

27/5/80

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS



**OBTENCION Y PURIFICACION PARCIAL DE UNA
PROTEINA DIFERENCIADORA DE CELULAS MIE-
LOIDES, PROVENIENTE DE LINEAS LEUCEMICAS
MIELOIDES.**

T B S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A

JUAN JOSE CONSEJO DUEÑAS

MEXICO, D. F.

JULIO DE 1980



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

C O N T E N I D O

UNO	RESUMEN
DOS	ANTECEDENTES
TRES	OBJETIVOS
CUATRO	MATERIALES Y METODOS
CINCO	RESULTADOS
SEIS	DISCUSION
SIETE	REFERENCIAS
OCHO	AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se propuso determinar las condiciones óptimas de producción de una proteína diferenciadora de células mieloides producida por líneas de células leucémicas mieloides de ratón mediante la incubación con endotoxinas, así como la parcial purificación de la misma.

La proteína mencionada forma parte de un grupo de sustancias conocidas como MCI (Macrophage and Granulocyte Inducers) ó CSF (Colony Stimulating Factors), las cuales promueven la formación de macrófagos y granulocitos in vitro, en cultivos de células de médula ósea y se cree que actúan como reguladores de la hematopoyesis in vivo en muchos animales, inclusive el hombre.

Para la obtención de la proteína se mantuvieron cultivos masivos de las líneas leucémicas mieloides de ratón J774 y -- WR19W.1, aplicandose en dosis variables de lipopolisacáridos de Salmonella typhosa (LPS) para provocar o aumentar la producción de MCI. La línea más efectiva fué la WR19W.1 y la concentración óptima de LPS de 10 mcg/ml.

Para la purificación de MCI se utilizó diálisis, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en DEAE-Celulosa, filtración en ultracel y ultracentrifugación en gradientes de sacarosa. Se determinó el peso molecular por los métodos independientes de filtración en ultracel y ultracentrifugación, obteniendo pesos moleculares de 36 000 y 74 000 daltones respectivamente.

Como se ve, las líneas leucémicas pueden ser utilizadas para una eficiente producción de MGI incubandolas con LPS. Esta producción puede ser realizada en forma masiva, tanto para profundizar en el estudio de la estructura y función de MGI como para su posible aplicación terapéutica en las neoplasias.

DOS. A N T E C E D E N T E S

INTRODUCCION. Uno de los mecanismos más importantes para el funcionamiento normal de los organismos multicelulares consiste en la regulación del crecimiento y la diferenciación de sus células, de modo que estas dejen de multiplicarse -- cuando su número es adecuado y se diferencien para realizar sus funciones específicas. Este mecanismo falla en la - carcinogénesis, con la consiguiente formación de un número desproporcionado de células innecesarias, llamadas malignas o neoplásicas.

El estudio de los fenómenos que ocurren durante la neoplasia ha sido estudiado durante largo tiempo, si embargo, la comprensión completa de esta disfunción requiere necesariamente del conocimiento detallado del mecanismo de crecimiento y diferenciación celular, tanto de células normales como neoplásicas. Uno de los procedimientos más útiles en este campo ha sido el cultivo de células normales y anormales *in vitro* (1,3). Con este fin se han desarrollado varias técnicas de cultivo en agar y cultivo masivo (3,4,5).

CULTIVO DE CÉLULAS. Al cultivo de células no organizadas -- en tejidos se le conoce como cultivo primario. Se denomina subcultivo o la obtención de células en suspensión y su colocación en medio fresco (en un proceso llamado transmisión ó *pasaje*). Así, se puede mantener un cultivo por un tiempo

que depende del tipo celular y de las condiciones de cultivo, conociéndose al cultivo en esta etapa como línea celular primaria. Si esta línea adquiere la capacidad de crecer indefinidamente, se le denomina línea celular establecida, usualmente después de un mínimo de 70 subcultivos, con intervalos de 3 días entre cada uno (1).

La transformación entre líneas celulares primarias y líneas celulares establecidas es usualmente paulatina. Otras veces es un fenómeno abrupto, conocido como alteración o transformación celular (12). Este cambio acarrea una variación del número cromosómico, una reducción en los tiempos de duplicación y un crecimiento a densidades mayores (1, 12, 20)

Las líneas celulares establecidas presentan un patrón de crecimiento parecido al de microorganismos. Cuando las células se toman de un cultivo estacionario se presenta primero una fase de retraso (lag phase). A esta le sigue una fase logarítmica, y si no se renueva el medio de cultivo, la población alcanza una fase estacionaria (1,23,34) Ver figura 1

La fórmula que describe la parte logarítmica de la curva de crecimiento es: $N_t = N_0(e)^{rt}$ donde;

N_t es el número de células al tiempo t

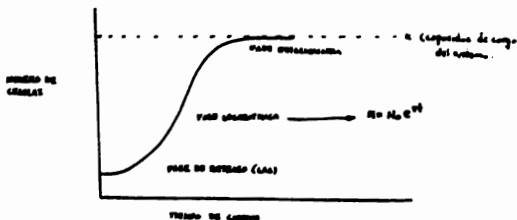
N_0 es el número inicial de células

e es la base de los logaritmos naturales

t es el tiempo de cultivo

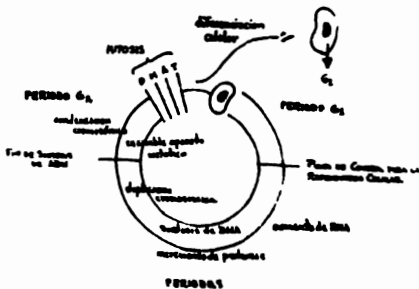
r es una constante que representa la tasa de crecimiento.

grafica 2-1



CINETICA DE CRECIMIENTO DE UNA LINEA CELULAR ESTABLECIDA EN CULTIVO MASIVO.

grafica 2-2



ESQUEMA DEL CICLO CELULAR DE CELULAS EUCARIOTAS

Abreviaturas: P= profase
M= metafase
A= anafase
T= telofase

período S
 G_1
 G_2 , ver texto

CICLO CELULAR EN CELULAS EN CULTIVO. En la gráfica 2.2 se describe el ciclo de la mayor parte de las células eucariontes - y es aplicable a las líneas celulares establecidas. Siguiendo a la mitosis (M), se presenta una etapa de crecimiento (G_1), después una fase de síntesis (S) y finalmente una segunda etapa de crecimiento (G_2). En el caso de la diferenciación normal, las células se detienen en la etapa G_1 (2,6).

INTERACCION, GENETICA Y METABOLISMO DE CELULAS EN CULTIVO.

Además de la inhibición por contacto en muchas células, por ejemplo fibroblastos, las células en cultivo presentan fenómenos de reconocimiento y adherencia. También se verifican - fenómenos inductivos, tanto homotípicos como heterotípicos. (1).

Aparentemente, el cariotipo se mantiene estable en líneas celulares primarias, pero se modifica en número y morfología cromosómica en las líneas establecidas (1,20,37). A veces se presentan mutantes en los cultivos (20,21).

El metabolismo de células en cultivo es en general similar al de las células in situ en animales (2,6). En éstas, los caminos enzimáticos más importantes en el metabolismo de carbohidratos son la glucólisis y el ciclo de Krebs, y son fundamentalmente iguales en células en cultivo. En ocasiones estas células presentan un aumento de ácido láctico y ácidos cetónicos en el medio (1). Se presenta también un marcado efecto Pasteur (37).

Dentro del metabolismo de proteínas, se conocen unos ———

12 aminoácidos esenciales(2). Los restantes se sintetizan por transaminación, desaminación hidrolítica o desaminación oxidativa. Algunas células no pueden usar proteínas en el medio, por falta de enzimas proteolíticas (4). La síntesis de lípidos la realizan las células a partir de precursores sencillos, como el acetato (2). Lo mismo sucede con los ácidos nucleicos, aunque si estos se proveen en el medio son usados preferencialmente (1,4).

AMBIENTE Y MEDIOS DE CULTIVO DE LAS CÉLULAS. A continuación se describen los principales factores ambientales que afectan a los cultivos celulares (1,4).

- 1- Temperatura. Se usa una temperatura de entre 37 y 38.° C. para células de mamíferos. Hay poca supervivencia por encima de este valor, pero por debajo de él las células resisten mejor. Si se les añade un agente protector pueden sobrevivir a temperaturas muy bajas por tiempo indefinido.
- 2- Presión Osmótica. A 30° C, entre 6 y 7 atm. Está determinada básicamente por sales y secundariamente por moléculas como la glucosa. Las células parecen resistir bien cambios del orden del 10%, sobre todo si son lentos.
- 3- pH. Se utiliza cerca de la neutralidad. El rango de supervivencia es entre 6.6 y 7.0. El óptimo se sitúa entre 7.2 y 7.4.
- 4- Iones inorgánicos. Además de los involucrados en la presión osmótica y el pH, destacan: Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, PO₄³⁻, SO₄²⁻.

5- Metabolitos. a) Esenciales; carbohidratos, gases disueltos, aminoácidos, vitaminas, proteínas, péptidos. b) Suplementarios; aminoácidos, vitaminas, coenzimas nucleótidos, - péptidos, metabolitos intermediarios.

6- Hormonas y otros factores específicos.

7- Matriz de crecimiento. Los sustratos son bidimensionales o bien hay crecimiento en suspensión, ya que en células in-vitro no hay fuerzas de orientación.

Los medios de cultivo proveen las condiciones físicas - para las células, como pH, presión osmótica, etc. Además proporcionan las sustancias químicas requeridas por las células y que éstas no pueden sintetizar. Existen medios naturales, como suero, plasma, colágeno y otros extractos de tejidos.- Existen además medios artificiales o definidos, que son más útiles en estudios analíticos y que se pueden clasificar, según su función:

- 1- Medios esenciales para supervivencia inmediata.
- 2- Medios apropiados para crecimiento indefinido.
- 3- Medios esenciales para supervivencia prolongada.
- 4- Medios esenciales para funciones especiales.

En el cultivo de líneas celulares es usual la combinación de medios sintéticos con medios naturales, por ejemplo medios esenciales adicionados con suero en proporciones variables. - En la literatura existen multitud de estudios relacionados - con medios de cultivo (1, 5, 34.).

CULTIVO DE LINEAS LEUCÉMICAS CON PROPIEDADES DE MACROFAGOS.

Recientemente se ha logrado el cultivo de líneas leucémicas in vitro, tanto en medio de cultivo marino como en medios - semisólidos(4,20). Muchas de éstas líneas se asemejan a macrofagos en su morfología y fisiología.

