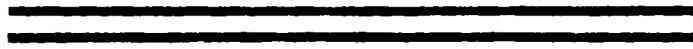


28 No 117

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS



ESTUDIOS IN VITRO SOBRE EL FACTOR INDUCTOR A LA FORMACION DE SITIOS RECEPTORES C_3 (C₃RI) EN CELULAS DE MEDULA OSEA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

BASILIO LUIS RIOS RAMIREZ

MEXICO, D. F.

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

C O N T E N I D O

| | PAGS. |
|-------------------------|-------|
| I RESUMEN | 1 |
| II OBJETIVOS | 3 |
| III INTRODUCCION | 4 |
| IV MATERIALES Y METODOS | 20 |
| V RESULTADOS | 30 |
| VI DISCUSION | 34 |
| VII LITERATURA CITADA | 38 |
| VIII APENDICES | 43 |

RESUMEN

En este trabajo se evidencía la existencia de la molécula responsable de la inducción de sitios receptores para una de las enzimas del sistema del complemento (C_3).

Para la obtención de esta molécula denominada C_3 RI - (inductor de los receptores C_3), se utilizó medio condicionado del pulmón proveniente de ratones de la cepa CD-1 previamente inoculados con lipopolisacáridos (LPS) de paredes celulares de Salmonella typhimurium.

Por medio de la técnica de rosetas en las células de médula ósea utilizando eritrocitos de carnero recubiertos con anticuerpos y complemento (EAC); se determinó el tiempo en el cual aparece esta molécula después de adicionar medio condicionado de pulmón (MCP) a las células en cultivo; asimismo, usando diferentes concentraciones de este medio, se determinó el volumen óptimo para la determinación in vitro de este factor.- El tiempo en el cual se presentó la mayor inducción de receptores C_3 fue a las 96 horas y la concentración óptima para su determinación fue de 5 por ciento de MCP.

Utilizando la cromatografía en Shephadex G-75, se determinó el peso molecular del C_3 RI y por medio de electrófoque en placa de Ultrodez se estableció su pH isoeléctrico, encontrándose que el C_3 RI tiene un peso molecular de 35,000 dal-

tones y un pH isoeléctrico de 3.9.

La molécula de C_3RI resultó ser termolábil y susceptible a la acción de la tripsina, lo que nos indica que se trata de una molécula de naturaleza proteica.

Asimismo, se estableció que el C_3RI es independiente del Colony Stimulation Factor (CSF) o Factor Estimulador de Colonias (FEC), ya que no induce a la formación de colonias de macrófagos y granulocitos al utilizar la técnica de bicapa en agar.

OBJETIVOS

Para la realización de este trabajo se plantearon -- los siguientes objetivos:

1.- Debido a que se ha registrado la participación -- de un factor inductor en la formación de receptores para la re-- gión Fc de las inmonoglobulinas en células de médula ósea y sa-- biendo que estas células adquieren durante su diferenciación -- tanto el receptor Fc como el receptor C₃ del complemento, el -- primer objetivo de este trabajo fue determinar si existe una -- molécula capaz de inducir la formación de los receptores C₃.

2.- Determinar si el inductor que participa en la -- formación de receptores C₃ es semejante al factor de estimula-- ción de la colonia (CSF) (Colony Stimulation Factor) o al in-- ductor del granulocito macrófago (MGI) (Macrophage Granulocy-- te Inductor), o si existe otra molécula responsable de esta -- inducción.

3.- Determinar las condiciones óptimas para la induc-- ción de los receptores C₃ in vitro.

4.- Con base en la utilización de la cromatografía -- en columna de Sephadex empleando diversas sustancias de peso-- molecular conocido y por electroenfoque con anfolinas de pH es-- pecífico, determinar el peso molecular y el pH isoeléctrico de este inductor.

INTRODUCCION

Cultivo de tejidos.- Un camino importante en el estudio de la célula viviente se abrió cuando Harrison (26) en 1909 demostró que las células nerviosas embrionarias podían crecer y diferenciarse in vitro. Esto dió lugar a la técnica de cultivo de tejidos la cual junto con el trabajo de Carrel (26), tuvo gran repercusión sobre la citología y continúa hasta ahora desarrollándose en muchos aspectos diferentes. Uno de los principales resultados de esta técnica fué la demostración de que; como en los protozoarios, las células de los metazoarios son potencialmente inmortales (27). De hecho el cultivo de Carrel de corazón embrionario ha sido mantenido desde 1912 a través de miles de generaciones celulares. Con el aislamiento de cepas puras de células, el cultivo de tejidos se ha convertido en una técnica ideal para el estudio de la estructura y comportamiento de las células (27). Este análisis se perfeccionó con la introducción de la microscopía de contraste de fases así como el empleo de colorantes vitales. Entre los aspectos importantes estudiados por esta rama de la Biología Celular se encuentran: la naturaleza de la membrana celular, los receptores de membrana, la reacción de las células a cambios del medio, la nutrición celular, el crecimiento, la secreción y otras manifestaciones de la actividad celular (11).

El cultivo de tejidos consiste en transferir porciones de tejidos a un medio adecuado donde las células puedan -- adaptarse y crecer en forma autónoma al estar sometidas a una temperatura similar a la del cuerpo del animal y con oxígeno -- necesario para su desarrollo (30). Las células crecen y en ocasiones se desplazan sobre el medio nutritivo pudiendo ser observadas en un microscopio de contraste de fases (11).

