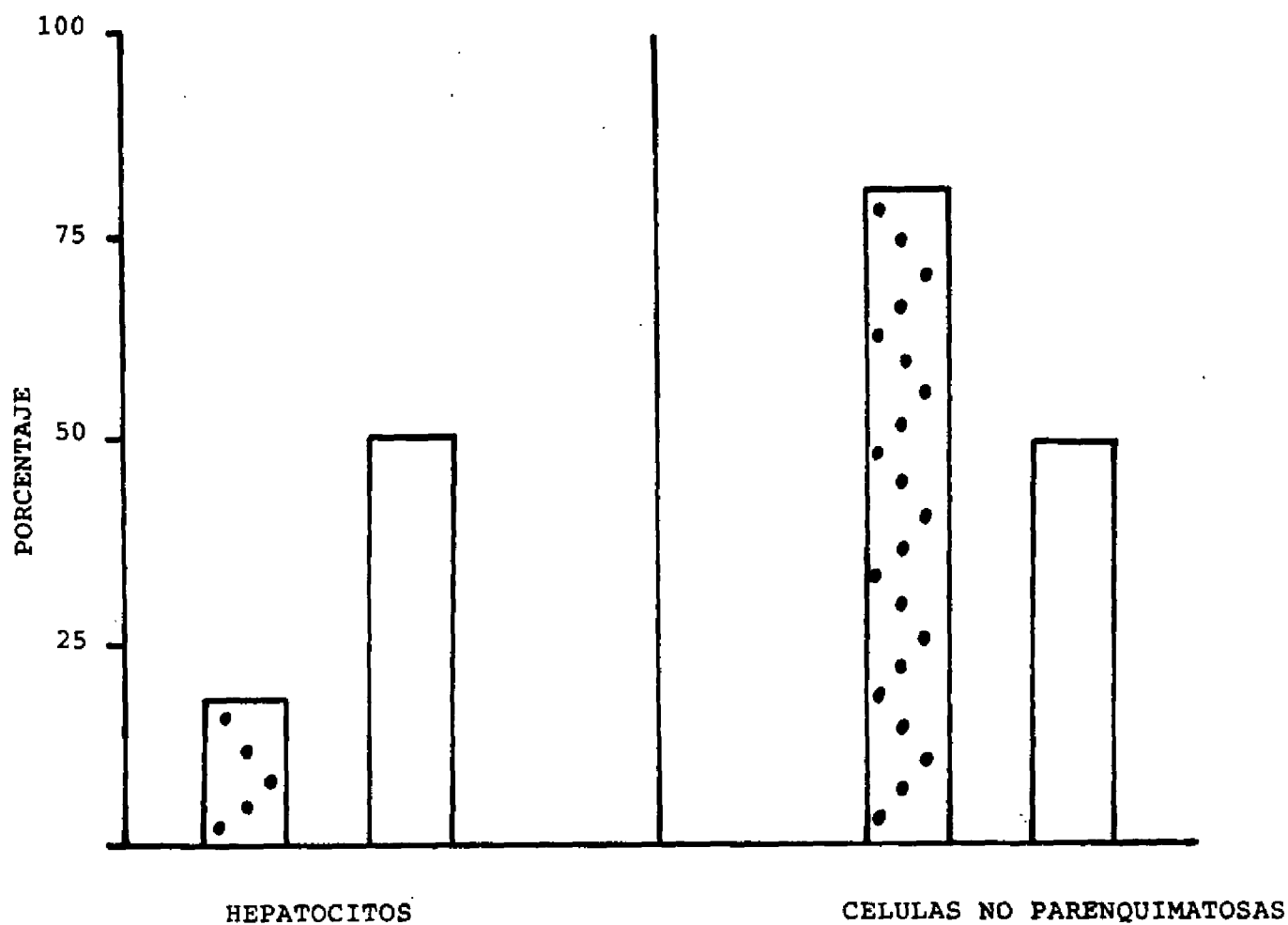


FIGURA 12. Captación porcentual "in vivo" de células no parenquimatosas y hepatocitos. Las barras representan las medias de los valores obtenidos en cinco ratas de cada grupo. Las ratas enfermas pertenecían al grupo II (a las que se inyectó la OVA 18 horas antes). La captación de los A-IgG marcados por los hepatocitos y las células no parenquimatosas, se determinó a los 5 min de habérselos inyectado.



-  = ratas enfermas del Grupo II
-  = ratas sanas control

TABLA XI

## ESTUDIOS DE INMUNOFLUORESCENCIA HEPATICA

GRUPOS	CASOS ESTUDIADOS	POSITIVIDAD ANTI-IgG
I	5	5*
II	7	0

\* en un caso la inmunofluorescencia se consideró en el límite de la positividad.

\*\* en cuatro ratas controles sanas, la inmunofluorescencia fué negativa.

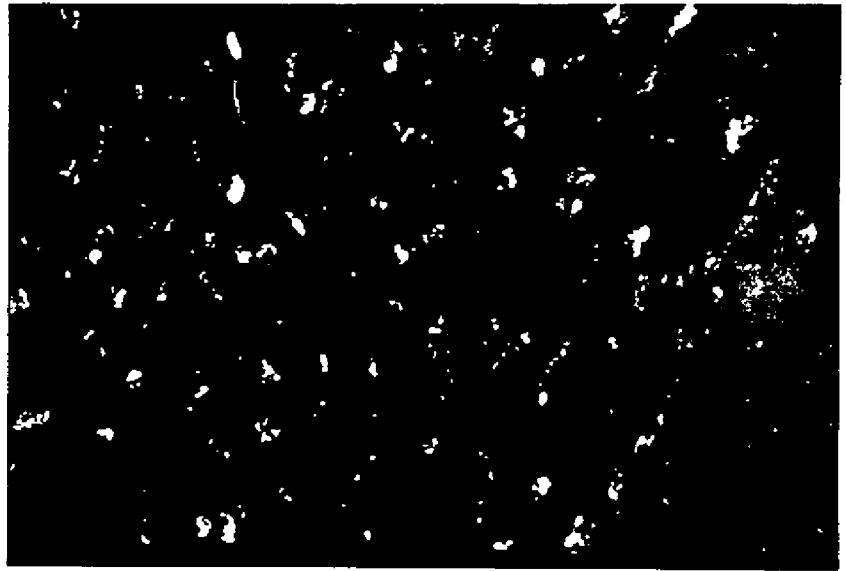


FIGURA 13. Inmunofluorescencia hepática positiva con antisuero anti-IgG, observada en ratas enfermas del Grupo I. Todas las pruebas de inmunofluorescencia realizadas en las ratas del Grupo II fueron negativas. Por el contrario, cuatro de cinco de las hechas en las ratas del Grupo I fueron positivas, estando la quinta en el límite de la positividad.



#### 4.5. CAPTACION DE A-IgG POR HEPATOCITOS, CELULAS DE KUPFFER Y MONOCITOS AISLADOS.

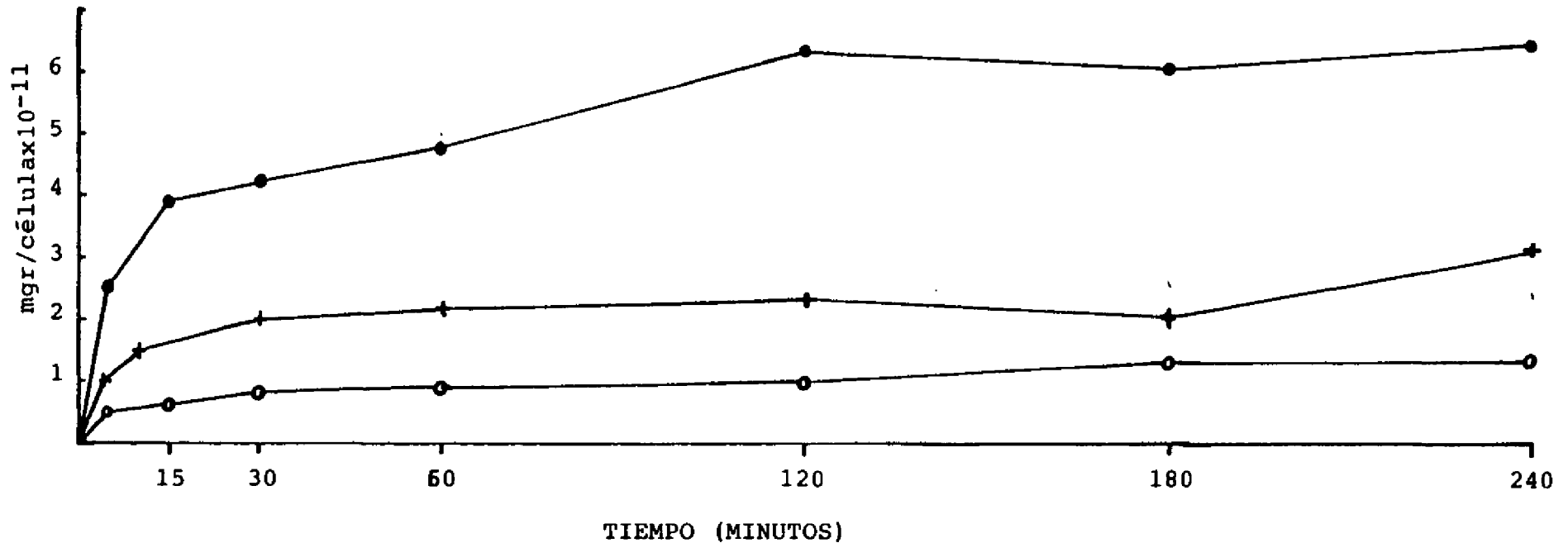
##### 4.5.1. CONSTANTE DE ASOCIACION DE LOS A-IgG MARCADOS PARA LOS TRES TIPOS CELULARES. CAPTACION DE A-IgG POR CELULA.

La unión de A-IgG marcados con  $^{125}\text{I}$  a hepatocitos, células de Kupffer y monocitos fué estudiada utilizando el método descrito por Segal y Hurwitz (157a) para células en suspensión, con la modificación de Lane y cols (113). Las pruebas de unión de A-IgG a células de Kupffer y monocitos se hicieron en placas de cultivo. Ambos métodos permiten una rápida separación de la proteína unida a las células de la proteína libre, minimizando la disociación que ocurre en procesos con lavados de mucho más tiempo.

Los tres tipos celulares se incubaron con una cantidad fija de A-IgG marcados a diferentes tiempos hasta 2 horas y a 4 grados C para evitar la endocitosis. Aproximadamente el 80% de la unión de los A-IgG a los hepatocitos tiene lugar en los primeros 30 minutos, a partir de los cuales se alcanza el equilibrio (figura 14); en células de Kupffer y en monocitos el equilibrio en la unión de A-IgG se alcanzó a partir de 10 a 15 minutos de incubación.

La constante de asociación de los A-IgG a los tres tipos celulares se ajustó a una reacción de segundo orden de tipo reversible y fué calculada por el método de Shiu y cols (164). La constante de asociación fué más alta para células de Kupffer y monocitos que para hepatocitos, 0,038, 0,013 y 0,0087  $\text{m}^{-1}$  respectivamente.

FIGURA 14. Curvas de asociacion de los A-IgG a monocitos, hepatocitos y células de Kupffer. Se incubaron  $3 \times 10^5$  células con A-IgG a diferentes tiempos, a  $40^\circ \text{C}$ . El cálculo de la constante de asociación usando la ecuación propuesta por Shiu y Friesen (164). Cada curva es un ejemplo representativo.



- = hepatocitos
- = células de Kupffer
- + = monocitos

El porcentaje de unión de A-IgG a hepatocitos fué 8 veces superior que a las células de Kupffer y monocitos. La unión de A-IgG a estas dos últimas células fué similar.

Con objeto de saber si la temperatura a 4 grados C era suficiente para evitar la endocitosis de los A-IgG se repitieron dos experiencias con hepatocitos no viables que demostraron una constante de asociación similar, así como la captación por célula.

#### 4.6. EXPRESION DE LOS RECEPTORES Fc PARA LA IgG EN CELULAS DE KUPFFER, HEPATOCITOS Y MONOCITOS

##### 4.6.1. FORMACION DE ROSETAS CON PARTICULAS DE POLIACRILAMIDA RECUBIERTAS CON IgG DE HEPATOCITOS, CELULAS DE KUPFFER Y MONOCITOS

Tras la separación de hepatocitos, células de Kupffer y monocitos según la metodología previamente descrita, se realizaron los estudios de los receptores Fc mediante la formación de rosetas por estos tres tipos celulares según se esquematiza en la Figura 7. Estos estudios se realizaron en ratas enfermas a las 1,5 horas de la inyección de ovoalbúmina intraperitoneal. Según puede observarse en la figura 15 el porcentaje de células de Kupffer que formaban rosetas fué significativamente menor ( $p < 0,01$ ) en ratas enfermas ( $18,3 \pm 7,2 \%$ ) que en las ratas control ( $40,9 \pm 7,9 \%$ ) (Figura 15).