Los macrofagos se clasifican con base en sus actividades más que en relación a su origen celular. En condiciones normales se localizan en bazo, nódulos, exudados peritoneales, y médula ósea. Las características de éstas células son la adherencia y la fagocitosis, además de que actúan específicamente en la respuesta inmune (38). Desde este punto de vista su función es; a) actuar como intermediarios para el procesamiento inmunológico de antígenos particulares, b) actuar como células efectoras en procesos de inmunidad mediada por células, y c) actuar como blancos de productos originados - en células linfoides interactuantes. (20).

Las líneas celulares de tipo macrófago difieren en forma variada de los macrófagos normales. Como en el caso de otras líneas establecidas, tienen altos índices de duplicación y - un número cromosómico alterado (37). El grado de diferenciación que presentan es variable. A continuación se muestran - algunos de las características de líneas con propiedades macrofágicas. (Tabla 1) :

TABLA 1 : PROPIEDADES GENERALES DE LINEAS TIPO MACROFAGO (f)

Linea	procedencia	etiología	lysozima(a)	Fagocitosis (b)	NOI (c)
P388D1	DHA/2	Aceite	++	.	.
J774	C	Aceite	++	.	.
PU5-1.8	C	Exp (d)	++	.	.
RAW264	CXC.B	Viral	++	.	.
WR19M	C	Viral	++	.	N.P.(e)

a Síntesis de lysozima y secreción predominante (52)

b Fagocitosis de Zimosan y látex. (52)

c Constitutivo inducido con endotoxinas.

d Espontáneas.

e No probada anteriormente.

f Según referencia 23.

FUENTES INDUCTORAS DE LA DIFERENCIACION CELULAR. En el estudio de la hematopoyesis se ha investigado con amplitud la formación de colonias de granulocitos y/o macrófagos a partir de tejidos hematopoyéticos de mamíferos en agar - u medio semisólido (3,7,8,39). Estas células requieren la presencia de una sustancia inductora conocida en la literatura como Colony Stimulating Factor, (CSF) (9,10,11,24, 46), Colony Stimulating Activity, (CSA) (8,31,33), Macrophage and Granulocyte Inducer (MGI) (15,18,19) y que probablemente tiene relación estrecha con el llamado Macrophage Growth Factor, MGF (24). Esta sustancia inductora, que en adelante llamaremos MGI, es indispensable para la diferenciación in vitro, y se cree que juegan el papel de regulador fisiológico in vivo, tanto en animales como en el hombre (8).

PRODUCCION DE MGI. Las diferentes fuentes de MGIs se resumen en la tabla 2. Se ha utilizado frecuentemente medio condicionado de fibroblastos embrionales (42), explantes -- primarios de tejidos (4,21,39), o líneas celulares establecidas (13). En general los fibroblastos, como células primarias o como líneas celulares establecidas, proveen las mejores y mas convenientes fuentes de MGI en medios condicionados (24). Se han realizado "extracciones" directas en muchos tejidos de ratón para revelar actividad de MGI endógena, entre ellos: timo, médula ósea, bazo, hígado, pulmón, cerebro testículos.(42), encontrando actividad diferenciadora marginal o no encontrando ninguna en absoluto. En con---

TABLA 2. FUENTES DE OBTENCION DE MGI

MEDIO CONDICIONADO	EXTRACTOS TISUIARES	OTRAS FUENTES
Fibroblastos embrionales (41)	Glándula salival (42)	Suero normal (44)
Fibroblastos transformados por SV40 (33,41)	Riñón adulto (9,43)	Suero con endotoxinas (26, 46)
Fibroblastos transformados espontáneos	Bazo (42)	Suero leucémico (44)
Células de riñón (24)	Útero grávido (27)	Orina humana (25)
Pulmón de ratones (24)	Pulmón (42)	Orina murina (45)
Linfocitos mitógeno-estimulados (9)	Placenta (24)	
Leucocitos de sangre periférica (24)	Membrana fetal (24)	
Macrófagos peritoneales (8)	Fluido amniótico (24)	
Células 3T3 (24)	Exudado peritoneal (24)	
Células L (24)		
Placenta humana		
Células de bazo de ratón - mitógeno-estimuladas		
Células tumorales monocíticas humanas (27,33)		
Células tumorales monocíticas murinas (33)		
Células tumorales mielomonocíticas		

traste, Sheridan et al (9,11) encontraron cantidades extra-
 bles de MGI en glándula submaxilar de ratones machos, pul-
 món, timo, riñón, nódulos linfáticos, pancreas y médula --
 ósea; pero encontraron fuentes pobres de MGI en cerebro, -
 corazón, intestino delgado, testículos, músculo esquelético,
 co, sangre entera y suero normal. Bradley et al (42), mos-
 traron que el pulmón, útero, placenta, membranas fetales,
 musculo esquelético, corazón y vejiga, mostraban niveles -
 altos de MGI mientras que cerebro, glándula salival, higa-
 do, riñón adulto, testículos, piel, timo, bazo o glándulas
 adrenales casi no tenían actividad diferenciadora.

El suero de ratones ha mostrado actividad diferenciado-
 ra bajo ciertas condiciones (43). También se ha demostra-
 do la presencia de MGI en suero humano, tanto en individuos
 normales como leucémicos (44). Otra fuente potente de MGI
 es la orina de ratón (45) y la humana (23). Esta última -
 ha sido usada para la estimulación de cultivos de médula -
 ósea de ratón. También los leucocitos de sangre periféri-
 ca pueden producir MGI (30,31).

Otra fuente importante de MGI desarrollada últimamente
 es el medio condicionado proveniente de líneas celulares
 tumorales humanas (27) y murinas (33). La tabla 3 mues-
 tra la producción de MGI por varias de estas líneas.

Una de las fuentes más importantes de MGI resulta de-
 la activación con endotoxinas de tejidos o células (26,-
 46). Este es el caso de suero de ratón (26), pul-mones --
 (11), células veritonenales(8), linfoc iton (9). Entre --
 las endotoxinas se encuentran los lipopolisacáridos de -
 bacterias Gram-negativas. La inyección de este conocida

**TABLA 3 PRODUCCION ESPONTANEA E INDUCIDA DE MGI POR
LINEAS CELULARES TUMORALES (a)**

Linea Celular	Producción de MGI Espontánea (b)	Producción de MGI con LPS (c)
Mielomonocíticas		
WHEI-3	121 $\pm$ 8	1 0
Macrófagos		
PG5-1.8	0	95
P388D1	0	78
J774	0	36
RAW264	0	6
Macrocitos		
P815	0	0
Mesotelomas		
BALTR4a201	68 $\pm$ 4	-
Fibrosarcomas		
L929	96 $\pm$ 2	-
Fibroblastos medulares		
JLSV9	160 $\pm$ 11	-
JLSV9-RLV	170 $\pm$ 7	-
Linfomas-T		
RIA	0	0
S49	0	0
REL-5	0	0
P1798	0	0
P22.WO-2	0	0
RALEWTL5	0	0
EW5147	0	0

CONTINUA

TABLA 3 CONTINUACION

Línea Celular	Producción de NGY Espontánea (b)	Producción de NGY con LPS (c)
Mielomas		
P5	0	0
MoPC315	0	0
Linfomas		
WEH-3	140 $\pm$ 16	126
L1210	24 $\pm$ 2	92
B6	0	57
RAW309.1	0	0
C1498	0	0
AEPL1	0	0
AEPL2	0	0

a Según Ralph, Brommeyer, Malcolm, Moore, Waksins (33)

b Colonias por 7.5×10^4 células de médula ósea de ratón estimuladas por .1 ml de sobrenadante de las líneas celulares en 1 ml de cultivos en agar. Los cultivos de líneas celulares fueron iniciados con 2×10^5 células/ml, colectando los sobrenadantes cuando los cultivos alcanzaban 10^6 células/ml. El número de colonias es la media más/menos el error standard.

c 1 mcg/ml de LPS, incubado con las líneas celulares por 3 días. La solución control con endotoxina no tuvo efecto sobre las células de médula ósea.

como LPS produce una amplia variedad de efectos farmacológicos y tóxicos en muchos tejidos y son de interés ya que -
semejantismos ocurridos durante ciertas infecciones bacterianas (17), además de evocar la producción de anticuerpos específicos (37).

Los estudios químicos de LPS derivados de Salmonella, -
Escherichia y Shigella entre otros, han proporcionado la -
estructura detallada de estos compuestos, revelando la pose-
sión de una región polisacárida formada con los antígenos -
O-específicos y el "núcleo" y una región lipídica llamada -
lipido A. (53).

Los granulocitos neutrófilos y monocitos están involucra-
dos en la resistencia contra infecciones, y en consecuencia
se han hecho estudios sobre el efecto de la endotoxina en -
el nivel y actividad proliferativa de las poblaciones precur-
soras de granulocitos y macrófagos, y se ha visto que produ-
cen una elevación en los niveles de MFI (10,17).

Además de la elevación de los niveles de MFI por inyec-
ción de LPS, se ha encontrado una elevación similar en los
cultivos in vitro (8,9,10). En líneas leucémicas -leucoides,
la incubación con LPS induce la diferenciación de estas cé-
lulas hacia granulocitos, diferenciación que va acompañada
de una secreción elevada de MFI (22,33). En la tabla 3 se -
muestra el efecto de la incubación de líneas tumorales con
LPS sobre su producción de MFI.

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE MFI. Este factor ha sido
parcialmente purificado y caracterizado para muchas de las -
fuentes antes descritas. Sin embargo el proceso de purifica-

ción de la molécula ha presentado dificultades debido a su aparente heterogeneidad en peso molecular y propiedades químicas (2,27,28,29). Se ha señalado que es posible que se requieran diferentes MGI's para la formación de varias subpoblaciones de células hematopoyéticas, existiendo por una parte aquellas que tienen una respuesta aritmética con respecto a la dosis y que promueven la formación de colonias de macrófagos y otras con una respuesta logarítmica, estimulando el crecimiento de granulocitos neutrófilos y macrófagos (30). Sin embargo, se ha sugerido recientemente (44) que en realidad el estimulador es único y que la diferente respuesta está en función de la dosis.

MÉTODOS DE PURIFICACION. Se han utilizado procedimientos de diálisis, liofilización y evaporación en vacío sin pérdida aparente de actividad del MGI (23,31). Se ha encontrado incluso (29) que la respuesta del medio condicionado aumenta después de la diálisis debido a la eliminación de sustancias inhibitorias.