Como otros autores habían observado previamente que después de una única inyección de inmunocomplejos en ratas el número de receptores Fc descendía para reaparecer a las 18-24 horas a sus valores normales (135), decidimos estudiar el mismo proceso en nuestro modelo de enfermedad crónica por inmunocomplejos producidos

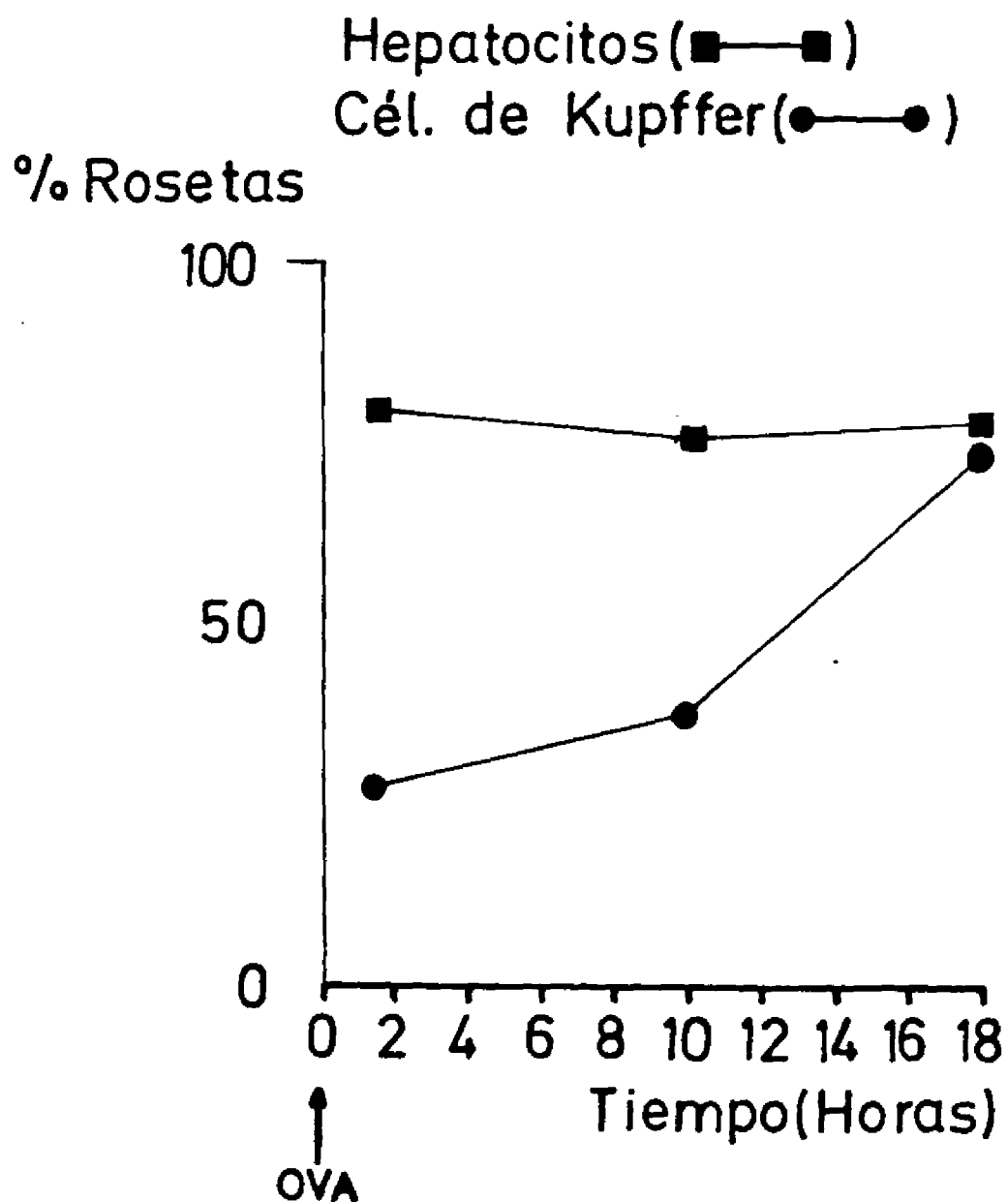


FIGURA 15. Formación de rosetas por células de Kupffer y hepatocitos a diferentes tiempos desde la última inyección de OVA. El porcentaje de células de Kupffer y hepatocitos, de ratas controles, que forman rosetas fué del  $40,9 \pm 7,2\%$  y  $45,03 \pm 6,38\%$ . Cada punto es la media de los resultados obtenidos en 7 ratas, excepto las pruebas realizadas a las 10 horas, que solamente se hizo en un caso.

endógenamente. Como puede observarse en la figura 15, el porcentaje de células de Kupffer que forman rosetas, en ratas enfermas, a las 10 horas de la inyección de ovoalbúmina fué muy parecido (37 %) al del grupo control, mientras que a las 18 horas el porcentaje fué significativamente más elevado en ratas enfermas ( $75,6 \pm 7,4$  %) que en controles ( $p < 0,001$ ).

Varios autores han señalado las similitudes entre los monocitos (células circulantes del sistema mononuclear fagocítico) y otras células tisulares del sistema mononuclear fagocítico. Incluso se ha sugerido que en determinadas enfermedades reumatológicas y, en general enfermedades de patogenia inmune, el monocito podría proporcionar cierta información de la situación funcional del conjunto del sistema mononuclear fagocítico (107). Para intentar verificar esta hipótesis estudiamos la expresión de los receptores Fc para la IgG en monocitos, células de Kupffer y hepatocitos en nuestro modelo. Por razones técnicas las pruebas de rosetas sólo se pudieron realizar a las 18 horas de la inyección de la ovoalbúmina. En ese momento el porcentaje de monocitos de las ratas que formaban rosetas ( $33,3 \pm 7,9$  %) fué similar al de las ratas controles ( $34,7 \pm 15,4$  %) (Figura 16). Por el contrario, según hemos visto antes el porcentaje de células de Kupffer formadoras de rosetas estaba incrementado con respecto a controles. Los hepatocitos, por otra parte, mantenían un porcentaje elevado en los tres tiempos en que se realizó la prueba; 1,5 horas ( $76,67 \pm 6,45$  %), a las 10 horas (74,26 %) y a las 18 horas ( $75,16 \pm 8,53$  %), con diferencias que fueron significativas con respecto a los controles (figura 16).

FIGURA 16. EXPRESIVIDAD DE LOS Receptores

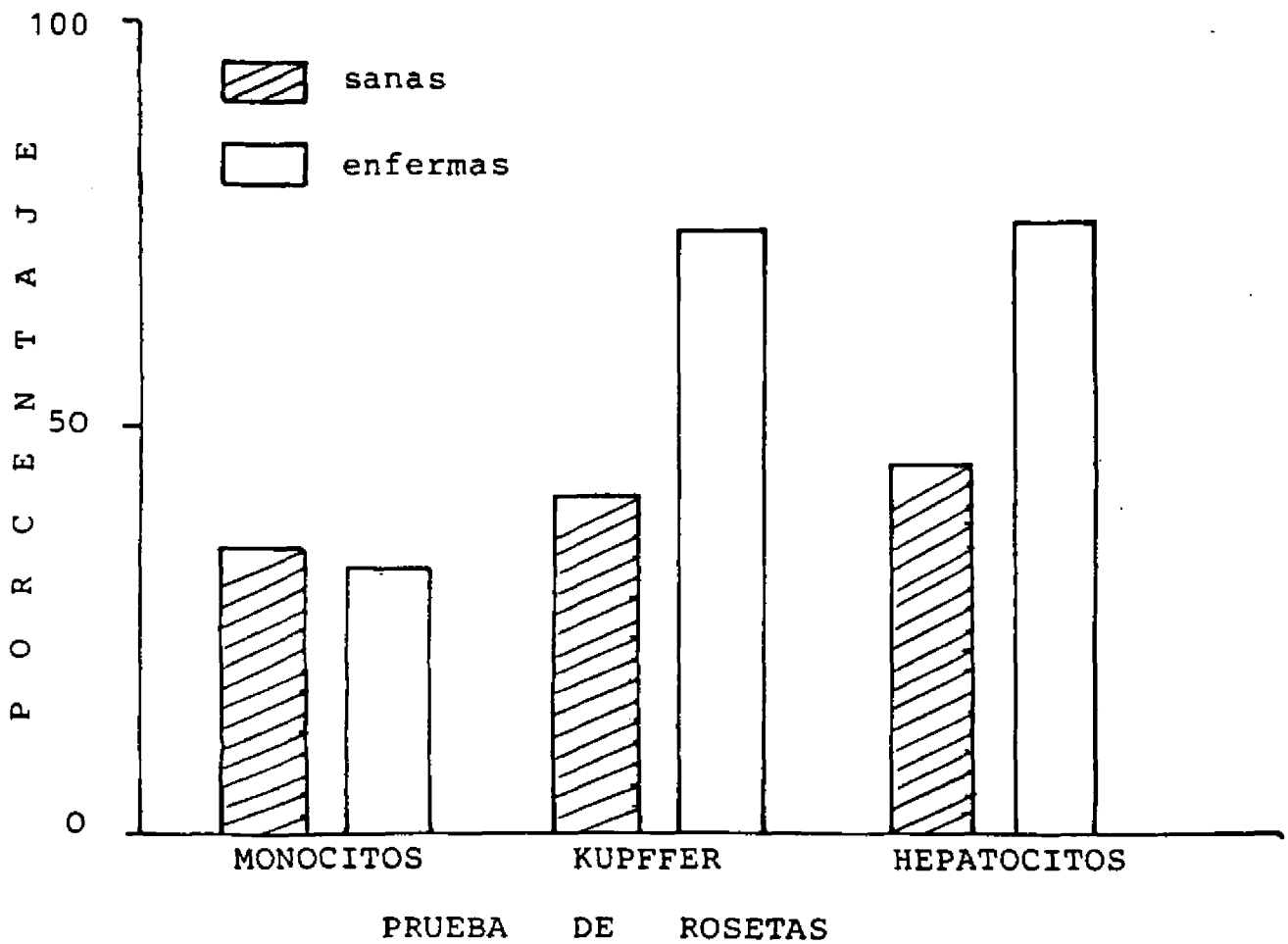


FIGURA 16. Expresividad de los receptores Fc. Porcentaje de monocitos, células de Kupffer y hepatocitos que expresan receptores Fc para la IgG, en ratas sanas y enfermas (éstas del Grupo II). El porcentaje de recptores se determinó por la técnica de roseteo. Cada barra representa la media de 7 animales.

Estos resultados sugieren que los monocitos y las células de Kupffer reaccionan de forma diferente en una situación de estímulo crónico por inmunocomplejos.

Las pruebas de inhibición de la formación de rosetas con A-IgG en células de Kupffer mostraban una inhibición del 80 % (figura 17) y del 75% en hepatocitos.

#### 4.6.2. CARACTERIZACION DE LA ESPECIFICIDAD DE LA UNION DE LOS A-IgG

A partir de los resultados obtenidos en el estudio de la constante de asociación, los estudios para determinar la constante de afinidad y el número de sitios de unión se hicieron tras una hora de incubación a 4 grados C.

Para comprobar la especificidad de la unión de A-IgG a hepatocitos, células de Kupffer y monocitos se hicieron diversas pruebas de inhibición. Se incubaron dichas células con A-IgG marcados y con concentraciones 200 veces superiores de A-IgG sin marcar. La unión de los A-IgG marcados en los tres tipos celulares fué totalmente inhibida por los A-IgG.

#### 4.6.3. CONSTANTE DE AFINIDAD Y NUMERO DE SITIOS DE UNION PARA A-IgG POR CELULA

Se hicieron estudios con diferentes concentraciones de A-IgG con hepatocitos, Kupffer y monocitos hasta alcanzar una meseta en la unión de los A-IgG a dichas células. La saturación de las células de Kupffer y monocitos se alcanzó con unas concentraciones de A-IgG de  $2 \times 10^8$  M y en hepatocitos de  $0,7 \times 10^8$  M. La unión en la situación de equilibrio fué medida al cabo de 1 hora a 4 grados C.

INHIBICION DE LA FORMACION DE ROSETAS  
DE KUPFFER CON IgG

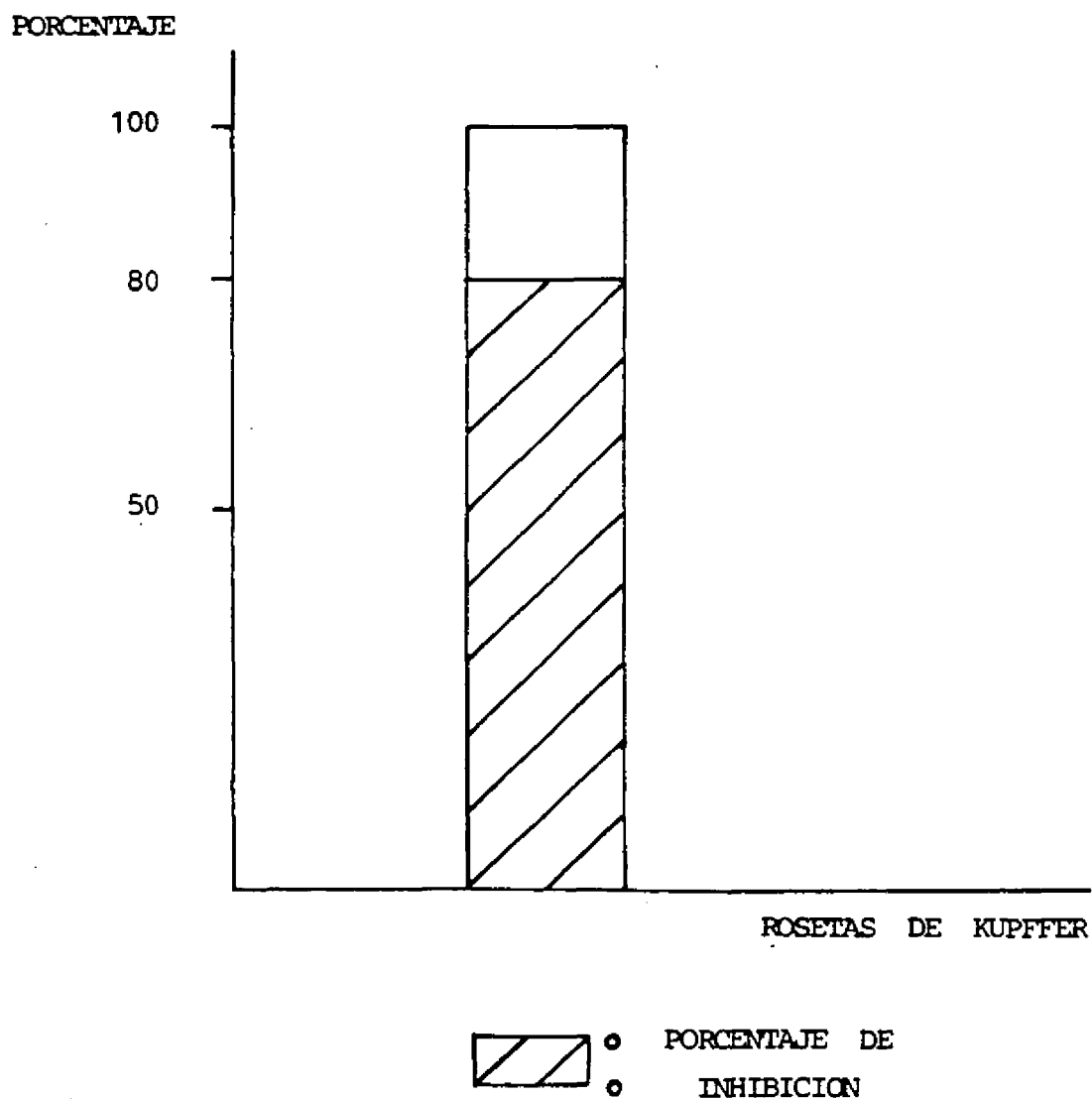


FIGURA 17. La inhibición de la formación de rosetas por las células de Kupffer se realizó incubando dichas células con partículas de poliacrilamida recubiertas con IgG de rata, y concentraciones elevadas de A-IgG.



La constante de afinidad se calculó por el método de Scatchard (156). La constante de afinidad de la unión de los A-IgG a las células de Kupffer fué de  $0,86 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  en ratas enfermas y  $37,47 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  en ratas sanas. El número de receptores Fc para los A-IgG en las células de Kupffer de ratas sanas fué de  $6,5 \times 10^4$  similar al observado en ratas enfermas  $7,0 \times 10^4$  (Tabla 12).

Los hepatocitos de las ratas enfermas también mostraron una disminución de la constante de afinidad con respecto a controles, aunque en éstas el número de receptores por célula estaba notablemente elevado:  $21,10 \times 10^5$  vs  $4,51 \times 10^5$  (Tabla 12).