La filtración con geles ha sido usada tanto para caracterizar como para purificar medios condicionados conteniendo MGI (21,23,27,28,29,31,43). La cromatografía de intercambio iónico ha demostrado también su utilidad para la purificación de MGI (23,29,31,47) aunque el pico de actividad biológica tiende a ser amplio y la presencia de actividad baja (29).

Casi todos los estudios, con diversas técnicas, revelan la presencia de varias proteínas diferenciadoras, con pesos

moleculares muy distintos, variando desde los muy bajos, de 1300 Daltons (49) y 6000 (23) hasta pesos mayores de 100 000 Daltons (21,51).

Moteyoshi et al (23), purificaron MGI de orina humana con un peso molecular aparente de 60 000 a 45 000 Daltons. Landau y Sachs (41) han purificado MGI de una línea clonada de fibroblastos de ratón, siendo el peso molecular de su material de 70 000 Daltons. Un peso de 75 000 Daltons fue obtenido por Watson y Richard (50) a partir de la línea tumoral JLS-V5. Por su parte, Burgess (47) ha purificado medio de pulmón de ratón con un peso resultante de 30 000 Daltons. Fojo (51), utilizando medio condicionado de pulmón humano reporta después de la filtración con Sephadex dos pesos distintos, de 200 000 Daltons y de 40 000 Daltons.

Hay que aclarar que los altos pesos moleculares que algunos autores reportan pueden deberse a que dichos valores se han obtenido a partir de la filtración con geles, dando como resultado preparaciones impuras que parecen estar unidas no covalentemente a proteínas contaminantes (29) lo que conduce a una elevación aparente de su peso molecular.

Las propiedades químicas de los purificados parciales también parecen ser diferentes (23,28,29,31). Estas diferencias pueden deberse tanto a diferencias funcionales como a condiciones inadecuadas de cultivo (29).

PREPARATIVOS. En el momento de la publicación de este trabajo, el tipo de MGI que se obtiene en la preparación varía en su peso molecular, en su actividad biológica, y en su

la más general para la comprensión de los procesos de la regulación de la diferenciación celular.

Uno de los aspectos más importantes en estos estudios es la posibilidad de comprender y controlar las alteraciones que sufren las células en la carcinógenesis. En experimentos realizados con leucemia de ratón, en una línea de células mieloblásticas mantenida en cultivo, se encontraron dos tipos de clones (18). Uno de ellos pudo ser inducido a la diferenciación normal con MGI, mientras que el otro no pudo ser inducido a diferenciarse. Ambos clones eran leucémicos en ratón. El clon que sí podía ser inducido a diferenciarse daba colonias de macrófagos y granulocitos, tanto en cultivos semisólidos como en cultivos masivos (7). Los granulocitos consistían en células en todas las etapas de diferenciación hacia granulocitos neutrófilos. Como en el caso de la diferenciación de células normales, los macrófagos y granulocitos dejaban de reproducirse. Se aprecia que el MGI puede ser utilizado en el tratamiento de ciertas leucemias, ya sea por inyección del mismo o incrementando su fuente en séera con endotoxinas. (46).

Se ha demostrado también que las líneas leucémicas in vitro producen en ciertas condiciones cantidades apreciables de MGI (33). Es de desearse que esta producción se amplie tanto para el estudio de la molécula como para su posible aplicación terapéutica.

TRES .

OBJETIVOS

Segun se ha descrito en los antecedentes, las líneas -- leucémicas pueden producir MGI bajo ciertas condiciones, - entre las que destacan la estimulación con lipopolisacáridos. Sobre estas bases se plantean para este trabajo los - siguientes objetivos:

- A) Determinar las condiciones óptimas de producción de -- MGI por líneas leucémicas mieloides de ratón incubándolas con lipopolisacáridos de Salmonella typhosa.
- B) Purificación y caracterización del MGI producido según las condiciones óptimas.

CUATRO . MATERIALES Y METODOS

Para el cumplimiento de los objetivos planteados en este trabajo, se elaboraron los siguientes pasos metodológicos (ver también tabla p24):

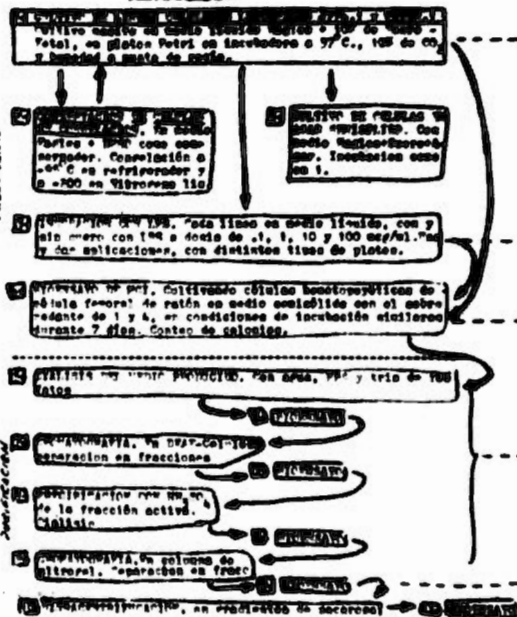
- 1- Mantenimiento de las líneas J774 y WR199.1 en cultivo masivo y en agar semisólido en condiciones asepticas y almacenamiento de las células en congelación.
- 2- Determinación de condiciones óptimas de producción de MCI incluyendo líneas más eficiente, dosis óptima de LPS, condiciones y recipientes de incubación, concentración celular. Cuantificación de MCI por bioensayos en células de médula ósea de ratón.
- 3- Aislamiento y purificación del material producido en condiciones óptimas por medio de diálisis, concentración con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, ultrafiltración y ultracentrifugación en gradientes de sacarosa. Determinación del peso molecular de la proteína inductora.

DIAGRAMA DE PROCESOS Y PRODUCTOS
ACTIVIDADES

OBJETIVOS

1. *Identificar y describir de forma clara y precisa*
2. *Determinar el efecto de los factores de crecimiento*

2000-CC-0000



3. *Determinar el efecto de los factores de crecimiento*

4. *Determinar el efecto de los factores de crecimiento*

5. *Determinar y describir de forma clara y precisa*

6. *Determinar el efecto de los factores de crecimiento*

2000-CC-0000

CELULAS. Se utilizaron 2 líneas de células leucémicas; la línea W719W.1 mielóide, de etiología viral, fagocítica y -secretora de lisozima (33,52), proporcionada por el Dr. -- Jay Unkeless, de Rockefeller Univ. N.Y. Y la línea J774 , -mielóide, transformada por aceite, fagocítica, secretora -de lisozima, sin actividad espontánea de MGT pero con acti-vidad inducida por LPS (33,52), proporcionada por la Dra.- Ora Rosen, del Albert Einstein College of Medicine, N.Y. -Ambas líneas se encuentran en el catálogo del Cell Distri-bution Center, Salk Institute, P.O.Box 1800, San Diego 921-12, Cal.

CULTIVO DE CELULAS. Las células se mantuvieron en incuba-dora a temperatura de 37°C, con humedad constante a punto de rocío y una atmósfera de 10% de CO₂. Se utilizó medio -de cultivo Earle's (Cat. GIBCO 470-2100) con 3aCC₃, antibió-ticos (penicilina 100 UI/l, estreptomycin 100 mcg/ml). El medio preparado se ajustaba a un pH de 7.2 y se filtraba -estérilmente con filtros Millipore (0.45 micras de diámetro de poro) y no se hacían pruebas de esterilidad. El medio -estéril se guardaba en recipientes de vidrio a 2°C. Antes de usarse se calentaba a 37°C. Para cultivo se añadía suero fetal 10% (Fetal Calf Serum, GIBCO) previamente desacti-vado (30 minutos a 56°C), almacenado a -20°C y calentado a 37°C antes de mezclarlo.

El trabajo de sembrado se efectuaba en campana estéril de flujo laminar. Los recipientes utilizados eran platos-

petri desechables de 60 X 15 mm. El sembrado se realizaba mediante pipetas, bombillas y cristalería previamente esterilizadas en autoclave. Se utilizaba un microscopio invertido para observación y determinación del estado de los cultivos.

CULTIVO EN AGAR. Para sembrar en agar se utilizaban cajas petri de vidrio (pyrex 60 X15 mm). Se sembraban 5 ml de medio en las siguientes proporciones;

sueros fetal.....1 ml
medio eagles + células..2
agar al 2.5%.....1
medio eagles doble.....1

El agar se solubilizaba y esterilizaba en autoclave, manteniéndose a 50°C. hasta usarse. Se mezclaba el medio doble con el suero, se añadía agar y finalmente el medio con células a una concentración de plato de 10^5 células. Se sembraba dejando gelificar 20 minutos y se guardaba en incubadora en las mismas condiciones del cultivo masivo.

DETERMINACION DE CURVAS DE CRECIMIENTO DE LAS LINEAS LEUCEMICAS. Se sembraron diez cajas petri desechables de 60 X15 mm a una concentración de 5×10^4 células leucémicas/ml. Se tomaron dos cajas cada 24 hs, separando las células de la superficie del plato con ayuda de un sonda, pipeteando varias veces para homogeneizar y contando en hemocitómetro. Este experimento se realizó por lo menos dos veces para cada línea, en platos por duplicado.

CONGULACION. Las células leucémicas se mantenían en congelación dentro de tubos plásticos de 2 ml con 1 ml de medio

Eagles + 10 % de Dimetilsulfóxido (DMSO). En cada tubo se colocaban 10^6 células previamente concentradas por centrifugación. Los tubos se conservaban en refrigerador de ultrabajas temperaturas a -90°C . Para comprobar el estado de las células se descongelaban dos de los tubos a las 24 hs, resuspendiéndose en medio Eagles fresco e incubándolas. Si las células presentaban aspecto y crecimiento normales, el resto de los tubos se pasaba a recipientes de nitrógeno líquido, volviéndose a comprobar su estado a las 24 hs.

DETERMINACION DE CONDICIONES OPTIMAS DE PRODUCCION DE MGI.