Respecto a la relación entre hepatocitos y Kupffer pudimos observar que el número de receptores tanto en ratas sanas como enfermas era siempre superior en hepatocitos. Por el contrario la constante de afinidad fué inferior en ambas situaciones.

#### 4.7. DETERMINACION DEL NIVEL DE INMUNOCOMPLEJOS CIRCULANTES

Para estudiar la relación entre la expresión de los receptores Fc para la IgG con la posible presencia de inmunocomplejos circulantes, se obtuvo suero de las ratas enfermas a las 0,5 y 18 horas de la inyección de la ovoalbúmina, coincidiendo con los estudios de rosetas en monocitos y células de Kupffer. Las 5 ratas que habían recibido la inyección intraperitoneal de ovoalbúmina 0,5 horas antes tenían inmunocomplejos circulantes ( $T_i/U_i = 1,58 \pm 0,4$ , media  $\pm$  desviación standard). Por el contrario, ninguna de las ratas enfermas estudiadas a las 18 horas de la inyección de ovoalbúmina tenía inmunocomplejos ( $T_i/U_i = 0,84 \pm 0,1$ ) (figura 19). Ninguna de las 7 ratas control mostraba inmunocomplejos ( $T_i/U_i = 0,84 \pm 0,1$ ).

TABLA XII

SITIOS DE UNION Y CONSTANTE DE AFINIDAD PARA LOS A-IgG EN HEPATOCITOS Y KUPFFER

	RATAS SANAS		RATAS ENFERMAS*	
	Nº DE MOLECULAS/ CELULA ± SD**	AFINIDAD ( $M^{-1} \times 10^8$ ) ± SD***	Nº DE MOLECULAS/ CELULA**	AFINIDAD***
HEPATOCITOS	4,51 ± 2,2x10 <sup>5</sup>	13,69 ± 6,2x10 <sup>8</sup>	21,10 ± 8,32x10 <sup>5</sup>	0,50 ± 0,29x10 <sup>8</sup>
CELULAS DE KUPFFER	7,00 ± 3,1x10 <sup>4</sup>	37,47 ± 13,98x10 <sup>8</sup> ****	6,50 ± 3,31x10 <sup>4</sup>	0,86 ± 0,40x10 <sup>8</sup> ****

\*ratas enfermas del grupo II (se les había inyectado la OVA 18 horas antes)

\*\*\*constante de afinidad determinada por la prueba de Scatchard

\*\*número máximo de sitios de unión por célula, calculado multiplicando los moles de proteína unida en la saturación (intersección con el eje de las abcisas) por el número de Avogadro y dividiendo por el número de células

\*\*\*\*p<0,05

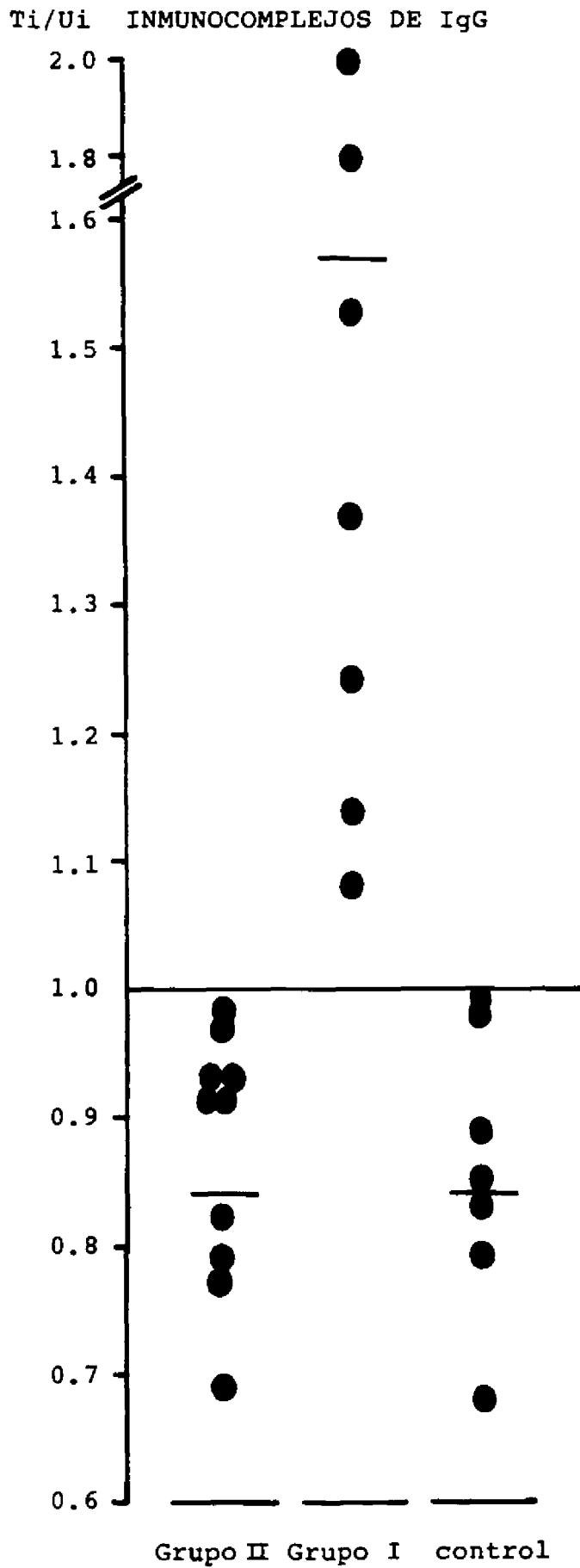


FIGURA 19. Determinación de inmunocomplejos de IgG, en los dos grupos de ratas enfermas y en control los sanos

En las ratas del Grupo I la presencia de inmunocomplejos circulantes explicaría el patrón positivo de inmunofluorescencia hepático y, la disminución de la formación de rosetas por las células de Kupffer, pero no la prolongación de la  $t_{1/2}$  del aclaramiento de A-IgG (figura 20).

Por otro lado, en el grupo II no existían inmunocomplejos circulantes, las rosetas de Kupffer estaban incrementadas y, sin embargo, el aclaramiento también estaba retardado con respecto a las ratas control (figura 20). Para buscar posibles explicaciones a estos hechos realizamos los siguientes experimentos de catabolismo celular.

#### 4.8. UNIÓN, ENDOCITOSIS Y CATABOLISMO DE LOS A-IgG EN CELULAS DE KUPFFER DE RATAS ENFERMAS Y CONTROLES

Incubamos 5 microgramos de A-IgG marcados durante 1,2,3,4 y 5 horas a 37 grados C con células de Kupffer de ratas enfermas, previamente cultivadas durante 18 horas, midiendo la unión, endocitosis y catabolismo de los A-IgG. Estos estudios se hicieron en ratas enfermas a las 18 horas de la última inyección de ovoalbúmina y en ratas sanas.

Igual que observamos a 4 grados C a 37 grados la unión de A-IgG a las células de Kupffer estaba descendida con respecto a controles (figura 21), aunque esta disminución no alcanzaba significación estadística. La endocitosis mostró un descenso significativo en todas las horas con respecto a los controles, fundamentalmente a partir de la cuarta hora de incubación (figura 22). Asimismo el catabolismo, probablemente como consecuencia de la disminución de la endocitosis mostraba a partir de la cuarta hora de incubación un descenso

1,5 horas (GRUPO I)

18 horas (GRUPO II)

t 1/2 del aclaramiento de A-IgG	↑	↑
% circulante de A-IgG	=	↑
inmunocomplejos circulantes	+	-
inmunofluorescencia hepática	+	-



FIGURA 20. Representación esquemática de los resultados del estudio de la situación del sistema mononuclear fagocítico, en las ratas enfermas, en relación con el momento de la inyección de la OVA. Para profundizar en el estudio de esta situación, nos planteamos analizar la función de los receptores Fc "in vitro", mediante la formación de rosetas con partículas recubiertas con IgG, la prueba de Scatchard y la unión, endocitosis y catabolismo a 37 ° C. Las zonas oscuras del gráfico representan el tiempo durante el que se hicieron las pruebas de aclaramiento.

FIGURA 21. Unión de A-IgG. Se incubaron  $3 \times 10^5$  células de Kupffer con 5 microgramos de A-IgG, durante diferentes tiempos a 37 ° C. Los valores representan la media  $\pm$  SD de 5 experimentos diferentes. Cada experimento se realizó por duplicado.

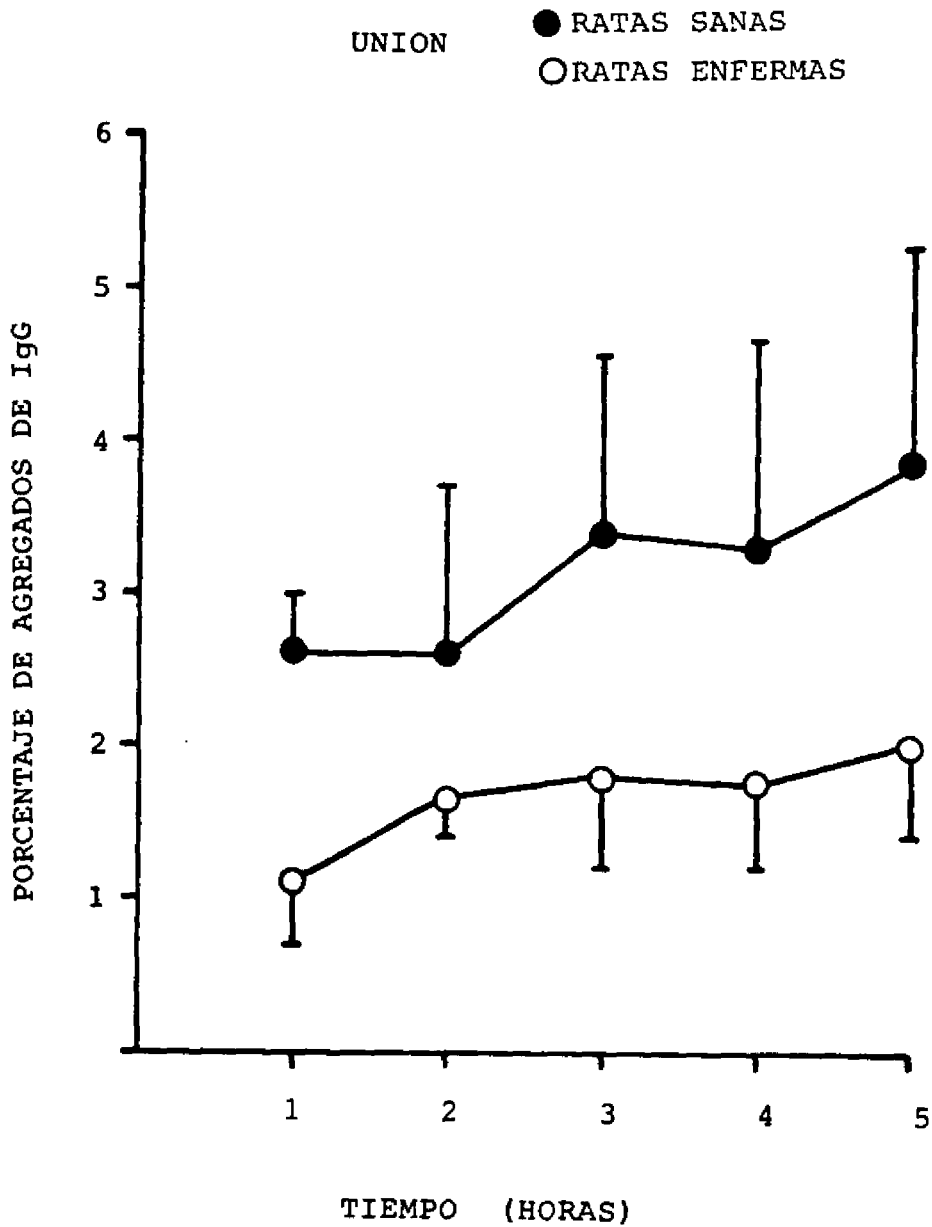
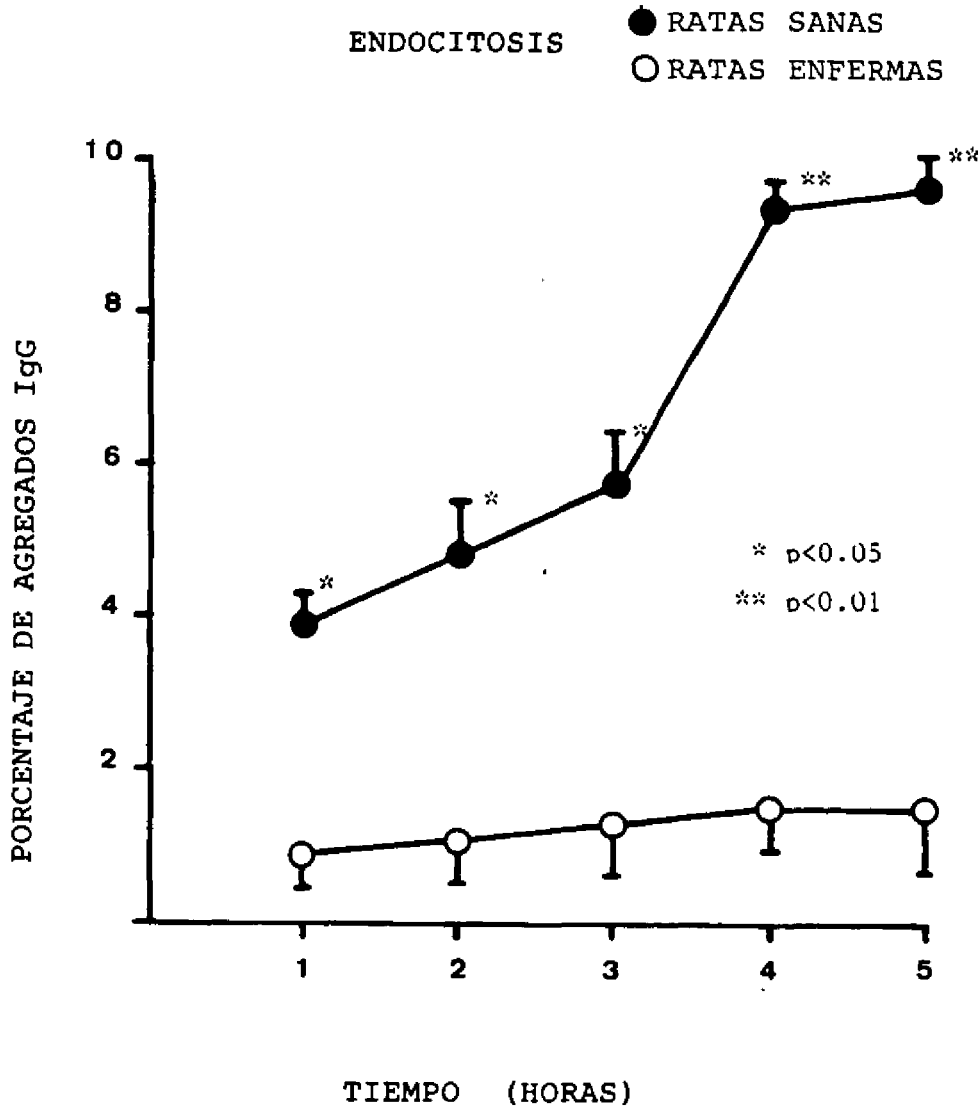