Se utilizaron concentraciones de .1, 1, 10 y 100 mcg/ml de Lipopolisacáridos de Salmonella Typhosa (DIFCO) en solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

ENSAYO DE MGI. La presencia de MGI se determinó por la producción de colonias de granulocitos y macrófagos a partir de precursores de médula ósea femoral de ratón sembrados en agar, siguiendo este procedimiento:

- 1- Colectar y centrifugar el medio condicionado. Guardar el sobrenadante a -20°C . hasta el momento de probarse.
- 2- Sacrificar ratones Pinstard de 4 a 6 semanas de edad por dislocación cefalo-medular. Diseccionar y extraer los fémures en forma estéril, colocándolos en PBS
- 3- En la campana estéril limpiar los fémures de tejido circundante, perforarlos en los extremos con jeringa de 1 ml.
- 3- Lavar las células de la médula aplicando PBS por uno de los extremos con la jeringa. Repetir la operación varias veces.

5- Centrifugar las células colectadas, resuspender en medio Eagles fresco. Contar las células en hemocitómetro.

6- Diluir o concentrar, según sea necesario, hasta obtener una cantidad de células tal que den 10^5 células en la bicapa.

7- Sembrar en bicapa; colocar 3 ml por plato en las proporciones detalladas en la parte de cultivo en agar, poniendo la muestra a probar en lugar de medio Eagles con células.

Se deja gelificar y se colocan 2 ml de la segunda capa - (suero .2 ml, medio eagles doble .4 ml, agar .4 ml, medio sencillo con células 1 ml.)

CONTROL POSITIVO DE PRUEBAS DE MGI. El control positivo de la sustancia diferenciadora se obtuvo de ratones jóvenes a los que se les aplicó 20 mcg de LPS en .2 ml de PBS por vía intravenosa. Los animales fueron sacrificados cinco horas después, extrayendoseles los pulmones para colocarlos en incubación con 6 ml de medio Eagles. A las 48 hs se centrifugaba cada muestra probándose la esterilidad del sobrenadante y guardándose a -20°C . hasta el momento de uso

CONTROL NEGATIVO DE PRUEBAS DE MGI. Como blanco de los bioensayos se utilizó medio Eagles con LPS .

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE MGI.

DIALISIS. Los medios condicionados fueron dializados en bolsas de diálisis (250-90 Sigma). La diálisis se realizó contra agua, PBS y NaCl (Merck) $\text{pH } 7.3$ 2° molar. El periodo de diálisis fué de 96 hs a temperatura de 4°C .

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO. Se utilizó una columna K9/30 de 19 ml empacada con DEAE-Celulosa (Diethyl aminoetil celulosa WD-8547 Sigma). La muestra dializada se eluyó con - tris 25 mmolar a pH de 8.5. Se utilizó un gradiente de elucion de NaCl de cero a .3 molar. Las fracciones de elución fueron leídas en espectrofotometro a una absorbancia a 215 y 280 nm. Posteriormente se probaron para actividad de MCI.

CONCENTRACIÓN POR PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO. Después de la primera cromatografia, la porción con actividad de MCI se concentró mediante precipitación con sulfato de amonio (10 gr/20 ml). Para eliminar el sulfato de amonio, - la muestra concentrada se dializó contra agua durante 48 -- hs. en bolsas de diálisis (250-9" Sigma). Posteriormente -- se probó actividad de MCI.

CROMATOGRAFIA EN "UTROGEL. La muestra concentrada y diali- zada fué pasada por una columna K9/30 de 19 ml empacada --- con utrogel ACA 54 (para pesos moleculares 50 000 - 70 --- 000, LXR). La elución se realizó en tris 75 mmolar a un --- pH de 7.7. Las porciones recogidas fueron leídas en absorban- cis a 215 y 280 nm.

"ULTRACENTRIFUGACION. El MCI de la columna de utrogel fué - sometido a ultracentrifugacion utilizando gradientes de den- sidad de sacarosa de 5 a 20 % utilizando un formador de gra- dientes de 18 a 98%. Se obtubieron soluciones limite de saca- rosa en tris 37.5 mmolar de 28% y 9%. El pH fué de 7.7 y la- temperatura de 4°C. La centrifugación se realizó en una cen- trifuga con rotor S" 501 durante 11 horas a 100 000 g.

CINCO. RESULTADOS

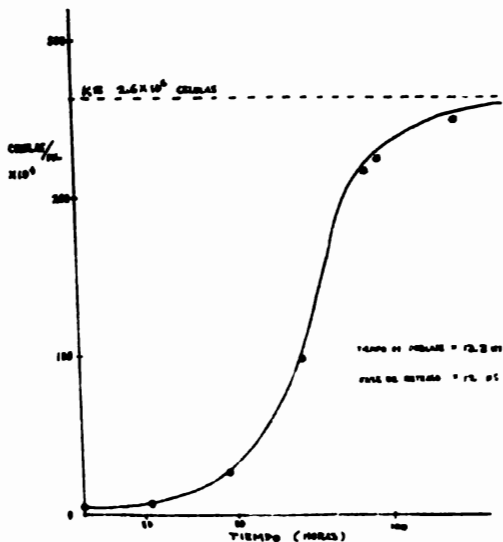
CINETICA DE CRECIMIENTO DE LAS LINEAS LEUCEMICAS. Las gráficas 1 y 2 representan las curvas de crecimiento de las líneas J774 y WR19W.1. Se puede apreciar que la velocidad de crecimiento es similar (compárese los tiempos de doblaje respectivos). Existe, sin embargo, una diferencia notable en las fases de retraso, y como resultado la línea WR19W.1 presenta un crecimiento aparente mayor. También se puede apreciar un valor de K algo mayor.

EFFECTO DEL LPS SOBRE LAS LINEAS LEUCEMICAS. Los criterios tomados para la elaboración de las tablas 4 se basan en el hecho de que las endotoxinas provocan mayor adherencia de muchas líneas celulares y que estas adoptan formas alargadas. El LPS se añadió en fase de retraso y en la parte de crecimiento logarítmico, con resultados similares. Se puede apreciar en las tablas la adherencia progresiva de las células al aumentar la dosis de LPS, sobre todo en la línea WR19W.1. En las dos líneas la dosis de 100 mcg/ml resultó ligeramente tóxica para las células.

Se apreció también una progresiva acidificación del medio (amarilleamiento del indicador rojo fenol) con respecto al aumento de dosis de LPS. Esta acidificación se retrasa al proveer medio sin suero, probablemente porque así detenemos el crecimiento celular.

La cuantificación del crecimiento celular en relación con la dosis de LPS se representa en las gráficas 3 y 4.

grafica 1



CURVA DE CRECIMIENTO DE LA LINEA J774

Datos obtenidos de promedios de experimentos similares, con una concentración inicial de células de 4×10^4 células por mililitro en las condiciones descritas en el método. La curva en su parte exponencial es descrita por la ecuación:

$$N = N_0 e^{rt}, \text{ donde}$$

N_0 = número de células

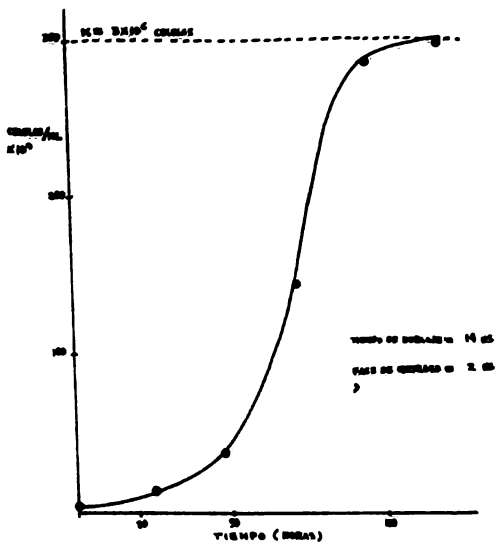
N_0 = número inicial = 4×10^4 cel/ml

r = tasa de crecimiento = 0.52

t = tiempo

K = capacidad de carga de sistema

gráfica 2



CURVA DE CRECIMIENTO DE LA LÍNEA URSI.1

Datos obtenidos de promedios de 3 experimentos similares, en platos por duplicado, con una concentración de células de 4×10^4 células/ml en las condiciones de cultivo descritas en el método.

$$r = .048$$

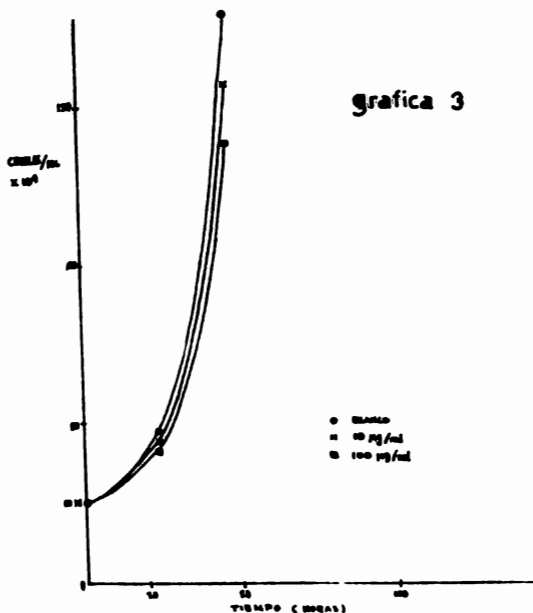
para abreviaciones ver la gráfica 1

TABLA 4 EFECTO DEL LPS SOBRE LAS LÍNEAS LINFOCÍTICAS (a)

LÍNEA	CONCENTRACION DE LPS (ucr/ml)	ADHESIVIDAD (% de cél. adheridas)	FORMA (% de cél. redondas)	TOXICIDAD (% de cél. muertas)
J774	.1	50	90	< 1
	1.0	60	90	< 1
	10.0	80	90	< 1
	100.0	80	80	5
	Blanco	10	95	< 1
WR19N.1	.1	80	90	< 1
	1.0	90	90	< 1
	10.0	90	90	"
	100.0	90	80	10
	Blanco	20	95	< 1

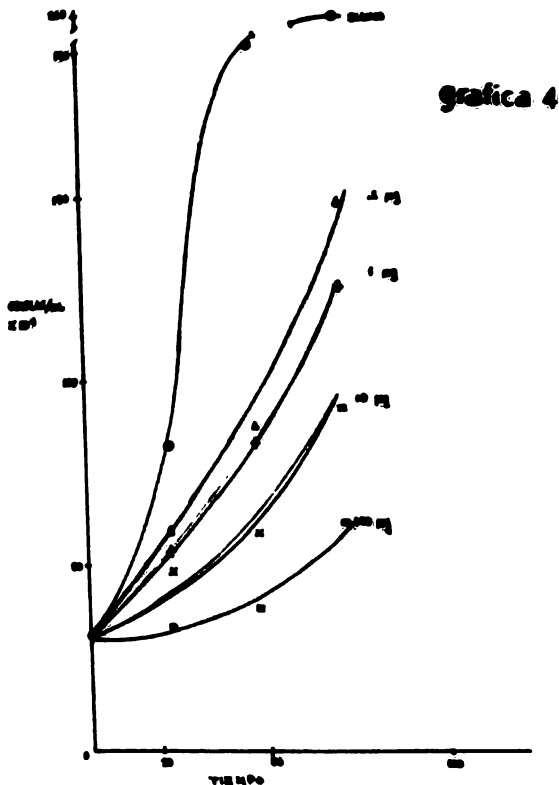
a Según resultados a las 48 hs de aplicación de cada dosis de LPS, con una concentración de células inicial de 5×10^4 células/ml, a partir de promedios de dos experimentos en platos por duplicado para cada caso.

b Se tomaron como células muertas todas aquellas no adheridas y que no tenían forma redondeada.



EFFECTO DE DISTINTAS DOSIS DE LPS SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA LINEA J774.

Grafica según datos tomados del promedio de dos experimentos similares en platos por duplicado. La concentración inicial de células fué de 2.6×10^4 células/ml. Por claridad no se grafican los valores correspondientes a .1 y 1 µg/ml: 2.6×10^5 , 4.9, 12.0 y 2.4, 4.9, 13.9 células por ml respectivamente, -- ra 0, 24 y 48 horas.



EFFECTO DE DISTINTAS DOSIS DE LPS SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA LINEA WR19M1

Grafica según datos obtenidos del promedio de dos experimentos similares en platos por duplicado. La concentración inicial de células fue de 3×10^4 cel./ml.

Como se aprecia en las gráficas 3 y 4, el efecto del LPS - es notablemente distinto en las dos líneas. En la línea - J774 el crecimiento es afectado mínimamente. En cambio en la línea WR19M.1 la tasa de crecimiento es notablemente menor, y proporcional a la dosis. Esto puede ser interesante desde el punto de vista de nuestros objetivos, ya que si - las células detienen su crecimiento, la energía metabólica podría ser dirigida a la producción y excreción de sustancias, entre ellas el MGI.

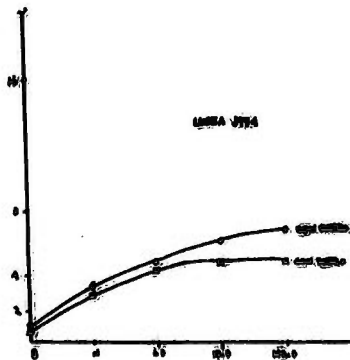
RELACION ENTRE PRODUCCION DE MGI Y DOSIS DE LPS. Se determinó la cantidad de MGI producida por las líneas J774 y WR 19M.1 con base en la producción de colonias en agar al incubarse los medios condicionados con precursores de médula - ósea. La gráfica muestra esta producción en relación con la dosis de LPS y la incubación con y sin suero. Se puede apreciar lo siguiente:

- 1- La dosis más efectiva es de 10 mcg/ml de LPS en las dos líneas.
- 2- En ambos casos la producción de MGI con suero es mayor. Esto es lógico si se piensa que con suero las células siguen creciendo.
- 3- La línea WR19M.1 es productora espontánea de una cantidad pequeña de MGI. También resulta la más impulsada con la adición de LPS. La línea J774 no produce espontáneamente MGI y, si lo produce con LPS (tal y como se reporta en la referencia 33) aunque en menor cantidad que la otra línea.

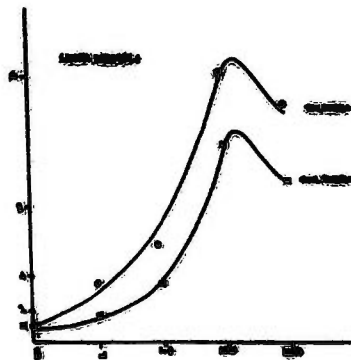
Debido a que el número de células varía según la dosis de LPS y a la presencia o ausencia de suero (como se señala en -

grafica 6

Concentración de los iones de hidrógeno en las células
de las plantas de la especie *Phaseolus mungo*



DE LOS



DE LOS

DE LOS

el punto 2), la gráfica anterior no nos evidencia la producción de MOI por célula leucémica. Este problema se subsana en la gráfica de producción de MOI contra número de células leucémicas, (gráfica 6). De esta se observa:

1- La producción de MOI por ambas líneas es mayor en medio sin suero.

2- La línea WR19M.1 es aún más efectiva considerando producción de MOI por célula.

3- En la línea J774 la mejor producción por célula es con dosis de 100 mcg/ml de LPS, aunque es siempre inferior a la línea WR19M.1.

Con base en los resultados se escogió la línea WR19M.1 en incubación sin suero con 10 mcg/ml de LPS.

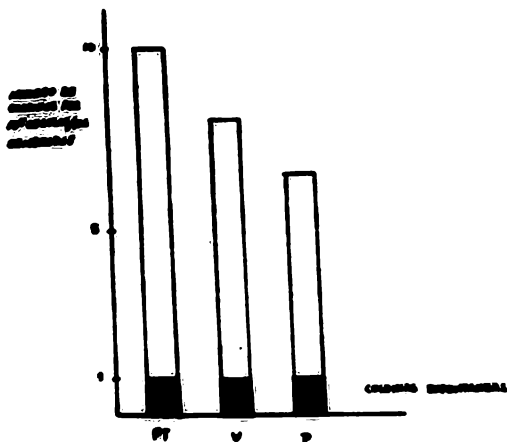
ELECCION DE RECIPIENTE DE CULTIVO. Se compararon tres tipos de platos de cultivo, midiendo producción de MOI en las condiciones ya seleccionadas. Los resultados se presentan en la gráfica 7.

La mayor producción de MOI correspondió al medio condicionado de las cajas Falcon. Estas cajas poseen una superficie tratada que aumenta la adherencia celular, lo que sugiere una relación entre adherencia y producción de MOI.

RELACION EFECTO-DOSES. La gráfica 8 relaciona la producción de MOI con la cantidad de muestra aplicada por caja.

Se utilizó una cantidad de muestra subóptima, de 10^4 , para evitar problemas de inhibición de crecimiento de colonias.

grafica 7



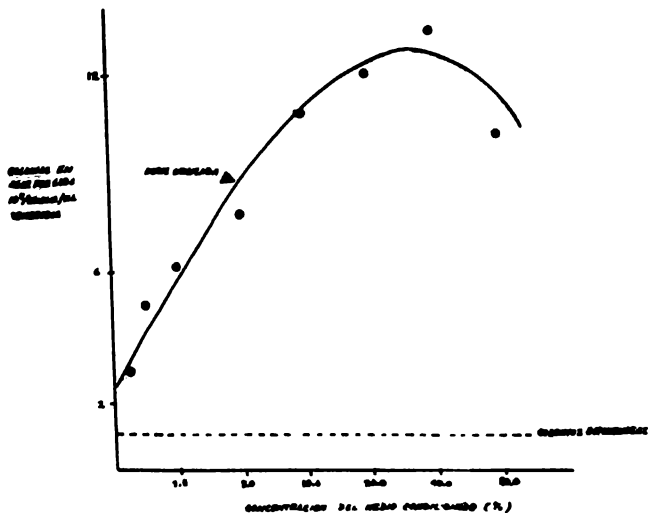
Tipo de recipiente

PRODUCCION DE H₂I POR LA LINEA WH19W.1 EN DISTINTOS RECIPIENTES

Los resultados son el promedio de dos experimentos similares en platos por duplicado, con una concentración inicial de células de 3×10^5 cel/ml, una dosis de EPS de 10 μ g/ml. Las demás condiciones como en la gráfica 5.

Abreviaciones: PT = platos petri con superficie tratada (Falcon 3602, 60x15 mm)
 V = platos petri de vidrio (Pyrex 60x15 mm)
 P = platos petri plásticos (Lys 60x15 mm, Becton)

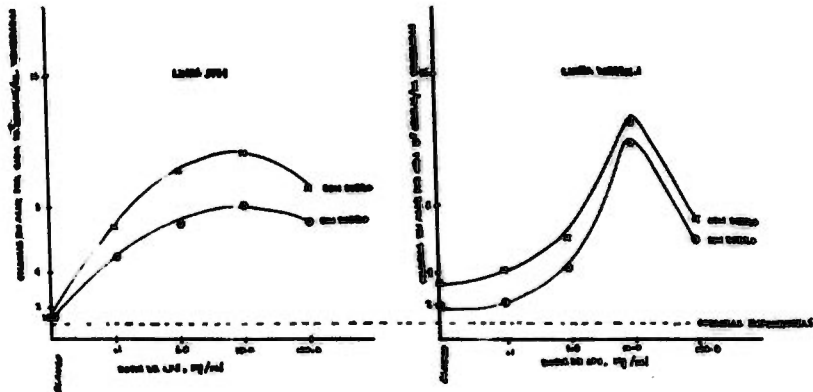
grafica 8



RELACION ENTRE LA CONCENTRACION DE MEDIO CONDICIONADO APLICADO Y LA PRODUCCION DE MPT

Datos correspondientes al medio condicionado de la línea "A" con una concentración de 10^{-6} mg/ml de LPS, sin suero, con una concentración inicial de 3×10^6 células/ml en incubación por 48 hs. El porcentaje representa la proporción de medio condicionado en cada plato de células (tres en cada una de las placas). Los datos corresponden a los experimentos similares en platos no multiplicados.

grafica 5



PRODUCCIÓN DE PDI POR LAS LÍNEAS *L. monocytogenes* Y DISTINTAS DOSES DE LPS.

Resultados basados en promedios de dos experimentos similares, en platos por duplicado bajo las siguientes condiciones: Concentración inicial de 3×10^8 células por ml. con y sin la dosis de LPS respectiva, incubando 48 hs. Transferencia a la placa al medio y re-aplicación a las células adheridas a los platos radio-frecuencia y sin y sin (con y sin) dosis de LPS. El ensayo de PDI se hizo al mismo tiempo. Los resultados se expresan en $\mu\text{g/ml}$ de PDI. Los resultados en cultivos de placas de agar y agar, se expresan en $\mu\text{g/ml}$ de PDI.