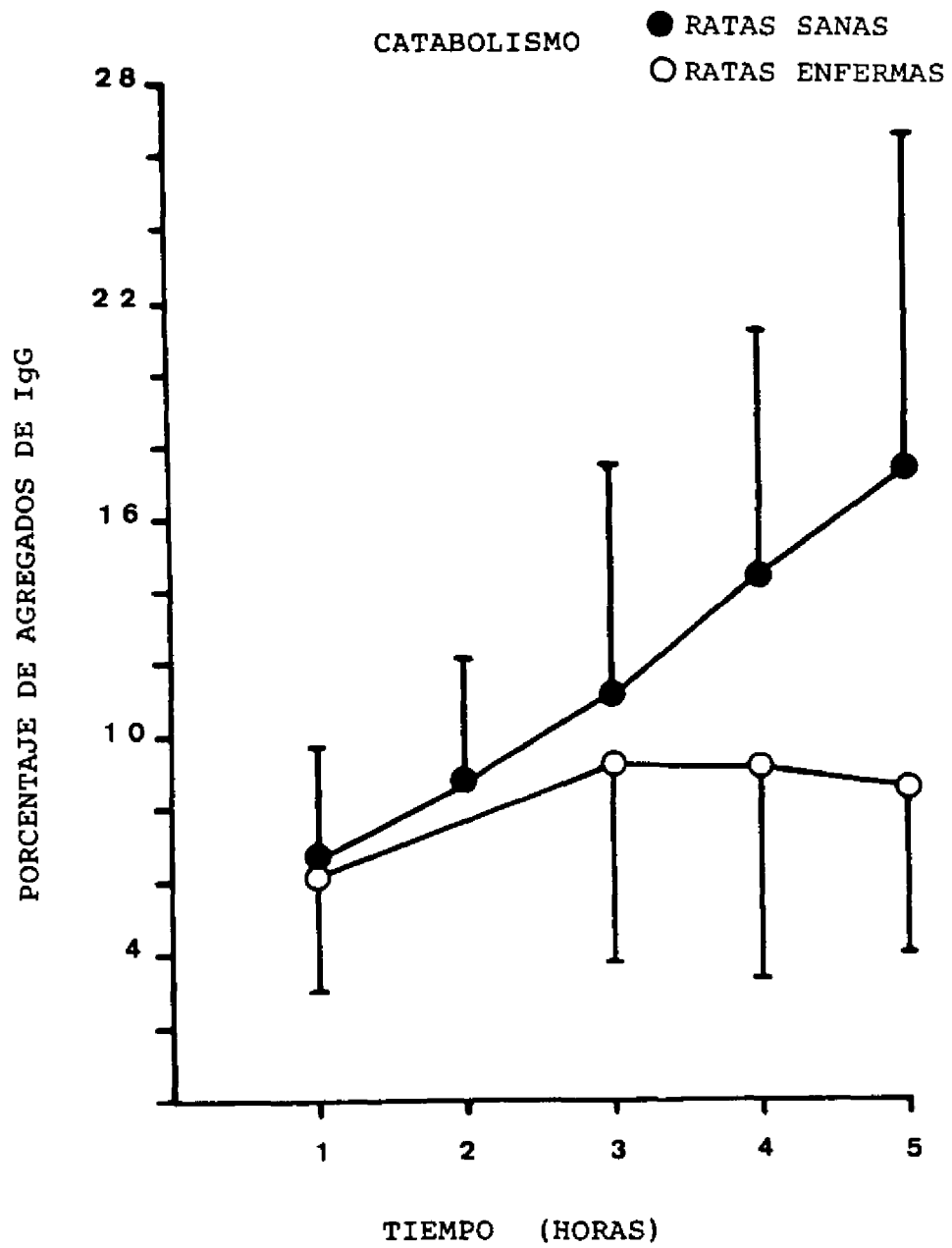
FIGURA 22. Endocitosis de A-IgG. Después de eliminar los A-Igg unidos a las células, éstas se solubilizaron con tritón x100, midiéndose posteriormente los A-IgG que habían sido endocitados.



considerable con respecto a controles, aunque no llegó a ser estadísticamente significativo (figura 23).



FIGURA 23. Catabolismo de A-IgG a 37 ° cpor células de Kupffer. Los valores representan la media de 5 experimentos con  $\pm$  SD.



## 5. DISCUSION

El SMF cumple un papel clave tanto en el procesamiento de los antígenos y en la modulación de la inflamación como en la eliminación y degradación de los inmunocomplejos circulantes (127,133a). Se ha sugerido por diversos autores que un mejor conocimiento de la función inmunoeliminadora del SMF conllevaría una mayor comprensión de la etiopatogenia de ciertas enfermedades autoinmunes, e incluso un abordaje terapéutico diferente (162). Haakenstad y cols demostraron, en animales sanos, que la saturación del SMF podría conducir a una prolongación en la circulación de inmunocomplejos con el subsiguiente depósito, causando inflamación y destrucción tisular (71).

En varias enfermedades autoinmunes humanas (lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, panarteritis nodosa, etc.) se han observado aclaramientos defectuosos de inmunocomplejos particulados, sugestivos de un mal funcionamiento o de la saturación del SMF. En animales crónicamente enfermos se han realizado muy pocos estudios, proporcionando, además, resultados dispares. Así, en un modelo murino de lupus eritematoso sistémico, en ratones NZB/NZW la saturación del SMF era un prerrequisito preciso para que se produjera la glomerulonefritis observada durante la evolución espontánea de la enfermedad (80,101). Sin embargo, Fimbloom y Plotz, recientemente, utilizando como marcadores inmunocomplejos unidos covalentemente, no observaron diferencias en los aclaramientos entre ratones híbridos F1 NZB/NZW y controles (50). Grace y Brennan tampoco encontraron

alteraciones en el aclaramiento de inmunocomplejos (estos autores hicieron las pruebas con dímeros covalentes de IgG), aunque en el estudio tisular observaron una disminución en la captación de A-IgG por el hígado en las ratas enfermas, y en algunos animales también por el bazo (64).

Aunque ya se han estudiado los efectos sobre el SMF de la inyección de una gran dosis única de inmunocomplejos en ratones normales(71), en ratones autoinmunes NZB/NZW (50,110) y en ratones con enfermedad por inmunocomplejos endógenos provocada con anticuerpos anti-inmunoglobulinas (64), los efectos de inmunocomplejos de gran tamaño sobre el SMF permanecían desconocidos, siendo uno de los objetivos de la presente tesis el estudio de este aspecto.

Las pruebas de aclaramiento se hicieron con A-IgG de un tamaño bien definido, estables y de un peso molecular alrededor de 3 millones de daltones, que corresponden aproximadamente a 20 moléculas de IgG. Trabajos de otros autores han demostrado que los A-IgG tienen una conducta biológica similar a la de los inmunocomplejos del mismo tamaño, teniendo capacidad, entre otras cosas de activar la secuencia del complemento (100). En realidad en un inmunocomplejo, el papel del antígeno es agregar fragmentos Fc, permitiendo así, distinguir los fragmentos Fc de los inmunocomplejos de los Fc de la IgG monomérica no unida al antígeno (51).

Los agregados utilizados se pueden catalogar como de gran tamaño, siendo considerados muy patógenos cuando persisten circulando en el torrente sanguíneo. Hay que tener presente que se utilizan como sustancias trazadoras, y que por tanto, no introducen ninguna

modificación "per se" en los resultados de las pruebas en que se utilizan (35). Preferimos utilizar A-IgG mejor que inmunocomplejos preformados, ya que éstos sufren un proceso posterior de disociación en la sangre del animal que puede originar importantes artefactos metodológicos (124). Además, en la superficie celular los complejos no unidos covalentemente tienden a agregarse (37).

Decidimos estudiar la función del SMF en un modelo experimental de enfermedad crónica del suero en ratas, inducida por la administración repetida diaria de ovoalbúmina. Escogimos este modelo entre una amplia posibilidades de elección existente en la actualidad, de diferentes especies y razas de animales con enfermedades crónicas de aparición espontánea similares al lupus eritematoso sistémico humano: ratones NZB/NZW, MRL 1, lupus canino, etc (115a,149,169).Hubo varias razones que aconsejaron tal decisión:

En primer lugar, la producción endógena de inmunocomplejos en los ratones NZB/NZW puede ser intermitente, o al menos irregular, a lo largo de la evolución, lo cuál obviamente podría modificar los posteriores estudios de la función del SMF. En segundo lugar, se ha demostrado en estos ratones un defecto en la expresión Fc en células hepáticas no parenquimatosas en una etapa precoz de su vida, tan temprana como al mes de nacimiento (120). En tercer lugar, y por último, la posibilidad de modificar la llegada del antígeno en nuestro modelo, con la subsiguiente formación de inmunocomplejos, según los requerimientos de cada experiencia concreta a realizar, pudiendo controlar, al menos parcialmente una de las variables que más pueden perturbar los resultados y el análisis ulterior de las pruebas de aclaramiento como es el nivel sérico de inmunocomplejos (6).

Las características de la enfermedad en las ratas fueron la proteinuria masiva y la disminución de la vitalidad de los animales. La proteinuria apareció de forma súbita, incrementándose de manera continua a lo largo de la evolución. La microscopia óptica mostró una glomerulonefritis difusa, severa, necrotizante con denudación endotelial. Al mismo tiempo la inmunofluorescencia demostró la existencia de depósitos difusos de IgG y C3 en la pared capilar glomerular. La secuencia inmunopatogénica de la enfermedad separada en sucesivas etapas sería la siguiente. Durante la fase inicial se produce el depósito mesangial de inmunocomplejos. Posteriormente, disminuye de forma considerable el nivel de anticuerpos, produciéndose la reacción en exceso de antígeno, en cuyo momento aparece la proteinuria, y, a nivel histopatológico la presencia de depósitos inmunes en la membrana basal (100,176). En la tabla 1 pormenorizamos la localización de los inmunocomplejos durante la evolución de la enfermedad.

Aunque en sentido estricto existen varias diferencias entre esta enfermedad y el lupus eritematoso sistémico humano, se dan también otras similitudes, como el tener una base patogénica parecida (en ambas, el substrato fundamental es el depósito tisular de inmunocomplejos con la correspondiente destrucción tisular) o las lesiones anatomopatológicas. Por estos motivos creemos que, al menos parcialmente, las condiciones biológicas en las que realizamos nuestras experiencias son muy parecidas a las que se dan en la enfermedad humana (176).

En este sentido, la enfermedad crónica del suero en ratas es un modelo fácilmente reproducible con un curso evolutivo muy homogéneo, por lo que creemos que constituye un modelo útil en los estudios en los que se requiere un modelo experimental de enfermedad por inmunocomplejos.

El aclaramiento de A-IgG marcados, utilizando dosis trazadoras de 40 microgramos por animal, inyectados en ratas enfermas del grupo I (a las que se había inyectado la ovoalbúmina 1/2 hora antes del inicio del aclaramiento) mostró una  $t_{1/2}$  alargada ( $4,6 \pm 2,3$  minutos) con respecto al grupo control ( $2,4 \pm 0,8$  minutos) ( $p < 0,01$ )\*. Sin embargo, la dosis aclarada con esa  $t_{1/2}$  era similar a la observada en el grupo control, hecho que interpretaremos posteriormente.

Como ya hemos comentado, los diferentes resultados observados en las pruebas de aclaramiento en animales con enfermedades crónicas por inmunocomplejos podrían tener su origen en una diferente situación funcional del SMF. Para estudiar la dinámica del SMF, realizamos las pruebas de aclaramiento a las 18 horas de la inyección de la ovoalbúmina. Elegimos este tiempo porque estudios previos han demostrado que la actividad de los receptores Fc reaparecía al cabo de 12 a 18 horas de la incubación de inmunocomplejos con células del SMF (135). La  $t_{1/2}$  en este grupo de ratas enfermas (Grupo II) fué de  $4,1 \pm 1,2$  minutos, similar a la del grupo I y, por tanto, significativamente retardada con respecto a controles ( $p < 0,05$ ). En este grupo de ratas enfermas (Grupo II) el porcentaje de A-IgG aclarado cuando la curva de aclaramiento alcanzaba la meseta ( $64,87 \pm 5,75$  %) era significativamente menor ( $p < 0,005$ ) que en las ratas

\* ver pag 100' y 100''

La eliminación sérica del antígeno en la enfermedad crónica del suero en animales se debe a dos factores. En primer lugar, y fundamentalmente, a la eliminación inmune continuada, mediante la formación de inmunocomplejos (6). A diferencia de lo observado en conejos, en ratas no existen respondedores pobres al estímulo antigénico crónico inducido (48). El nivel de anticuerpos anti-OVA varía a lo largo de la enfermedad. Durante los primeros estadios, preproteinúricos, existen títulos elevados de anticuerpos, no detectándose antígeno libre circulante. Durante la fase proteinúrica disminuye el título de anticuerpos anti-BSA, aunque tampoco se observa antígeno circulante (a las 24 horas de su administración). Sin embargo, en esta fase de la enfermedad se produce un depósito masivo de IC en diferentes tejidos de la economía (6). Todas las ratas controles, en las que no se produce una respuesta humoral, tienen antígeno circulante 24 horas después de su administración (6).

En segundo lugar, la OVA que es una proteína de bajo peso molecular, se elimina rápidamente por filtración glomerular en la enfermedad crónica del suero, durante la fase proteinúrica (76).

Por otra parte, Carter y cols encontraron en ratones con una enfermedad experimental por producción de IC endógenos, un aclaramiento y captación normales de OVA, mientras que el aclaramiento y la captación de IC inyectados estaban disminuidos (20). Estos resultados demuestran que la alteración de la función de un receptor, en este caso el Fc para la IgG en células de Kupffer, no se acompaña de la alteración de otros receptores, como el de la OVA (20).



Por tanto, la eliminación sérica de OVA en la enfermedad crónica del suero se hace por vía inmune y renal (6,48,76), y aunque existiera también eliminación hepática, ésta no alteraría la función mediada por otros receptores. En consecuencia, no consideramos necesario hacer un grupo control de ratas sanas sometidas a una inyección exclusiva de OVA.

controles ( $89,30 \pm 3,5 \%$ ) y en las ratas enfermas del grupo I ( $87,30 \pm 8,51 \%$ ). Este nivel de A-IgG circulantes elevados se mantenía a lo largo de la hora del estudio.

La captación tisular estaba aumentada en pulmón, piel y riñones de ambos grupos de ratas enfermas, aunque solamente a nivel renal el aumento, en ambos grupos de ratas con nefritis, era significativamente mayor que en los controles ( $p < 0,05$ ). Por el contrario, en hígado y bazo la captación fué similar en los tres grupos (enfermas y controles).

El análisis de estos datos sugería que las ratas enfermas de ambos grupos (I y II) tenían una saturación del SMF que producía un alargamiento de la  $t_{1/2}$  del componente rápido del aclaramiento, un % elevado de A-IgG en la circulación (este hecho sólo en el grupo II) y, por último, un aumento del depósito tisular de los A-IgG.

A continuación determinamos la posible existencia de inmunocomplejos circulantes en ambos grupos de ratas. Se estudiaron en cinco ratas que habían recibido la inyección de ovoalbúmina 1,5 horas antes, mostrando las cinco niveles de inmunocomplejos circulantes ( $T_i/U_i = 1,58 \pm 0,4$ ). En una rata se determinaron secuencialmente, en veintidos ocasiones, a lo largo de una hora (mientras se realizaba el aclaramiento de A-IgG), siendo positivas todas las determinaciones. Por el contrario, ninguna de las siete ratas estudiadas a las 18 horas de la inyección de ovoalbúmina presentaba inmunocomplejos ( $T_i/U_i = 0,84 \pm 0,04$ )

La confirmación de la aparición masiva de inmunocoplejos circulantes en las ratas del grupo I fué la presencia en cuatro de las cinco estudiadas de un patrón inmunofluorescente positivo en el

hígado (la quinta inmunofluorescencia se consideró en el límite de la positividad). Por el contrario, todas las ratas del grupo II mostraron resultados negativos.

Estos datos confirmaban la eclosión de inmunocomplejos en la circulación a las 0,5 horas de la inyección de la ovoalbumina. En el grupo I, el % de A-IgG aclarado al alcanzar la curva la meseta era normal, aún existiendo inmunocomplejos circulantes en ese momento.

Estos datos indican la dificultad en valorar, en un determinado momento, la situación real del SMF. Señalaba Plotz que era preciso un concimiento más completo, tanto en la formación como en la eliminación de inmunocomplejos por el SMF, para poder valorar en su contexto fisiopatológico los resultados de una o varias determinaciones aisladas de inmunocomplejos (146a). En la misma situación nos encontraríamos con respecto a las pruebas de aclaramiento de inmunocomplejos, en las que pueden coincidir numerosas variables capaces de modificar los resultados: tamaños de los complejos (93), isotipo de los anticuerpos (158) y su afinidad (145).

Carter y cols, en un modelo experimental murino, observaron una estimulación no específica del SMF, con un aclaramiento de inmunocomplejos normal y una captación hepática disminuida (20,64). En este caso, el diferente tipo de agregados utilizados podría explicar las diferencias con respecto a nuestros resultados, aunque añaden un nuevo interrogante: ¿Cuántas pruebas de aclaramiento habría que hacer y con cuántos tipos diferentes de inmunocomplejos trazadores para conocer con cierta exactitud la situación funcional del SMF en un determinado momento?

Los inmunocomplejos son eliminados de la circulación por el sistema mononuclear fagocítico, vía los receptores de las cadenas pesadas de ciertas inmunoglobulinas (92). La secuencia lógica de los resultados previos nos orientaba a proseguir los estudios a nivel celular. En este sentido, decidimos estudiar los receptores para la IgG en las células de Kupffer y en los hepatocitos.

Habíamos observado previamente como el órgano más activo en la eliminación de inmunocomplejos solubles, en el ratón y la rata normales era el hígado (154). Captaba 14 veces más que el bazo, aún cuando por gr de tejido la captación fuese similar. Cuando se estudió a los 5 minutos de haber inyectado los A-IgG marcados, estos valores se incrementaron en 5 o 6 veces. Por lo tanto, si queríamos conocer la situación funcional del SMF parecía necesario estudiarla a nivel hepático (127). De hecho, Magilav y cols encontraron un aumento de la captación hepática de inmunocomplejos de IgG perfundidos a través de la porta, en ratones NZB/NZW, frente a una captación normal cuando se estudiaron los aclaramientos "in vivo" (118).

Primeramente estudiamos la formación de rosetas con partículas de poliacrilamida recubiertas con IgG autóloga. Las células de Kupffer de las ratas del grupo I, que tenían inmunocomplejos circulantes, mostraban un descenso marcado en el porcentaje de rosetas con respecto a controles (18,25 % versus 40,91 %). Estos porcentajes se incrementaban, según transcurrieran las horas, con respecto a la inyección de ovoalbúmina. A las 10 horas era del 37 % y a las 18 del 75,18 % ( $p < 0.05$ ).

Nuestros resultados muestran que similarmente a lo que sucede con una gran dosis única (14), en un modelo de enfermedad crónica, la llegada de inmunocomplejos produce una disminución transitoria de la expresividad de los receptores Fc (medida por rosetas) en células de Kupffer. Con una situación de hiperexpresividad "basal" (creemos que es la primera vez que se estudia la consecuencia de un estímulo antigénico prolongado en células de Kupffer), quizá producida por el estímulo crónico de los inmunocomplejos circulantes sobre las células (67) o bien debido a la acción de otro tipo de mediadores, como el gamma-interferón (69,70)

Sin embargo, se observó una discordancia entre la hiperexpresividad de los receptores Fc (medidos por rosetas) por un lado y, por el otro, un estado de saturación del sistema mononuclear fagocítico con elevación del nivel sérico y del depósito tisular de los A-IgG. Por estos motivos, decidimos comprobar la captación de A-IgG por célula, así como el número y la afinidad de los sitios de unión para los A-IgG. La captación de A-IgG por célula de Kupffer fue menor en las ratas enfermas. De forma significativa, la constante de afinidad estaba considerablemente descendida en las células de Kupffer de ratas enfermas  $0,86 \pm 0,4 \times 10^8 M^{-1}$  vs  $37,47 \pm 13,98 \times 10^8 M^{-1}$  en las ratas sanas, siendo el número de receptores similar en ambos grupos.

Magylavy y cols encontraron en ratones NZB/W F1 una disminución del número de receptores Fc con respecto a controles, incluso antes de aparecer la enfermedad autoinmune (120). Nosotros hemos encontrado una disminución de la constante de afinidad en las ratas enfermas, siendo por el contrario similar el número de

receptores. Esta discordancia, a parte de mostrar en ambos casos la disminución de la capacidad de las células de Kupffer en unir inmunocomplejos, puede suponer una patogenia diferente, ya que en los ratones NZB/W F1, pueden existir trastornos primarios del SMF que favorezcan la permanencia de inmunocomplejos en la circulación (120), mientras que en nuestras ratas la enfermedad se manifiesta tras una sobrecarga del sistema mononuclear fagocítico.

Por otro lado, en otro trabajo del mismo grupo, con la misma cepa de ratones, se observó que la perfusión de A-IgG a dosis saturantes desplazaba más fácilmente los inmunocomplejos marcados perfundidos previamente en el hígado a través de la porta, en las ratas enfermas que en las sanas (118). Magilavy sugería que este desplazamiento indicaría una endocitosis disminuida o bien una alteración mal definida de la unión de los inmunocomplejos en el hígado (118). En nuestro modelo, hemos demostrado la existencia concomitantemente de ambas hipótesis. Por un lado, una disminución de la endocitosis y del catabolismo celular; por otro, una disminución de la unión de A-IgG tanto a 4 grados C, sustentada en una disminución de la constante de afinidad, como a 37 grados C.

Existen varias razones que podrían justificar la aparente discordancia de estos resultados. Creemos que en principio exteriorizan hechos biológicos diferentes, reflejando la formación de rosetas la capacidad para la unión de inmunocomplejos particulados y la unión de A-IgG una valoración de la función de los receptores para la unión de inmunocomplejos solubles; que de hecho "in vivo" se comportan también de una forma diferente (54). Hoch y cols encontraron en enfermos con artritis reumatoide una hiperexpresividad

de los receptores Fc medida por rosetas de hematíes recubiertos con IgG y, sin embargo, una captación de A-IgG similar en enfermos y en el grupo control (79). Además, la inhibición de la formación de rosetas con A-IgG fué mucho menor en los monocitos de los pacientes, en teoría crónicamente estimulados (79). Por otro lado, con la prueba de las rosetas valoramos el % de células que expresan receptores, mientras que con el Scatchard obtenemos el número medio de receptores y su afinidad por célula. En lo que respecta a las células de Kupffer, es posible que cada método de estudio de los receptores seleccione algún subgrupo celular específico (167). Además, las partículas de poliacrilamida estaban recubiertas de IgG monomérica, en tanto que la prueba de Scatchard se hizo con IgG agregada. La disparidad entre la unión aumentada de rosetas y la disminución, por otro lado, de la captación y la constante de afinidad de los receptores para los A-IgG sugiere la existencia de una heterogeneidad y/o especificidad de los receptores Fc. En este sentido, estudios en macrófagos y en monocitos han demostrado la existencia de dos receptores distintos para la IgG (32,148,174,175). Gorman ha señalado la diferencia de dos receptores para la IgG en linfocitos humanos, que podrían estar juntos en la membrana celular pero no son idénticos (62a). Hoch fué incapaz de inhibir completamente la formación de rosetas de monocitos con hematíes recubiertos con IgG con A-IgG, un dato más para sustentar la posibilidad de la existencia de dos receptores diferentes para la IgG monomérica y los A-IgG (79).

En cualquier caso, la prueba de rosetas evidencia que en la enfermedad crónica del suero en la rata existe una hiperactividad en algunas funciones de las células del sistema mononuclear fagocítico

(152). No sabemos si dicha hiperactividad es debida a la estimulación crónica por inmunocomplejos o bien a la existencia de otros factores producidos por la activación del sistema inmune, vg gamma-interferón (69,70,144).

Estudios previos de nuestro laboratorio sugerían la presencia de receptores Fc para la IgG en los hepatocitos estudiados "in vitro" (154), por lo que se pensó que de alguna forma estas células colaborarían en la eliminación de inmunocomplejos. El estudio de esta función en las ratas enfermas nos proporcionaba una situación única para valorar el papel de los hepatocitos en una situación de estímulo y de eliminación crónica de inmunocomplejos. Tras la inyección de A-IgG por vía venosa, la captación porcentual "in vivo" fué mayor en célula de Kupffer (67%) que en hepatocitos (33%). En las ratas enfermas aumentaba la captación por las células de Kupffer, pasando al 81 % en ratas estudiadas a los 5 minutos de la inyección de los A-IgG. Cuando el porcentaje se midió a la hora de haber inyectado los A-IgG, los resultados fueron similares a los observados en ratas controles, 58,5 % en células de Kupffer y 41,5 % en hepatocitos. La formación de rosetas en hepatocitos en ratas enfermas estaba incrementada en todas las horas estudiadas con respecto a controles. También estaba aumentada la captación de A-IgG. Mediante la prueba de Scatchard confirmamos un aumento del número de receptores, pero con una constante de afinidad inferior.

Estos resultados confirman la existencia de receptores para la IgG en hepatocitos, aunque "in vivo" parecen tener un papel menos activo que el sugerido por los estudios hecho "in vitro". De hecho, parece que es la célula de Kupffer la que es capaz de modularse ante



la llegada de inmunocomplejos, quizá por encontrarse en contacto con el torrente circulatorio (31), mientras que los hepatocitos muestran una cierta "insensibilidad" hacia ellos, aparte de que "in vivo" la captación de A-IgG sea mayor en Kupffer al contrario de lo sucedido con los estudios "in vitro". Alternativamente, podría pensarse que el hepatocito es menos susceptible de saturarse que la célula de Kupffer.

Por estas razones, parecía que las células de Kupffer eran las máximas responsables del aclaramiento de inmunocomplejos, por lo que decidimos investigar si algún defecto en su funcionamiento podría ser el origen de la saturación del sistema mononuclear fagocítico observado en las ratas enfermas. Para ello analizamos la unión, endocitosis y catabolismo de A-IgG en las células de Kupffer (52,104,112). La unión de A-IgG a 37 grados C se estabilizaba a partir de la segunda hora de incubación en las ratas enfermas, mientras que en los controles ocurría a partir de la tercera hora, estando en todos los tiempos más elevada en el grupo de ratas enfermas (figura 21), aunque la diferencia no fué significativa. La endocitosis fué significativamente menor en las ratas enfermas en las cinco horas consecutivas en que se estudió, un hecho probablemente secundario al paso limitante, que constituye la disminución de la unión. A su vez, ambas disminuciones parecían condicionar el descenso del catabolismo observado en las células de Kupffer de las ratas enfermas, en todos los tiempos estudiados. Aunque hay que tener presente, que los tres procesos en que se puede separar la degradación de los A-IgG por las células de Kupffer son relativamente independientes, y cualquiera de ellos podría estar afectado por separado.

La interpretación global de estos datos indicaría que la persistencia de inmunocomplejos en la circulación, o bien la producción de algún factor por células inmunocompetentes, estimularía a las células de Kupffer (67-70,129,132), lo que se exteriorizaría por el aumento de la formación de rosetas. Aunque por otro lado, dichos receptores Fc tendrían disminuida su capacidad de unión y posterior ingestión y degradación de A-IgG, causa fundamental de la persistencia de inmunocomplejos circulantes, con el consiguiente depósito a nivel tisular.

Los estudios de Frank y cols demostrando un defecto "in vivo" del aclaramiento de hematíes recubiertos con anticuerpos específicos, por el bazo en la anemia hemolítica autoinmune, propició la realización de estudios similares en diversas enfermedades autoinmunes, demostrándose más concretamente en el lupus eritematoso sistémico una correlación con la cifra de inmunocomplejos circulantes en algunos pacientes (174). Según hemos comentado en los estudios previos, hemos corroborado las observaciones previas de Arend y Mannik (5) y de Finbloom y Plotz (50) que los inmunocomplejos solubles son eliminados preferentemente por el hígado, mientras que los particulados lo son por el bazo (54). Con la metodología utilizada por Frank, se obtiene una cierta idea de la situación del SMF "in vivo", pero lo que demuestra fundamentalmente es la función esplénica (53). No hay que olvidar que en el bazo, tanto en el lupus eritematoso sistémico, como en la artritis reumatoide, pueden producirse situaciones de hiperfunción esplénica, quizá no mediadas inmunológicamente (57).