**TABLA 5 RESUMEN DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE PROTECCION DE
MOI Y CONCENTRACION USADA PARA BIENSAYOS**

Línea de mayor producción (a)	WR19W.1
Dosis de LPS	10 mcg/ml (b)
Número inicial de células	3×10^5 células/ml
Procedimiento de incubación	48 hs. con suero, lavado, 48 hs. sin suero (c)
Tipo de recipientes para incubación	Platos Petri desechables Falcon
Concentración usada para bioensayos	Subóptima 9% de muestra (d)

a Medida por el sobrenadante que produjo más colonias en agar. Incluye con y sin LPS.

b Se refiere a la línea WR19W.1, que fué la seleccionada.

c Ver la sección de material y método.

d Pasada en la curva efecto- dosis. La óptima fué de 40 %.

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE VGI

DIALISIS. El medio condicionado fué dializado contra agua destilada a pH 7.0, contra solución buffer de fosfatos (PPS) a pH 7.2 y contra tris a pH 8.5. Ninguno de estos líquidos produjo un precipitado importante, ni aumentó la eficiencia de producción de VGI por el dializado significativamente. Se eligió tris por ser el eluyente en los pasos siguientes de cromatografía.

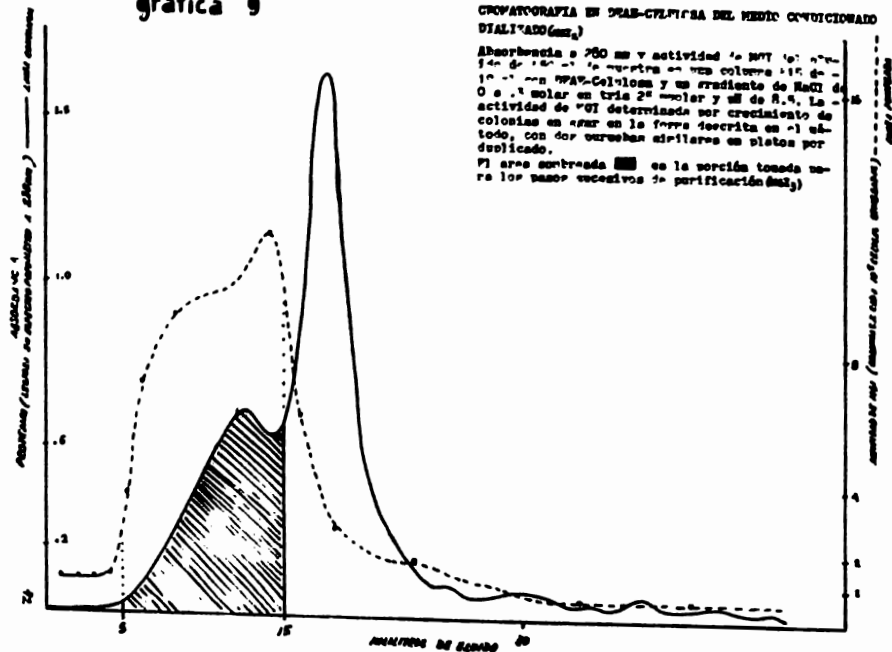
CHROMATOGRAPHIA DE INTERCAMBIO IONICO CON DEAE-CELULOSA. La cantidad de proteína y la actividad de VGI de las fracciones de esta cromatografía se representan en la gráfica 9.

El pico mayor de proteína corresponde a la albúmina del suero fetal, lo que muestra que el método de lavado no remueve todo el suero y que el "medic sin suero" no lo es tanto. Se obtuvo un solo pico de actividad de VGI, correspondiente a 20 ml, mismo que se tomaron para continuar la purificación.

CONCENTRACION CON SULFATO DE AMONIO. La fracción de la cromatografía en DEAE- Celulosa (VGI₄) fué concentrada 12.5 veces por precipitación con sulfato de amonio y dializada para eliminarlo. Una vez concentrado y dializado se midió actividad de VGI, comprobándose que esta no se alteró con el procedimiento.

FILTRACION CON ULTROCEL. La muestra concentrada y dializada (VGI₄) fué pasada por la columna de ultracel ACA 54. La elución de la columna se representa en la gráfica 10, tanto en cantidad de proteína como en actividad de VGI.

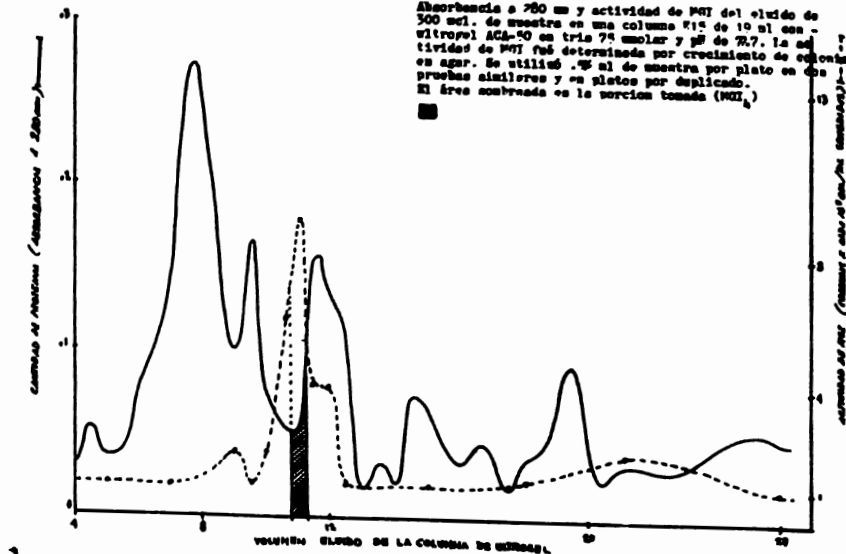
grafica 9



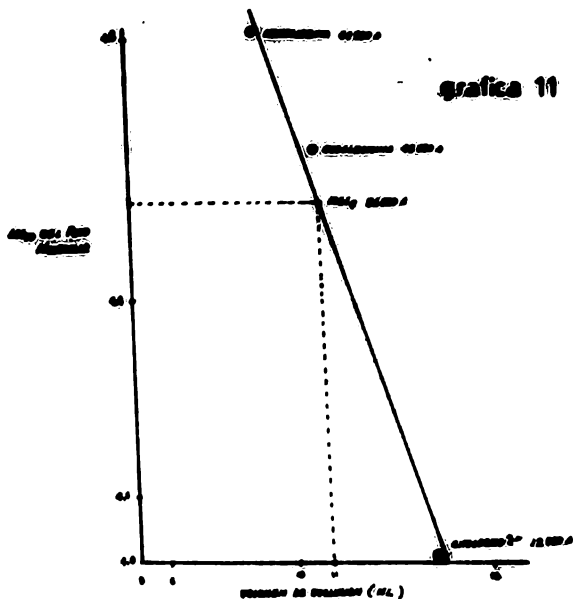
grafica 10

CRONOTOGRAFIA EN ULTROSEL ACA-50 del MgCl_2

Absorbancia a 780 nm y actividad de Mg^{2+} del eluido de 300 ml. de muestra en una columna K^{15} de 10 ml con ultrapel ACA-50 en tris 7% amolar y pH de 7.7. La actividad de Mg^{2+} fue determinada por crecimiento de *Salmonella* en agar. Se utilizó .5 ml de muestra por plato en dos pruebas similares y en platos por duplicado. El área sombreada es la porción tomada (MgCl_2)



gráfica 11



CALIBRACIÓN PARA DETERMINACIÓN DEL PPM MOLECULAR DEL PDI

Esta calibración fue realizada en condiciones iguales a las descritas en la gráfica 10, utilizando hemoglobina, ovalbúmina y citosromo C como proteínas de referencia de peso molecular conocido. El peso molecular del PDI se determinó comparando la fracción de mayor actividad de la elución de ultrasel con la columna de calibración.

En esta grafica se aprecia de nuevo un solo pico de actividad de MGI. Esta porción de .5 ml fué comparada con una calibración previa de la columna de ultragel, bajo idénticas condiciones, con proteínas de peso molecular conocido; Hemoglobina, Ovalbúmina y Citocromo C. La comparación de MGI, con la calibración se muestra en la gráfica 10. El peso molecular así determinado corresponde a -- 36 000 Dalton'

ULTRACENTRIFUGACION. Se tomó una porción de ml de las fracciones eluidas en ultragel y se sometió a ultracentrifugación en gradientes de sacarosa en tris con soluciones límite de 28 y 2%. Se centrifugó 11 hs a 295 000 g con un standard interno de hemoglobina. Las fracciones obtenidas fueron leídas en cuanto a absorbancia a 430 nm y a actividad de MGI. Grafica 12.

Conociéndose el coeficiente de sedimentación (4.4) de la Hemoglobina, la fracción en que se obtuvo (14) y la fracción correspondiente al MGI, (9) se calculó un coeficiente de sedimentación para este último de 2.9. Si asumimos que se trata de moléculas esféricas podemos calcular el peso molecular según la relación

$$\frac{CD_{Hb}}{CD_{MGI}} = \frac{PM_{Hb}}{PM_{MGI}}$$

donde CD_{Hb} = coeficiente de sedimentación de la Hb, 4.4

CD_{MGI} = coeficiente de sedimentación del MGI, 2.9

PM_{Hb} = 64 000 Daltons

PM_{MGI} es 34 000 Daltons al despejar la fórmula.

grafica 12

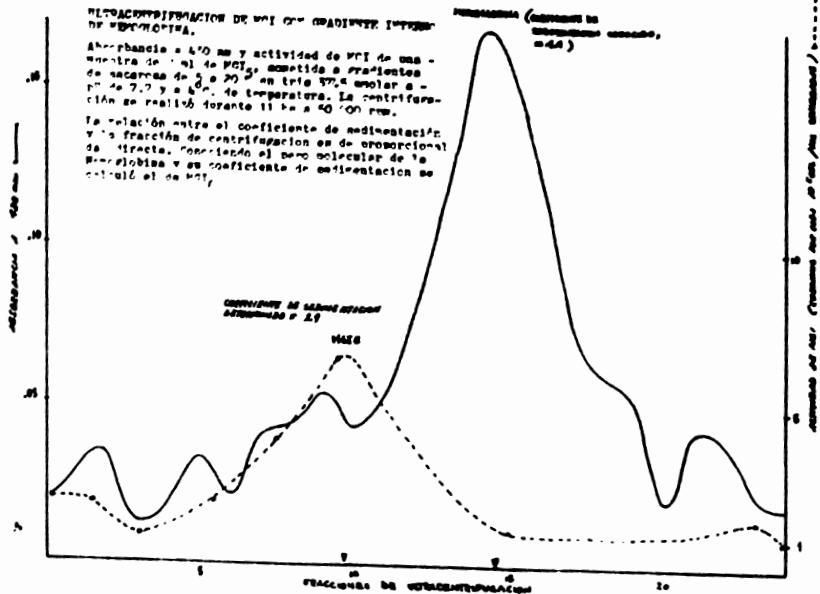


TABLA 6 ETAPAS DE PURIFICACION^a Y PERO MOLECULAR DEL VPP

ETAPA	VOL (μVW) ml	PROTEINA mg/ml	ACTIVIDAD coliformes/ml de suspensión	ACTIVIDAD ESPECÍFICA colonias/cg proteína
1- Medio condicionado	500	27	154	7.7%
2- Dializado	500	20	144	7.6%
3- Cromatografía nyaf-celulosa	27	37	140	22.22
4- Precipitación con NH ₄ SCN y diálisis	2	498	11660	22.22
5- Ultratración ultraral ACA 5% (b)	4	10	1100	140.0
6- Ultracentrifugación (c)	1.5	-	1400	-

a El criterio de purificación fue la actividad "coliformes enterococcos".

b Poro molecular: 10 000 Daltons.

c Partiendo a partir de 2 ml del eluirado de la columna de ultraral. Para
 es un estándar independiente de determinación de peso molecular por esta
 una etapa de purificación. Poro molecular: 10 000 Daltons.