Estudios análogos en animales, concretamente en ratones NZB/NZW F1, han mostrado resultados discordantes. Mannik y cols observaron una disminución de la eliminación de inmunocomplejos formados por albúmina sérica humana- anti-albúmina sérica humana en ratones adultos respecto a ratones jóvenes (127). Esto fué confirmado por Morgan y Steward quienes encontraron un descenso importante de la función macrofágica en estos ratones adultos, midiendo el aclaramiento de polivilpirrolidona que proporciona una medida de la situación funcional del sistema mononuclear fagocítico independiente de los receptores Fc (132a). Por el contrario, utilizando carbón coloidal, se ha encontrado una hiperactividad del sistema mononuclear fagocítico en ratones adultos, Finbloom y Plotz vieron que los ratones NZB/W aclaraban inmunocomplejos más rápidamente que lo hacían los ratones C3H (50). Por último, Carter y cols concluían que el sistema mononuclear fagocítico de ratones con inmunocomplejos crónicamente persistentes estaba inespecíficamente estimulado, mientras que su capacidad para aclarar sustancias vía el Fc estaba selectivamente alterada (20). Estos resultados que sugieren que el SMF muestra funciones de aclaramiento diferentes (137), nos incitaron a buscar otra metodología que nos aproximara con más exactitud al funcionamiento del sistema mononuclear fagocítico en la enfermedad autoinmune humana.

Los monocitos sanguíneos circulantes comparten propiedades comunes con el resto del SMF, entre ellas la presencia de receptores Fc y C3b (84); por otro lado, son las células precursoras de los macrófagos tisulares y son fácilmente accesibles para su estudio (8). Por estas razones se ha sugerido que su situación funcional

reflejaría la del resto del sistema mononuclear fagocítico (107). Se han estudiado diversas funciones de esta extirpe celular en varias enfermedades autoinmunes humanas, alcanzando resultados muy dispares (9,79,95). Hay que tener presente que numerosos trabajos en diferentes animales indican la presencia de diferencias entre los macrófagos de los distintos tejidos (115). Por estos motivos, decidimos estudiar en nuestro modelo la expresividad de los mencionados receptores y compararla con la detectada concomitantemente en células residentes del sistema mononuclear fagocítico (células de Kupffer).

Dicha expresividad fué medida por la prueba de rosetas en ratas enfermas a las 18 horas de la administración de la ovoalbúmina y comparada con la encontrada en células de Kupffer. El porcentaje de monocitos que formaban rosetas fué similar al del grupo control, mientras que en las células de Kupffer el porcentaje estaba incrementado.

Desconocemos las razones que pueden justificar estas diferencias entre las células circulantes (monocitos) y las fijas (células de Kupffer) del sistema mononuclear fagocítico. Es posible que ambas células respondan de forma diferente al estímulo crónico por inmunocomplejos. Otra explicación alternativa sería que la ovoalbúmina estimularía exclusivamente a las células de Kupffer, y no a los monocitos, pues estos últimos carecen de receptores para la misma.

En cualquier caso, estos resultados sugieren que los monocitos no se comportan de forma idéntica a como lo hacen las células de Kupffer, por lo que en principio su situación funcional no debería

interpretarse como el reflejo de la situación global del sistema mononuclear fagocítico.

## 6. CONCLUSIONES

En un modelo de enfermedad crónica por inmunocomplejos inducida en ratas, tras las inyecciones repetidas de ovoalbúmina, hemos estudiado la función de los receptores Fc, tanto "in vitro" como "in vivo", alcanzando las siguientes conclusiones.

1. En las ratas enfermas, que presentaban una nefritis manifiesta (con depósitos en la pared capilar glomerular y proteinuria masiva), se observó un aclaramiento retrasado de los agregados de IgG marcados con  $^{125}\text{I}$ .

2. Coincidiendo con este retraso se evidenció un depósito incrementado de los agregados en diversos tejidos, siendo estadísticamente significativo a nivel renal.

3. Dependiendo del tiempo del estudio de las ratas enfermas, en relación con la inyección de la ovoalbúmina, se observaron dos grupos de animales. A la 1/2 hora de la inyección de la ovoalbúmina (grupo I), todas las ratas tenían inmunocomplejos circulantes y depósitos de IgG en el hígado, estudiados por inmunofluorescencia. El estudio "in vitro" de los receptores Fc para la IgG, medidos por rosetas, demostró una significativa disminución en la formación de rosetas de las células de Kupffer de las ratas enfermas en relación al grupo control. Estos datos estarían de acuerdo con la hipótesis clásica de una saturación o bloqueo de los receptores, por la llegada masiva de inmunocomplejos a la circulación. Lo que conllevaría a una prolongación de los inmunocomplejos en la circulación, y su subsiguiente depósito tisular.

4. A las 18 horas de la inyección de la ovoalbúmina (grupo II) se observó, en todos los animales, una ausencia de inmunocomplejos circulantes y de depósito hepático de IgG. El estudio de las células

de Kupffer , demostró un incremento en la formación del número de rosetas en relación con el grupo control.

5. Para estudiar los mecanismos del aclaramiento defectuoso en las ratas del grupo II, se realizaron estudios de la función de los receptores Fc a 4 y 37 grados. Las ratas enfermas mostraron un número similar de receptores al de los animales controles, pero con una significativa disminución en su afinidad. También se observó una disminución en la unión, endocitosis y catabolismo. Todos estos datos sugieren que la saturación del sistema mononuclear fagocítico residiría en una alteración de la función de los receptores Fc, que o bien estarían bloqueados por la presencia en la circulación de inmunocomplejos, o bien, mostrarían una expresividad anómala con una función defectuosa.

6. Por último, comprobamos que los monocitos (célula periférica del sistema mononuclear fagocítico) no se comportan de forma idéntica a como lo hacen las células de Kupffer (célula residente), en la expresividad de los receptores Fc, medidos por rosetas, por lo que en principio su situación funcional no debería interpretarse como el reflejo de la situación global del sistema mononuclear fagocítico.



## 7. RESUMEN

Hemos inducido una enfermedad crónica por inmunocomplejos en ratas, fácilmente reproducible y con un curso evolutivo muy homogéneo, para estudiar la función de los receptores Fc del sistema mononuclear fagocítico, tanto "in vivo" como "in vitro".

Las ratas enfermas se han estudiado en dos momentos diferentes, en relación a la inyección de la ovoalbúmina, a la media hora (grupo I) y las 18 horas (grupo II). Las pruebas de aclaramiento mostraron una elevación de la t<sub>1/2</sub> del componente rápido de eliminación de los agregados de IgG, con un aumento del depósito tisular de agregados en diversos tejidos, siendo significativo, respecto a controles normales, a nivel renal. Todas las ratas del grupo I tenían inmunocomplejos circulantes, depósitos de IgG, medidos por inmunofluorescencia, en hígado y disminución de la formación de rosetas con partículas de poliacrilamida recubiertas con IgG monomérica. Ninguna rata del grupo II tenía inmunocomplejos circulantes, siendo la inmunofluorescencia hepática negativa en todas y mostrando un incremento, estadísticamente significativo, en la formación de rosetas respecto a los controles.

Estos datos sugerían la existencia de una alteración de la función de los receptores Fc, por lo que se midió la actividad de dichos receptores, mediante la unión de A-IgG a 4 y a 37 grados C. Las células de Kupffer de las ratas enfermas tenían un número de sitios de unión para los A-IgG similar a los controles, pero con una afinidad significativamente menor. También se observó una disminución

de la unión a 37 grados C, así como de la endocitosis y del catabolismo de los agregados.

Todos estos datos sugieren que la saturación del sistema mononuclear fagocítico residiría en una alteración de la función de los receptores Fc, que o bien estarían bloqueados por la presencia en la circulación de inmunocomplejos (grupo I), o bien, mostrarían una hiperexpresividad anómala con una función defectuosa (grupo II). En cualquiera de las dos situaciones se produce una persistencia en la circulación de inmunocomplejos, con el subsiguiente depósito tisular y la aparición de enfermedad.

Por otro lado, comprobamos que los monocitos (célula periférica del sistema mononuclear fagocítico) no se comportan de forma idéntica a como lo hacen las células de Kupffer (células residentes), en la expresividad de los receptores Fc, medidos por rosetas, por lo que en principio su situación funcional no debería interpretarse como el reflejo de la situación global del sistema mononuclear fagocítico.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ackerman SK and Douglas SD: Purification of human monocytes on microexudate-coated surfaces. *J Immunol*, 120: 1372-1374. 1978.
2. Alexander EL, Titus JL and Segal DM: Quantitation of Fc Receptors and surface immunoglobulin is affected by cell isolation procedures using plasmagel and Ficoll-Hypaque. *J Immunol Methods*, 22: 263-272, 1978.
3. Arend WP and Mannik M: "In vitro" adherence of soluble immune complexes to macrophages. *J Exp Med*, 136: 514-531, 1972.
4. Arend WP and Mannik M: The macrophage receptor for IgG: number and affinity of binding sites. *J Immunol*, 110: 1455-1463, 1973.
5. Arend WP and Mannik M: Studies on antigen-antibody complexes. *J Immunol*, 107: 63-75, 1971.
6. Arisz L, Noble B, Milgrom M, Brentjens JR and Andres GA: Experimental chronic serum sickness. *Int Archs Allergy appl Immun*, 60: 80-88, 1979.
- 6a. Atkinson JP, Schreiber AS and Frank MM: Effect of corticosteroids and splenectomy on the immune clearance and destruction of erythrocytes. *J Clin Invest*, 52: 1509-1511, 1973.
7. Atkins CJ, Kondon JJ, Quismorion FR and Friou GJ: The choroid plexus in Systemic Lupus Erythematosus. *Ann Inter Med*, 76: 65-72, 1972.
8. Bakker JM, Witt AW and Daems WT: The relation between monocytes and resident (tissue) macrophages. *En Haematology and blood transfusion*, vol 27. Ed by Schmalzl F, Huhn D and Schaefer HE. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. 1981. Pag: 79-87.

9. Bar-Eli M, Ehrenfeld M, Litvin Y and Gallily R: Monocyte function in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*, 9: 17-23, 1980.
10. Benacerraf B, Sebesteyn M and Cooper NS: The clearance of antigen-antibody complexes from the blood by the reticulo-endothelial system. *J Immunol*, 82:131-137, 1959.
11. Biozzi G, Benacerraf B and Halpern BN: Quantitative studies of the granuloplectic activity of the reticuloendothelial system. *Br J Exp Pathol*, 34: 4441-4457, 1953.
12. Bianco C, Griffin FM, Silverstein SC: Studies of the macrophage complement receptor: alteration of receptor function upon macrophage activation. *J Exp Med*, 141: 1278-1290, 1975.
13. Bockow B and Mannik M: Clearance and tissue uptake of immune complexes in complement-depleted and control mice. *Immunology*, 42:497-504, 1981.
14. Bodenheimer HC, Charland C and Tente WE: Effect of immune complex models on rat Kupffer cell function. *Hepatology*, 3: 845, 1983.
15. Border WA, Kamil ES, Ward HJ and Cohen AH: Antigenic charge as a determinant of immune complex localization in the rat glomerulus. *Lab Invest*, 40: 442-449, 1981.
16. Bourne JT, Raynor WJ and Verrier-Jones J: Studies of mononuclear phagocyte function in the rat. II. Saturation and recovery following intravenous administration of soluble human serum albumin (HSA)-anti HSA complexes. *Clin Exp Immunol*, 51: 69-76, 1983.
17. Bradfield JWB: A new look at reticuloendothelial blockade. *Br J Exp Pathol*, 61: 617-623. 1980.

18. Brennan FM, Grace SA and Elson JC: Preparation of covalent IgG complexes of defined size and their clearance from the circulation of mice. *J Immunol Methods*, 56: 149-158, 1983.
19. Carter SD, Bourne JT, Elson CJ, Hutton CW, Czudek R and Dieppe PA. Mononuclear phagocytes in rheumatoid arthritis: Fc-receptor expression by peripheral blood monocytes. *Ann Rheum Dis*, 43: 424-429, 1984.
20. Carter SD, Brennan FM, Grace SA and Elson CJ: Clearance and organ localization of particles and soluble complexes in mice with circulating complexes. *Immunology*, 52: 761-769, 1984.
21. Casale TB and Kaliner M: A rapid method for isolation of human mononuclear cells free of significant platelet contamination. *J Immunol Methods*, 55: 347-353, 1982.
22. Chadwick SJD, Aldridge M and Dudley HA: Detection of reticuloendothelial blockade with low-dose test agent. *Br J Exp Path*, 66: 483-491, 1985.
23. Chamnes GC and Guyre WL: Scatchard plots: common errors in correction and interpretation. *Steroids*, 26: 538-542, 1975.
24. Christian CL: Studies of aggregated gamma globulin. 1. Sedimentation electroforetic and anticomplementary properties. *J Immunol*, 84:112-116, 1960.
25. Christian CL: Immune complex disease. *New England J Med*, 290: 878-884, 1969.
26. Cianciolo GJ and Snyderman R: Quantitation of the inflammatory accumulation of mononuclear phagocytes in vivo. *Methods for studying mononuclear phagocytes*. Academic Press, Inc, 1981.

27. Cochrane CG and Koffer D. Immune complex disease in experimental animals and man. *Adv Immunol*, 16: 185-264, 1973.
28. Cornacoff JB: Primate erythrocyte immune complex-clearing mechanism. *J Clin Invest*, 71: 236-247, 1983.
29. Cosio FG, Ackerman SK, Douglas SD, Friend PS and Michael AF: Soluble immune complexes binding to human monocytes and polymorphonuclear leucocytes. *Immunology*, 44: 773-780, 1981.
30. Cosio FG, Douglas SD and Michael AF: The human FcR. III. Effects of pronase on soluble immune complex binding by polymorphonuclear leucocytes, monocytes and pulmonary macrophages. *Immunology*, 46:395-400, 1982.
31. Crofton RW, Diesselhoff-Den Dulk MMC and Van Furth R: The origin, kinetics and characteristics of the Kupffer cells in the normal steady state. *J Exp Med*, 148:1-17, 1978.
32. Cunningham-Rundles C, Lawless D, Gupta S, Galands C and Good RA: Isolation and partial characterization of the IgG Fc receptor of human T lymphocytes and production of an antiserum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77: 3645-3648, 1980.
33. Daha MR and van ES LA: The role of cellular Fc and C3 receptors on the complement-dependent degradation of stable soluble immunoglobulin aggregates by normal and trypsin-treated peritoneal macrophages. *J Immunol*, 47:203-209, 1982.
34. Davin JC, Foidart JB and Mahieu PR: Fc-receptor function in Henoch-Schönlein disease of childhood. *Proc EDTA*, 19: 590-596, 1982.
35. Dickler HB and Kunkel HG: Interaction of aggregated gamma-globulins with B lymphocytes. *J Exp Med*, 136: 191-196, 1972.



- 36a. Dixon FJ, Feldman JD, Vazquez JJ: Experimental glomerulonephritis. The pathogenesis of a laboratory model resembling the spectrum of human glomerulonephritis. *J Exp Med*, 113: 899-920, 1961.
36. Doekes G, Van Es LA and Daha MR: Influence of aggregate size on the binding and activation of the first component of human complement by soluble IgG aggregates. *Immunology*, 45: 705-713, 1982.
37. Dower SK, De Lisi Ch, Titus JA and Segal DM: Mechanism of binding of multivalent immune complexes to Fc receptors. 1. Equilibrium binding. *Biochemistry*, 20:6326-6334, 1981.
38. Editorial: Receptor-mediated endocytosis, host defense, and inflammation. *Lab Invest*, 48: 117-119, 1983.
39. Editorial: A place for soluble immune complex in clinical immunology. *Immunol Today*, 6:80-82, 1985.
40. Egido J, Sánchez M, Alonso F, Barat A, Hernando L: Absence of an anaphylactic vasopermeability mechanism for immune complex deposition in the Heymann nephritis of rats. *Clin Exp Immunol*, 42: 99-106, 1980.
41. Egido J, Sancho J, Rivera F and Sánchez-Crespo M: Handling of soluble IgA aggregates by the mononuclear phagocytic in mice. A comparison with IgG aggregates. *Immunology*, 46: 1-7, 1982.
42. Egido J, Sancho J, Rivera F and Hernando L: The role of IgA and IgG immunocomplexes in IgA nephropathy. *Nephron*, 36: 59-64, 1984.
43. Elkon KB, Delacroix DL, Gharavi AE, Vaerman JP and Hughes GRV: IgA and polymeric IgA rheumatoid factor in systemic sicca syndrome: partial characterization. *J Immunol*, 129: 576-581, 1982.

44. Emlen W and Mannik M: Effect of preformed immune complexes on the clearance and tissue localization of single-stranded DNA in mice. *Clin Exp Immunol*, 40: 264-272, 1980.
45. Emlen W and Mannik M: Clearance of circulating DNA-anti DNA immune-complexes in mice. *J Exp Med*, 155: 1210-1215, 1982.
46. Emlen W and Mannik M: Effect of DNA size and strandedness on the in vivo clearance and organ localization of DNA. *Clin Exp Immunol*, 56: 185-192, 1984.
47. Emlen W and Mannik M: Kinetics and mechanisms for removal of circulating single-stranded DNA in mice. *J Exp Med*, 147: 684-699, 1978.
48. Fennell RM and Pardo VM: Experimental glomerulonephritis in rats. *Lab Invest*: 17, 481-488, 1967.
49. Finbloom DS and Plotz PH: Studies of reticuloendothelial function in the mouse with model immune complexes. *J Immunol*, 123: 1594-1599, 1979.
50. Finbloom DS and Plotz PH: Studies of reticuloendothelial function in the mouse using model immune complex. II. Serum clearance, tissue uptake, and reticuloendothelial saturation in NZB/NZW mice. *J Immunol*, 123: 1600-1603, 1979.
51. Finbloom DS, Magilavy DB, Harford JB, Rifai A and Plotz PH. Influence of antigen on immune complex behaviour in mice. *J Clin Invest*, 68: 214-224, 1981.
52. Finbloom DS: Binding, endocytosis, and degradation of model immune complexes by murine macrophages at various levels of activation. *Clin Immunol Immunopathol*, 36: 275-288, 1985.

53. Frank MM: In vivo studies of Fc receptor dependent clearance: defects in autoimmune disease and associated with the HLA B8 DRW3 haplotype. In immunopathology: VIIIth International Symposium. 1980, pag 387. Academic Press, Inc.
54. Frank MM, Lawley TJ, Hamburger MI and Brown EJ: Immunoglobulin G Fc receptor-mediated clearance in autoimmune diseases. Ann Inter Med, 98: 206-218, 1983.
55. Fries LF, Mullins WW, Cho KR, Plotz PH and Frank MM: Monocyte receptors for the Fc portion of IgG are increased in systemic lupus erythematosus. J Immunol, 132: 695-701, 1984.
56. Fries LF, Hall RP, Lawley TJ, Crabtree GR and Frank MM: Monocyte receptors for the Fc portion of IgG studied with monomeric human IgG1: normal in vitro expression of Fc gamma receptors in HLA-B8/DRW3 subjects with defective Fc gamma-mediated in vivo clearance. J Immunol, 129: 1041-1049, 1982.
57. Fries LF, Brickman Ch M and Frank MM: Monocyte receptors for the Fc portion of IgG increase in number in autoimmune hemolytic anemia and other hemolytic states and are decreased by glucocorticoid therapy. J Immunol, 131: 1240-1245, 1983.
58. Frommel D and Rachman F: Receptor for the Fc portion of IgG on the plasma membrane of the hepatocyte. Ann Immunol, 130: 553-560, 1979.
59. Gelfand MC, Frank MM, Green I and Shiu ML: Binding sites for immune complexes containing IgG in the renal interstitium. Clin Immunol Immunopathol, 13: 19-29, 1979.

60. Genin C, Cosio FG and Michael AF: Macromolecular charge and reticuloendothelial function: comparison between the kinetics of administered native and cationized ferritins and the corresponding immune complexes in the mouse. *Immunology*, 51: 225-238, 1984.
61. Germuth FG, Rodríguez E, Lorelle CA, Trump ZI, Milano L and Wise DL: Passive immunocomplex glomerulonephritis in mice: Models for various lesions found in human disease. *Lab Invest*, 41: 360-365, 1979.
62. Gordon PA, Davis P, Russell AS, Coates JE, Rothwell RS, Le Clerq: Splenic reticuloendothelial function in patients with active rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 8: 490-493, 1981.
- 62a. Gormus BJ, Woodson M, Kaplan ME: Heterogeneity of human lymphocyte Fc receptors. *Clin Exp Immunol*, 34: 274-280, 1978.
63. Grabar P and Williams CA: Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au serum sanguin. *Biochim Biophys Acta*, 10: 193-195, 1953.
64. Grace SA and Brennan FM: Clearance and localization of immunoglobulin oligomers in mice with chronic circulating endogenous complexes. *Immunology*, 47: 221-226, 1982.
65. Grace SA and Elson JC: Continuous production of anti-host IgG antibodies contained in circulating IgG-anti-IgG complexes. *Immunology*, 47: 289-296, 1982.
66. Greenwood FC, Hunter MW and Glover JS: The preparation of <sup>125</sup>I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J*, 89: 114-123, 1963.

67. Griffin FM: Effects of soluble immune complexes on Fc receptor and C3b receptor-mediated phagocytosis by macrophages. *J Exp Med*, 152: 905-919, 1980.
68. Griffin FM: Roles of macrophages Fc and C3b receptors in phagocytosis of immunologically coated *Cryptococcus neoformans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78: 3853-3857, 1981.
69. Guyre PM, Crabtree GR, Bodwell JE and Munck A: MLC-conditioned media stimulate an increased in Fc receptors on human macrophages. *J Immunol*, 126: 666-668, 1981.
70. Guyre PM, Morganelli PM, Miller R: Recombinant immune interferon increases immunoglobulin G Fc receptors on cultured human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest*, 72: 393-397, 1983.
71. Haakenstad AO and Mannik M: Saturation of the reticuloendothelial system with soluble immune complexes. *J Immunol*, 112: 1939-1948, 1974.
72. Haakenstad AO, Case JB and Mannik M: Effect of cortisone on the disappearance kinetics and tissue localization of soluble immune complexes. *J Immunol*, 114: 1153-1160, 1975.
73. Hall RP, Lawley TJ, Heck JA and Katz SI: IgA-containing immune complexes in dermatitis herpetiformis, Henoch-Schönlein purpura, systemic lupus erythematosus and other diseases. *Clin Exp Immunol*, 40: 431-437, 1980.
74. Hamburger MI, Lawley TJ, Kimberly RP, Plotz PH and Frank MM: A serial study of splenic reticuloendothelial system Fc receptor functional activity in Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum*, 25: 48-54, 1982.

75. Hardin JA and Downs JT and Malawista SE: Serum IgG interrupts the monocytes but not to granulocitos. *Arthritis Rheum*, 25 (suppl): 33, 1982.
76. Helin H, Rantala I, Väisänen J and Pasternack A: Glomerulonephritis induced by high doses of ovalbumin. *Virchows Arch A Path Anat and Hist*, 381: 331-342, 1979.
77. Henderson JM, Bell DA, Hart M, Chamberlain MJ: Reticuloendotelial function in rheumatoid arthritis: correlation with disease activity and circulating immune complexes. *J Rheumatol*, 8: 486-489, 1981.
78. Hernando P, Egido J, Nicolás R, Sancho J: Clinical significance of polymeric and monomeric IgA complexes in patients with IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* (en prensa).
79. Hoch S and Schur P: Monocyte receptor function in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 24: 1268-1277, 1981.
80. Hoffsten PE, Swerdlin A, Bartell M, Hill CL, Venverloh J, Brotherson K and Klahr S: Reticuloendothelial and mesangial function in murine immune complex glomerulonephritis. *Kidney Int*, 15: 144-159, 1979.
81. Hopf U, Meyer KH and Dierich MP: Demonstration of binding sites for IgG Fc and the third complement component (C3) on isolated hepatocytes. *J Immunol*, 117: 639-645, 1976.
82. Hopf U, Schaefer HE, Hess G and Meyer KH: In vivo uptake of immune complexes by parenquimal and nonparenquimal liver cells in mice. *Gastroenterology*, 80: 250-259, 1981.

83. Horgan C and Taylor: Studies on the kinetics of binding of complement-fixing dsDNA/anti-dsDNA immune complexes to the blood cells of normal individuals and patients with lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 27: 320-329, 1984.
84. Huber H, Polley MJ, Linscott WD, Fudenberg HH and Müller-Eberhard HJ: Human monocytes: Distinct receptor sites for the third component of complement and for immunoglobulin G. *Science*, 162: 1261-1263, 1968.
85. Hunsicker LG, Sheaver TP, Plattner SB and Weisenburger D. The role of monocytes in serum sickness nephritis. *J Exp Med*, 150: 413-425, 1979.
86. Hunter WM and Greenwood FC: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*, 194: 495-496, 1962.
87. Hurst N and Nuki G: The macrophage-origens, function and role in the rheumatic diseases. In immunological aspects of rheumatology. Ed by Dick WC. MYP Press Limited, Lancaster. England. 1981. Pag: 183.
88. Inada Y, Kamiyama M and Clark WS: Involvement of human erythrocytes in the immobilization of circulation immune complexes. *Arthritis Rheum*, 25: 195, 1982.
89. Ishizaka T, Ishizaka K, Schum S and Fudenberg H: Biologic activity of aggregated gamma globulin. VII. Aggregated immunoglobulins of different cases. *J Immunol*, 99: 82-91, 1960.
90. Ito S, Andres G and Brentjens J: The function of the macrophage-phagocyte system in rabbits with serum sickness. En *Recent advances in systemic lupus erythematosus*. Ed Lambert PH, Perrin L and Izui S. Academic Press. London. 1984. Pag 249-258.

91. Izui S, Lambert PH and Miescher FA: In vitro demonstration of a particular affinity of glomerular basement membrane and collagen for DNA. *J Exp Med*, 144: 428-443, 1976.
92. Jiménez RAH and Mannik M: Evaluation of aggregated IgG in mice as an Fc receptor-specific probe of the hepatic mononuclear phagocytic system. *Clin Exp Immunol*, 49: 200-208, 1982.
93. Jiménez RAH, Haakenstad AO and Mannik M: Hepatic uptake of small-latticed immune complexes does not alter mononuclear phagocyte system function. *Immunology*, 48: 205-210, 1983.
94. Jones JF, Plotz FH and Segal DM: Complement and cell mediated lysis of haptened erythrocytes sensitized with oligomers of rabbit IgG antibody. *Mol Immunol*, 16: 889-897, 1979.
95. Katayama S, Chia D, Nasu H and Knutsson DW. Increased Fc receptor activity in monocytes from patients with rheumatoid arthritis: a study of monocytes binding and catabolism of soluble aggregated of IgG in vitro. *J Immunol*, 127: 643-647, 1981.
96. Katayama SD, Chia DW, Knutson DW and Barnett EV: Decreased Fc receptor avidity and degradative function of monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 131: 217-222, 1983.
97. Kawai M, Lukacs K, Soukoly I, Falocki K and Szegedi GY: Circulating immune complexes and monocyte Fc function in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis*, 38: 79-83, 1979.
98. Kawai M, Sandor M, Szegedi GY, Füst G and Gergely J: Effect of soluble immune complex on Fc and C3 receptor-dependent phagocytosis by human monocytes. *Immunology*, 44: 599-606, 1981.



99. Kawai M, Sándor M, Szegedi GY, Fust G and Gergely J: Effect of soluble immune complexes on Fc and C3 receptor-dependent phagocytosis by human monocytes. *Immunology*, 44: 599-606, 1982.
100. Keane WF and Rajai L: Impaired mesangial clearance of macromolecules in rats with chronic mesangial ferritin-antiferritin immune complex deposition. *Lab Invest*, 43: 500-508, 1980.
101. Kijlstra A, Van der Lelij A, Knutson DW, Fleuren GJ and Van Es LA: The influence of phagocyte function on glomerular localization of aggregated IgM in rats. *Clin Exp Immunol*, 32: 207-217, 1978.
102. Kijlstra A, Van Es LA and Daha MR: Enhanced degradation of soluble immunoglobulin aggregates by macrophages in the presence of complement. *Immunology*, 37: 673-680, 1979.
103. Kijlstra A, Van Es LA and Daha MR: The role of complement in the binding and degradation of immunoglobulin aggregates by macrophages. *J Immunol*, 123: 2488-2493, 1979.
104. Kimberly RP and Ralph P: Endocytosis by the mononuclear phagocytosis system and autoimmune disease. *Am J Med*, 74: 481-493, 1983.
105. Kimberly RP, Parris TM, Inman RD and McDougal JS: Dynamics of mononuclear phagocyte system Fc receptor function in systemic lupus erythematosus. Relation to disease activity and circulating immune complexes. *Clin Exp Immunol*, 51: 261-268, 1983.
106. Kimberly RPA, Gibofsky A, Salmon JE and Fotino M: Impaired Fc-mediated mononuclear phagocyte system clearance in HLA-DR 2 and MR 1-positive healthy young adults. *J Exp Med*, 157: 1698-1703, 1983

107. Kimberly RP, Salmon JE, Bussel JB, Crow MK and Hilgartner MW: Modulation of mononuclear phagocyte function by intravenous gamma-globulin. *J Immunol*, 132: 745-750, 1984.
108. Knutson DW, Kijlstra A and Van Es LA: Association and dissociation of aggregated IgG from rat peritoneal macrophages. *J Exp Med*, 145: 1368-1381, 1977.
109. Knutson DW, Kijlstra A and Van Es LA: The kinetics for binding and catabolism of aggregated IgG by rat peritoneal macrophages. *J Immunol*, 123: 2040-2048, 1979.
110. Knutson DW, Chia D, Barnett EV and Levy L: Blood clearance and tissue localization of soluble aggregates of IgG in NZB/W and NZB mice. *Immunology*, 54: 439-448, 1985.
111. Kurlander RJ: Reversible and irreversible loss of Fc receptor function of human monocytes as a consequence of interaction with immunoglobulin G. *J Clin Invest*, 66: 773-781, 1980.
- 111a. Kurlander RJ, Ellison DM and Hall J: The blockade of Fc receptor-mediated clearance of immune complexes in vivo by a monoclonal antibody (2.4G2) directed against Fc receptors on murineleucocytes. *J Immunol*, 133: 855-862, 1984.
112. Laan-Klamer SMV, Harms G, Atmosoerodjo JE, Meijer DKF, Hardonk MJ and Hoedemaeker PJ. : Studies on the mechanism of binding and uptake of immune complexes by various cell types of rat liver in vivo. *Scand J Immunol*, 23: 127-133, 1986.
113. Lane BC, Kan-Mitchell J, Mitchell MS and Cooper SM: Structural evidence for distinct IgG subclass-specific Fc receptor on mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med*, 152: 1147-1161, 1980.