SEIS. DISCUSION

Durante el proceso normal de diferenciación, las células van adquiriendo las funciones específicas que las caracterizan. En muchas células estas funciones incluyen la producción de MGI. En células neoplásicas, como lo son -- las líneas celulares analizadas en este trabajo, este proceso de diferenciación se ha detenido en un punto determinado, y de esto dependerá que produzcan o no sustancias diferenciadoras.

Un criterio de diferenciación, además de la producción de sustancias específicas, lo puede constituir la rapidez de crecimiento y el comportamiento de las células en cultivo. El crecimiento en cultivo masivo de las líneas J774 y WR19M.1 es similar en velocidad (comparense los tiempos de duplicación en cada caso, gráficas 1 y 2). Existe en cambio diferencia mayor en las fases de retraso, siendo en la línea J774 mayor este período. Sin embargo, la diferencia entre -- las dos líneas es grande bajo el efecto de LPS. La línea -- WR19M.1 es más sensible a la endotoxina, deteniendo su crecimiento proporcionalmente a la dosis y aumentando la adhesividad al sustrato y la forma alargada. En la línea J774 -- la responsividad al LPS es mínima (ver tablas 4 y gráficas 3 y 4). ¿Significa este resultado que la línea WR19M.1 es -- más diferenciada? En condiciones normales (37°) las células responden a la acción del LPS produciendo elevadas cantida-

des de MGI. Sugiero que una línea de más responsiva a las endotoxinas puede producir mayores niveles de MGI en condiciones in vitro. Esto puede así mismo corresponder a una mayor adhesión al sustrato, cuestión que será discutida -- posteriormente.

PRODUCCION DE MGI. Durante este trabajo se comprobó (graf. 5 y 6). Que la línea J774 no produce MGI espontáneamente, -- pero lo produce al incubarse con LPS. Esto coincide con lo reportado (33), aunque el nivel producido en nuestro caso es más bajo. Esto puede atribuirse a una transformación de la línea durante su transporte y cultivo o bien a las condiciones propias de producción de MGI. En cuanto a la línea WR19M.1, se comprobó que produce MGI espontáneamente y que esta producción se incrementa mediante la adición de LPS (gráficas 5 y 6). No se encontraron diferencias de que esta línea haya sido probada para producción de MGI anteriormente.

Al respecto podemos suponer que la línea J774 fue detenida en su camino de diferenciación justo antes de que adquiriera la capacidad de producir MGI, pero puede ser "empujada" hacia la producción por medio de LPS, aún siendo poco sensible a la endotoxina. En cambio, la línea WR19M.1 habría sido transformada después de haber adquirido la capacidad de producir MGI, siendo más sensible a la acción de las endotoxinas, que incrementarían aún mas sus niveles de MGI. De esto se concluye que desde el punto de vista de producción de MGI, es más conveniente usar una línea que lo produzca espontáneamente, e incrementar la producción con endotoxinas.

Se observó además que la relación dosis- producción de MGI es proporcional hasta cierta dosis, decreciendo luego la producción de proteína diferenciadora. Este decremento -- está relacionado probablemente con la toxicidad del LPS -- (ver tabla 4 y gráficas 5 y 6). La dosis óptima en este -- trabajo fué de 10 mcg/ml, para estimulación de actividad diferenciadora. En la literatura se reportan dosis esti-- mulatorias in vitro que van de .1 mcg/ml a 100 mcg/ml (--- 10, 24, 33), aunque hay que aclarar que en este caso nos interesaba la dosis óptima y no la mínima o máxima esti--- mulatorias. Señalemos también que en la incubación se u--- tilizó el siguiente procedimiento: incubación de las líneas con LPS en presencia de suero, lavar el medio, incubar 3 - días mas con LPS sin suero. Se observó que la segunda "pa-- se" era más efectiva en producción de MGI. Suponemos que esto se debe a que en ausencia de suero las células de--- tienen su crecimiento, y en el cambio metabólico que esto - implica producen y secretan más sustancias al medio, entre ellas, más MGI.

Retomemos ahora la suposición hecha anteriormente de que la mayor adherencia al sustrato colleva una mayor produc-- ción de MGI. Se realizaron pruebas de producción de MGI com-- parando platos petri con superficie tratada, platos de vidrio y platos plásticos sin superficie tratada. La adherencia -- celular es descendiente al orden mencionado, y la produc-- ción de MGI también lo es (ver gráfica 7). Este hecho suma-- do al resultado de que la línea mas adherente y la dosis de LPS que mayor adherencia provocan, nos hacen concluir que la

suposición hecha es verídica.

PURIFICACION DE MGI. Hasta el momento no se ha reportado la purificación y caracterización de MGI producido por una línea leucémica estimulada con LPS. De aquí que resulte interesante comparar los métodos y resultados obtenidos en este trabajo con purificaciones de otras fuentes de MGIs.

La diálisis ha sido utilizada con éxito (29) para eliminar inhibidores asociados frecuentemente a las moléculas de MGI, dando como resultado una mayor actividad diferenciadora en los medios dializados. En este trabajo la diálisis en varias amortiguadores no dió este aumento de actividad de MGI, de donde concluimos que no existen inhibidores en nuestro preparado, o bien que estos están unidos al MGI de manera covalente. Podemos afirmar que la diálisis no fue significativa como paso de purificación.

La cromatografía de intercambio iónico ha sido reportada (29) como un método que da un pico de actividad biológica amplio y que la ganancia de actividad es baja. Durante este trabajo se obtuvo con DEAE-Celulosa un pico de actividad de MGI único y bastante definido (ver gráf. 9). Más adelante discutiremos como podemos relacionar esto con nuestra fuente de MGI. Esta técnica reveló, por otra parte, la presencia de cantidades considerables de suero del medio de cultivo, que se pega a las células o al plato de cultivo de modo que no es removido por el proceso de lavado. Sugerimos utilizar -- previo ensayo otras formas de obtención del medio condicionado que impliquen una mayor "limpieza" de proteínas contaminantes.

En la filtración con ultrogel se encontró de nuevo un solo pico definido de actividad de MGI. Este método ha sido ampliamente utilizado para la purificación de este tipo de proteínas, aunque la determinación de pesos moleculares por él puede conducir a valores erróneos en preparaciones impuras (29). En este trabajo se obtuvo un peso de 36 000 Daltones.

Se utilizó además otro método para determinar el peso molecular, la ultracentrifugación en gradientes de sacarosa, obteniendo un valor para el MW_{12} de 34 000 Daltones. El grado de aproximación de este peso con el obtenido por ultrogel es aceptable.

Durante todo el proceso de purificación se logró un incremento de 26 veces en actividad biológica por μ g de proteína. No se utilizaron otros criterios de pureza como la electroforesis, ya que la cantidad de MGI es tan pequeña que la hace invisible a este tipo de técnicas.

Como se ha señalado, el peso molecular obtenido en este trabajo es del rango de 34 000 y 36 000 Daltones. Este valor es similar al reportado por varios investigadores, entre ellos el de medio condicionado de pulmón de ratón, 30 000 Daltones de Purves (47), el de Poje (21), de 40 000 después de filtración con Sephadex de medio de pulmón humano o de 30 000 para inductores de granulocitos y macrófagos humanos usando filtración en sales, (29).

Sin embargo, la mayoría de los autores mencionados, y además otros que reportan pesos muy distintos (27, 28) señalan la aparente presencia de varias proteínas diferenciadoras - en los preparados. Ya hemos señalado que en el caso de esta purificación de MGI proveniente de líneas leucémicas, se obtuvieron siempre picos únicos y definidos en las técnicas - de purificación. Suponemos que esto se debe a que la producción de MGI fue realizada por un solo tipo celular, al tratarse de una línea celular clonada y por tanto, uniforme. - Es posible que en el caso de MGIs preparados a partir de tejidos, varias células de tipos diferentes produzcan cada - uno MGIs específicos y que los valores coincidentes de MGI reportados correspondan a células como las utilizadas para este trabajo.

SUGERENCIAS. Del presente trabajo se la producción masiva - de MGI a partir de líneas leucémicas incubadas con LPS es, viable, recomendándose el estudio de un número mayor de - líneas y utilizando aquellas que producen MGI espontáneamente. El incremento de MGI también puede lograrse mediante la producción de clones más activos a partir de las - mismas líneas. Es de desearse que la producción de MGI se - lleve a cabo en mayor escala, lo que permitiría el estudio detallado de este tipo de sustancias y su posible aplicación con fines terapéuticos.