- 113a. Lane BC and Cooper SM: Fc receptor of mouse cell lines. *J Immunol*, 128: 1819-1823, 1982.
114. Leslie RGQ: The binding of soluble immune complexes of guinea pig IgG2 to homologous peritoneal macrophages. Determination of the avidity constants at 4 gr C. *Eur J Immunol*, 10: 317-322, 1980.
115. Leslie RGQ: Macrophage handling of soluble immune complexes ingestion and digestion of surface-bound complexes at 4, 20 and 37 gr C. *Eur J Immunol*, 10: 323-333, 1980.
- 115a. Lewis RM, Svhwartz RS and Henry WB: Canine systemic lupus erythematosus. *Blood*, 25: 143-160, 1965.
116. Lightfoot RW, Drusin RE and Christian CL: Properties of soluble immune complexes. *J Immunol*, 105: 1493-1500, 1970.
117. Mc Conahey PJ and Dixon FJ: A method of trace iodination of proteins for immunologic studies. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 29: 185-189, 1966.
118. Magilavy DB, Rifai A and Plotz PH. An abnormality of immune complex kinetics in murine lupus. *J Immunol*, 126: 770-774, 1981.
119. Magilavy DB, Hundley T and Finbloom DB: Abnormal binding of soluble immune complexes to liver non-parenchymal cells of NZB/W f1 mice. *Arthritis Rheum*, 25: 240, 1982.
120. Magilavy DB, Hundley TR, Steinberg AD and Finbloom DS: Abnormal binding of soluble IgG immune complex to hepatic nonparenquymal cells of autoimmune mice. *J Immunol*, 131: 2784- 2788, 1983.
121. Malaise MG, Foidart JB, Hauwart C, Mahieu P and Franchimont P: In vivo studies on the mononuclear phagocyte system Fc receptor function in rheumatoid arthritis. Correlations with clinical and immunological variables. *J Rheumatol*, 12: 33-42, 1985.

122. Mancini G, Carbonara OA and Heremans JF: Immunological quantitation of antigens by single radial immunodifusion. *Immunochemistry*, 2:235-254, 1965.
123. Mannik M, Arend WP, Hall AP and Gilliland BC: Studies on antigen-antibody complexes. I. Elimination of soluble complexes from rabbit circulation. *J Exp Med*, 133: 713-739, 1971.
124. Mannik M and Striker GE: Removal of glomerular deposits of immune complexes in mice by administration of excess antigen. *Lab Invest*, 42: 483-489, 1980.
125. Mannik M: Pathophysiology of circulating immune complexes. *Arthritis Rheum*, 25: 783-787, 1982.
126. Mannik m, Agodoa LYC and David KA: Rearrangement of immune complexes in glomeruli leads to persistence and development of electron dense deposits. *J Exp Med*, 157: 1516-1528, 1983.
127. Mannik M: Characteristic of immune complexes and principles of immune complex diseases. In the *Arthritis and allied conditions*. Ed McCarthy DJ. Tenth Ed. Lea and Febiger. Philadelphia. 1985. Pag: 379-391.
128. Martin RG and Ames BN. A method for determinig the sedimentation behavoir of enzymes: Aplication to protein mixtures. *J Biol Chemis*, 236: 1372-1379, 1981.
129. Miyaba-Inaba M, Suzuki T, Paku Y-H and Masuda T: Feedback regulation of immune responses by immune complexes: possible involvement of a suppressive lymphokines by FcR gamma-bearing B cell. *J Rheumatol*, 128: 882-887, 1981.

130. Mizoguchi Y, Tanimoto K, Yue Ch and Horiuchi Y: Immune receptors (IgG-Fc and complement receptors) in normal human organs. *Lab Invest*, 40: 703-707, 1979.

131. Mizoguchi Y and Horiuchi Y: Localization of IgG-Fc receptors in human renal glomeruli. *Clin Immunol Immunopathol*, 24: 320-329, 1982.

132. Morgan EL and Weigle WO: Polyclonal activation of murine B lymphocytes by immune complexes. *J Immunol*, 130: 1066-1070, 1983.

132a. Morgan AG and Steward MW: Macrophages clearance function and immune complex disease in New Zealand Black/White F1 hybrid mice. *Clin Exp Immunol*, 26: 133-139, 1976.

133. Morland B and Kaplan G: Macrophage activation in vivo and in vitro. *Exp C Res*, 108: 279-288, 1977.

133a. Nathan CF and Chon ZA: Cellular components of inflammation: monocytes and macrophages. En textbook of rheumatology. Ed por Kelley WN, Harris ED, Ruddy S and Sledge CB. Saunders Company. Philadelphia. 1981. Pag: 136.

134. Neufeld EF and Ashwell G: Carbohydrate recognition systems for receptor mediated pinocytosis. In the *Biochemistry of glucoproteins and proteoglycans*. Ed Lenmarz WJ. Plenum Publishing Corp, New York. 1980. Pag: 241-266.

135. Nishi T, Bhan AK, Collins AB and McCluskey RT: Effect of circulating immune complexes on Fc and C3 receptors of Kupffer cells in vivo. *Lab Invest*, 44: 442-448, 1981.

136. Noble B, Olson K, Milgrom P and Albini B: Tissue deposition of immune complexes in mice receiving dialy injections of bovine serum albumin. *Clin Exp Immunol*, 42: 255-262, 1980.

137. Normann SJ: Kinetics of phagocytosis. II. Analysis of in vivo clearance with demonstration of competitive inhibition between similar and dissimilar foreign particles. *Lab Invest*, 31: 161-167, 1974.

138. Otani I, Conrad DH, Carlo JR, Segal DM and Ruddy S: Phagocytosis by rat peritoneal mast cells: independence of IgG Fc-mediated and C3-mediated signals. *J Immunol*, 129: 2109-2112, 1982.

139. Duchterlony O: In vitro method for testing the toxin producing capacity of diphtheria bacteria. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 25:186- ,1948.

140. Palestro G, Mazzucco G, Navone R, Canese MG, Coda R, Novero D, Micca FB and Leonardo E: Role of the T-cell system in glomerulonephritis induced in rats by human serum albumin. *Virchows Arch B Cell Path*, 35: 19-32, 1980.

141. Papalian M, Lafer E, Wong R and Stollar D: Reaction of systemic lupus erythematosus antinative DNA antibodies with native DNA fragments from 20 to 1200 base pairs. *J Clin Invest*, 65: 469-477, 1980.

142. Parris TM, Kimberly RP, Imman RD, Dougal Mc JS, Gibofsky A and Christian CL: Defective Fc receptor mediated function of the mononuclear phagocyte system in lupus nephritis. *Ann Intern Med*, 97: 526-532, 1982.

143. Pennebaker JB, Gilliam JN and Ziff M: Immunoglobulin classes of DNA binding activity in serum and skin in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*, 60: 1331-1336, 1977.

144. Perussia B, Dayton ET, Lazarus R, Fanning V and Trinchieri G: Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocyte and myeloid cell. *J Exp Med*, 158: 1092-1113, 1983.

145. Plotz PH, Kimberly RP, Guyer RL, Segal DM: Stable model immune complexes produced by bivalent affinity labelling haptens: in vivo survival. *Mol Immunol*, 16: 721-729, 1979.
- 146a. Plotz PH: Current comment: Studies of immune complexes. *Arthritis Rheum*, 25: 1151-1155, 1982.
146. Praaning DP, Brouwer A and Knook DL: Clearance capacity of rat liver Kupffer, endothelial and parenchymal cells. *Gastroenterology*, 81: 1036-1044, 1981.
147. Raff HV, Picker LJ and Stobo JD: Macrophage heterogeneity in man. *J Exp Med*, 152: 581-593, 1980.
148. Rasmussen JM, Brandslund I, Leslie RGO and Svehag S-E: Quantitative studies of Fc receptors on human monocytes: characterization by binding of homologous and heterologous monomeric IgG and soluble immune complexes of different composition. *Immunology*, 49: 537-544, 1983.
149. Raveché ES: Genetics of human and murine lupus erythematosus. In Steinberg AD, moderator. *Systemic lupus erythematosus: insights from animals models*. *Ann Intern Med*, 100: 714-727, 1984.
150. Reif AE: Batch preparation of rabbit gammaG globulin with DEAE-cellulose. *Immunochemistry*, 6: 723-731, 1969.
151. Roubin R and Zolla-Pazner S: Markers of macrophage heterogeneity. I. Studies of macrophages from various organs of normal mice. *Eur J Immunol*, 9: 972-978, 1978.
152. Salmon JE, Kimberly RP, Gibofsky A and Fotino M: Defective mononuclear function in systemic lupus erythematosus: dissociation of Fc receptor-ligand binding and internalization. *J Immunol*, 133: 2525-2531, 1984.

153. Sánchez-Crespo M, Alonso F, Barat A and Egido J: Rat serum sickness: possible role of inflammatory mediators allowing deposition of immune complexes in the glomerular basement membrane. *Clin Exp Immunol*, 49: 631-638, 1982.

154. Sancho J, González E, Rivera F, Escanero JF and Egido J: Hepatic and kidney uptake of soluble monomeric and polymeric IgA aggregates. *Immunology*, 52: 161-167, 1984.

155. Sancho J, Rivera F, Sánchez-Crespo M and Egido J: The effect of the injection of a synthetic platelet-activating factor on the fate of IgG aggregates in mice. *Immunology*, 47: 643-650, 1982.

156. Scatchard G: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sci USA*, 51: 660-672, 1949.

157. Schmidt ME and Douglas SD: Disappearance and recovery of human monocyte IgG receptor activity after phagocytosis. *J Immunol*, 109: 914-917, 1972.

157a. Segal DM and Hurwitz E: Binding of affinity cross linked oligomers of IgG to cells bearing Fc receptors. *J Immunol*, 118: 1338-1341, 1977.

158. Segal DM and Tites JA: The subclass specificity for the binding of murine myeloma proteins to macrophage and lymphocyte cell lines and to normal spleen cells. *J Immunol*, 120: 1395-1403, 1978.

159. Seglen PO: Preparation of rat liver cells. Enzymatic requirements for tissue dispersion. *Exp Cell Res*, 82: 391-398, 1973.

160. Schned ES, Inman RD, Parris TM, Kimberly RP, Redecha PB and Christian CL: Serial circulating immune complexes and mononuclear phagocyte system function in infective endocarditis. *J Lab Clin Med*, 102: 947-959, 1983.



161. Schrieber L and Penny R: Factors influencing immune complex localisation. *Rheumatol Int*, 4: 95-109, 1984.
162. Shigenatsu H, Takizawa J, Akekusa B and Niwa Y: Arthus-type nephritis. II. Glomerular clearing system against poorly soluble and insoluble immune complexes. *Acta Pathol JPN*, 31: 379-389, 1981.
163. Shingu M, Todoroki T, Sakai K and Nobunaga M: Suppression of Fc receptor and C4-C3 receptors of the granulocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 8: 910-916, 1981.
164. Shiu RPC and Friesen HG: Properties of a prolactin receptor from the rabbit mammary gland. *Biochem J*, 140: 301-311, 1974.
165. Skogh T and Stendahl O: Complement-mediated delay in immune complex clearance from the blood owing to reduced deposition outside the reticuloendothelial system. *Immunology*, 49: 53-59, 1983.
166. Skogh T, Blomhoff R, Eskild W and Berg T: Hepatic uptake of circulating IgG immune complex. *Immunology*, 55: 585-594, 1985.
167. Sleyster E Ch and Knook DL: Relation between localization and function of rat liver Kupffer cells. *Lab Invest*, 47: 484-490, 1982.
- 167a. Svensson BO: Serum factors causing impaired macrophage function in SLE. *Scand J Immunol*, 4: 145-150, 1975.
168. Steward MW, Katz FE and West NJ: The role of low affinity antibody in immune complex disease. The quantity of anti-DNA antibodies in NZB/W F1 hybrid mice. *Clin Exp Immunol*, 21: 121-130, 1975.
169. Steward MW and Devey ME: Antigen-antibody complexes: Their nature and role in animal models of antigen-antibody complex disease. *En Immunological aspects of rheumatology*. Ed Dick WC. MTP Press Limited. Lancaster, England. 1981. Pag: 63.

170. Tabor DR and Saluk PH: The functional heterogeneity of murine-resident macrophages to a chemotactic signal and induction of C3b-receptor-mediated ingestion. *Immunol Lett*, 3: 371-376, 1981.
171. Territo MC and Cline MJ: Monocyte function in man. *J Immunol*, 118: 187-192, 1977.
172. Theofilopoulos AN and Dixon FJ: Immune complexes in human diseases. A review. *Am J Pathol*, 100: 529-594, 1980.
173. Theofilopoulos AN, Wilson CB and Dixon FJ: The Raji cell radioimmune assay for detecting immune complexes in human sera. *J Clin Invest*, 57:169-182, 1976.
174. Unkeless JC: The presence of two Fc receptors on mouse macrophages evidence from a variant cell line differential trypsin sensitivity. *J Exp Med*, 145: 931-947, 1977.
175. Unkeless JC: Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptor. *J Exp Med*, 150: 580-596, 1979.
176. Van Liew JB, Brentjens JR and Noble B: Relationship of kidney function to immunopathology in chronic serum sickness of rats. *Kidney Int*, 24: 160-169, 1983.
177. Van Snick JL and Masson PL: The effect of complement on the ingestion of soluble antigen-antibody complexes and IgM aggregates by mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med*, 148: 903-914, 1978.
178. William BD, Fussel BA, Lockwood CM and Cotton C: Defective reticuloendothelial function in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 112 (2): 1939-1948, 1979.

179. Wilson JG, Wong WW, Schur PH and Fearon DT. Mode of inheritance of decreased C3b receptors on erythrocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*, 307: 981-986, 1982.

180. Woude FJ, Giessen M, Kallenberg CG, Beekuis H, Beelen JM, Son WJ, Hoedemaker PJ, Hem GK and The TH: Reticuloendothelial Fc receptor function in SLE patients. I. Primary HLA linked defect or acquired dysfunction secondary to disease activity?. *Clin Exp Immunol*, 55: 473-480, 1984.

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la  
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral  
con la censura de Apto cum laude (per majoria)

Madrid, 18 Mayo 1987

Señor González

M. D. Kandel

M. U. S.

[Signature]

Fernando Gómez