- 1- Paul, J. (1973). Cell and Tissue Culture. 4 ed. Churchill Livingstone-Londres.
- 2- Lehninger, A. (1975). Biochemistry. 2 ed. Worth. Nueva York.
- 3- Sachs, L. (1964) New Perspectives in Biology. Elsevier. Amsterdam. p.246.
- 4- Ham, R; McKeehan, W. (1979) Media and Growth Requirements. - En Methods in Enzymology. Vol LVII. Academic Press. Nueva York.
- 5- McIlwain, W. (1979) Mass Culture of Mammalian Cells. En Methods in Enzymology. Vol LVIII. Academic Press. Nueva York.
- 6- Lieberman, M; Mavligit, G. (1978) Progresos Recientes en Oncología. I.N.S.S. México.
- 7- Fibach, E; Landau, T; Sachs, L. (1972) Normal Differentiation of Myeloid Leukaemic Cells Induced by a Differentiation-inducing Protein. Nat. New Biol. Sc. U.S. 70:343.
- 8- Eaves, A; Bruce, W. (1973) In Vitro Production of Colony-Stimulating Activity: I. Exposure of Mouse Peritoneal Cells to Endotoxin. Cell Tissue Kinet. 7:19.
- 9- Parker, J; Metcalf, D. (1973) Production of Colony-stimulating Activity in Mitogen-stimulated Lymphocyte Cultures Jour. Immunol. 112:502.
- 10- Cline, M; Rothman, B; Golde, D. (1974) Effect of Endotoxin on the Production of Colony-stimulating Factor by Human Monocytes and Macrophages. J. Cell Physiol. 84:193.
- 11- Sheridan, J; Metcalf, D; Stanley, E. (1974) Further Studies on the Factor in Lung-conditioned Medium Stimulating Granulocyte and Monocyte Colony Formation In Vitro. I. Cell Physiol. 84:147.
- 12- Pastan, I. (1979) Cell Transformation. En Methods in Enzymology. Vol LVIII. Academic Press. Nueva York.
- 13- Lotan, J; Sachs, L. (1975) Control of Normal Differentiation of Myeloid Leukaemic Cells: VI. Inhibition of Cell-Multiplication and the Formation of Macrophages. J. Cell Physiol. 85:587.

- 14- Fibach, E; Sachs, L. (1975) Control of Normal Differentiation of Myeloid Leukaemic Cells: VIII. Induction of Differentiation to Mature Granulocytes in Mass Culture. *J. Cell Physiol.* 86:221.
- 15- Sachs, L. (1976) Control of Normal Cell Differentiation - in Leukaemic Cells. *Comparative Leukaemia Research Bibl. Haemat.* 63:
- 16- Stanley, E; Hansen, G; Woodcock, J; Metcalf, D. (1975) Colony Stimulating Factor and the Regulation of Granulopoiesis and Macrophage Production. *Fed. Proc.* 34:2272.
- 17- Metcalf, D; Wilson, J. (1976) Endotoxin-induced Size Change in Bone Marrow Progenitors of Granulocytes and Macrophages. *J. Cell Physiol.* 89:381.
- 18- Lotan, J; Sachs, L. (1977) Genetic Dissection of the Control of Normal Differentiation in Myeloid Leukaemic Cells *Cell Biology.* 12:554.
- 19- Maeda, S; Sachs, L (1978) Control of Normal Differentiation of Myeloid Leukaemic Cells: VIII. Inducibility for Some Stages of Differentiation by Dimethylsulfoxide and its Dissociation from Inducibility by MGI. *J. Cell Physiol.* 94:181.
- 20- Defendi, V. (1976) Macrophage Cell Lines and Their Uses in Immunobiology. *In Immunobiology of the Macrophage.* Academic Press. Nueva York. P.275.
- 21- Bull, F; Rosedal, M. (1978) Macrophage Colony Development: Properties of Colony Stimulating Factors from Murine Embryo and Pregnant Uterus. *Immunology.* 34:479.
- 22- Weiss, B; Sachs, L. (1978) Differences in Surface Membrane Ecto-ATPase and Ecto-AMPase in Normal and Malignant Cells and the Independent Regulation of Ecto-ATPase and Ecto-AMPase. *J. Cell Physiol.* 93:183.
- 23- Motoyoshi, K; Takaku, F; Mizoguchi, H; Miura, Y. (1978) Purification and Some Properties of Colony-stimulating Factor from Normal Human Urine. *Blood.* 51:1012.
- 24- Stewart, C; Lin, H. (1978) Macrophage Growth Factor and - its Relationship to Colony Stimulating Factor. *J. Reticuloendothel. Soc.* 4:269.
- 25- Maynard, J. (1977) *Ideas Matemáticas en Biología.* C.E.C. S.A. México. p. 274
- 26- Williams, R; Pluznik, D. (1977) Differences in the Proliferative Density Characteristics in Murine Granulocyte-Progenitor Cells Cloned in the Presence of Serum and/or Hemolysate. *Exp. Hemat.* 6:323.

- 27- DiPersio, J; Brennan, J; Litchman, P. (1978) Granulocyte — Growth Modulators Elaborated by Human Cell Lines. En *New Topics in Cell Differentiation*. Academic Press. Nueva York. p.
- 28- Williams, M; Eger, R. (1978) Purification and Characterization of Clonable Murine Granulocyte-macrophage Precursor Cell Populations. En *Hematopoietic Cell Differentiation*. Academic Press. Nueva York. p.
- 29- Burgess, A; Metcalf, D; Ficola, M; Russell, S. (1978) Purification and Characterization of Cell Specific Colony Stimulating Factors. En *Hematopoietic Cell Differentiation*, Academic Press. Nueva York. p.
- 30- Moore, M. (1978) Regulation of Granulopoiesis In Vitro. En *Hematopoietic cell Differentiation*. Academic Press. - Nueva York. p.
- 31- Price, G; Troogerud, R; Stewart, S; Senn, J. (1978) Heterogeneity of Colony Stimulating Activities. En *Hematopoietic Cell Differentiation*. Academic Press. Nueva York. p.
- 32- Stanley, E; Metcalf, D. (1971) The Molecular Weight of Colony Stimulating Factor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137:1029.
- 33- Ralph, P; Broxmeyer, H; Moore, M; Nakoinz, I. (1978) Induction of Myeloid Colony Stimulating Activity in Murine Monocyte Tumor Cell Lines by Macrophage Activators and in a T-Cell Line by Concanavalin A. *Cancer Research*. 38:1414.
- 34- Patterson, M. (1979) Measurement of Growth and Viability of Cells in Culture. En *Methods in Enzymology*. Vol LVIII Academic Press. Nueva York. p.
- 35- Bronting, S. (1954) Some Investigations on the Relation Between Growth and Carbohydrate Metabolism. *Anat. Rec.* 118:444.
- 36- Gemmill, G; Gey, G; Austrian, P. (1940) The Metabolism of Tissue Culture in Walker Rat Sarcoma 319. *Johns Hopkins Bull.* 66:167.
- 37- Meiner, J; Luderitz, O; Westphal, O. (1969) Biochemical Studies on Lipopolysaccharides of Salmonella R Mutants. 7:370.
- 38- Nelson, W. (1978) En *Immunobiology of the Macrophage*. - Academic Press. Nueva York. p. 17.
- 39- Bradley, T; Metcalf, D; Robinson, E. (1967) Stimulation by Leukaemic Sera of Colony Formation in Solid Agar Cultures by Proliferation of Mouse Bone Marrow Cells. *Nature*. 213:926.
- 40- Bradley, T; Metcalf, D. (1966) The Growth of Mouse Bone Marrow Cells In Vitro. *Anat. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 44:287.

- 41- Landau, F; Sachs, L. (1971) Characterization of the Inducer Required for the Development of Macrophage and Granulocyte Colonies. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68:234.
 - 42- Bradley, F; Stanley, E; Summer, M. (1971) Factors from Mouse Tissues Stimulating Colony Growth of Mouse Bone Marrow - Cells in Vitro. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 49:595.
 - 43- Stanley, E; Robinson, W; Ada, G. (1968) Properties of Colony Stimulating Factors in Leukaemic and Normal Mouse Serum. *Exp. Biol. Med. Sci.* 46:715
 - 44- Mints, J; Sachs, L. (1974) Differences in Inducing Activity for Human Bone Marrow Colonies in Normal Granulocytic -- Colonies by Mouse Bone Marrow Cells In Vitro. *J. Cell. Physiol.* 84:275.
 - 45- Sheridan, J; Metcalf, D. (1983) The Bone Marrow CSF relation of Serum CSF to Urine CSF. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 144
 - 46- Metcalf, d. (1971) Acute Antigen-induced Elevation of Serum CSA Levels. *Immunol.* 21:247.
 - 47- Burgess, A; Camarkis, J; Metcalf, D. (1977) Purification and Properties of CSF from Mouse Lung Conditioned Medium
 - 48- Metcalf, d. (1974) En Control of Proliferation in Animal Cells. Academic Press. Nueva York. p 887.
 - 49- Price, S; McCulloch, E; Till, J. (1973) A New Low Molecular Weight for Colony Stimulating Activities. *Blood.* 42:341.
 - 50- Watson, J; Prichard, J. (1972) Characterization of a Factor Required for the Differentiation of Myeloid and Lymphoid Cells in Vitro. *J. Immunol.* 108:1209.
 - 51- Fojo, S; Wu, M; Gross, M; Yunis, A. (1977) The Isolation -- and Characterization of a Colony Stimulating Factor from Mouse Lung. *Biochem. Biophys. Acta.* 494:92.
 - 52- Ralph, P; Nakoints, I. (1977). Direct Toxic Effects of Immunopotentiators on Monocytic, Myelomonocytic and Eristocytic or Macrophage Tumor Cells in Culture. *Cancer Res.* 37:546.
 - 53- Luderitz, C ; Galanos, C ; Lehmann, V ; Nurminen, P ; Ritschel, E ; Rosefelder, G ; Simon, P ; Westphal, O. (1973). Lipid A Chemical Structure and Phosphoryl Activity. *Jour. of Infectious Diseases.* 128:17.
-

OCHO . AGRADECIMIENTOS

Deseo dar las gracias al Dr. Penny Weiss, del laboratorio de Diferenciación Celular de la INEP Zaragoza, por su orientación y ayuda en todos los aspectos de la elaboración de este trabajo, incluyendo las facilidades en cuanto a equipo y materiales utilizados.

Asimismo, estoy en deuda con el Dr. Mario Calcagno, - del laboratorio de Bioquímica de la INEP Zaragoza por su colaboración en todo lo relacionado a la parte bioquímica del trabajo.

También agradezco al Biol. Jorge Perez por su cooperación en la purificación de MGL, y a todas las personas que trabajan y colaboran en los laboratorios antes mencionados.

Finalmente, expreso mi aprecio a la Dra. Luz María Lopez de la Rosa, al Dr. Edgardo Escamilla, a la M. en C. - Martha Gonzalez y a la Biol. María del Carmen Gutierrez - por la revisión crítica del manuscrito y sus útiles observaciones .

Juan Jose Connejo

Julio de 1980