Uno de los adelantos más interesantes desde el punto de vista citológico ha sido el de las técnicas para el establecimiento de cepas celulares puras (20). Este tipo de investigación se favoreció considerablemente mediante el uso de enzimas (tripsina, colagenasa, etc.); así como también, por la utilización de otros medios mediante los cuales se pueden separar las células del tejido y cultivar grandes masas de éstas en suspensión o en cajas Petri como se ha hecho con las bacterias (30). Es posible obtener colonias o clones de células de la división de una sola y entonces; por aislamiento apropiado, separar cepas celulares puras (20).

El cultivo de tejido hematopoyético provee nuevas -- oportunidades para el estudio experimental de los factores que determinan la dirección de la diferenciación de los precursores hematopoyéticos así como la cinética celular de este tejido. Muchos de los problemas conectados con los mecanismos de -

inmunidad, también requieren de los métodos de cultivo de tejidos para su estudio ya que anteriormente era imposible inducir la respuesta inmunitaria in vitro (29,28).

Diferenciación celular.- En los organismos multicelulares la mayoría de sus células se adaptan a condiciones externas in vitro; en estas condiciones las células efectúan la serie de modificaciones morfológicas que a nivel ontogenético efectúan in vivo hasta lograr una especialización progresiva - en estructura y función, constituyendo la diferenciación celular que se produce continuamente a lo largo de la vida de un organismo (si bien esta diferenciación alcanza su máxima expresión en el período embrionario) (34). Solo en años recientes - el campo de la biología del desarrollo ha abandonado su enfoque morfológico, alcanzando los niveles celular y molecular. - En este aspecto es importante establecer que la diferenciación celular se produce por lo común sin un cambio cuantitativo del genomio, ya que el hecho de que todas las células diploides de un organismo tengan el mismo contenido de ADN sugiere que la diferenciación celular no depende de una ganancia o pérdida de información genética, sino de otros factores que actúan probablemente sobre los procesos de transcripción y traducción (37, - 24).

En términos moleculares, la diferenciación celular -

implica la síntesis preferente de algunas proteínas específicas como la hemoglobina en los eritrocitos, la gamma-globulina en los linfocitos, la actina y la miosina en las células musculares, los receptores de la membrana en los macrófagos, monocitos y linfocitos (35). Para inducir esta síntesis ciertos genes debería trabajar en un momento preciso de la vida de determinados tipos celulares. La diferenciación celular se podrá explicar en términos moleculares, únicamente cuando sea comprendido el complejo mecanismo de la regulación genética que tiene lugar en las células superiores (36).

La hematopoyesis es la formación de células sanguíneas nuevas y es un término usado generalmente para describir las etapas de formación y maduración de los eritrocitos y leucocitos existentes en la sangre (28). La médula ósea es el lugar donde en la edad madura se lleva principalmente a cabo la generación de estas células, teniendo a la Unidad Formadora de Colonias (UFC) como punto de partida de todos los elementos mieloides. Así para diferenciarse en eritrocito, la UFC presenta una serie de transformaciones que comprenden al proeritroblasto, eritoblasto basófilo, eritoblasto policromatófilo, normoblasto, reticulocito y eritrocito. De la misma manera, para obtener a los linfocitos maduros; se parte de la UFC diferenciándose en primer lugar en reticulocito linfocítico, en linfo

blasto, en linfocito grande y por último en linfocito pequeño - el cual forma parte de la respuesta inmune en donde actúa en dos tipos diferentes que son el linfocito B y el linfocito T - (9).

En el embrión de ratón (o recién nacido), todos los tipos morfológicos de células requeridas para la respuesta inmunitaria han sido identificadas (48), pero les falta la capacidad para funcionar activamente como células linfáticas. Esto puede ser consecuencia de la maduración retardada de receptores adicionales de membrana. Así los receptores para Fc y C₃ alcanzan madurez funcional en lapsos de amplitud variable, limitando su capacidad al funcionamiento de la célula linfocítica. La madurez de las células B para producir una respuesta inmunitaria heterogénea de tipo adulto (en el ratón) ocurre inicialmente a la edad de 1-2 semanas (2).

Fuentes inductoras de la diferenciación celular. - El descubrimiento de las sustancias estimulantes de la diferenciación celular; conocidas como Factor Estimulante de las Colonias (Colony Stimulating Factor - CSF) o Inductor de Granulocitos y Macrófagos (Macrophage and Granulocyte Inductor - MGI) - (3, 4, 31, 41, 46, 47), ayudó a determinar los cambios estructurales y morfológicos in vitro que se llevan a cabo en la diferenciación celular. Estas sustancias juegan un papel de regu-

lador fisiológico tanto en el hombre como en los animales ya sea en condiciones in vivo o in vitro (3).

Existen varias fuentes de obtención de MGI, como son: pulmón, hígado, bazo, médula ósea, testículos, útero, placenta membranas fetales, músculo esquelético, cerebro, glándulas salivales, riñón, orina y en otras más (5,33,37). En todas éstas su producción es mínima, por lo que para obtener mayores cantidades con el objeto de hacer estudios in vitro, se ha recurrido a la activación de células mediante el empleo de endotoxinas entre las cuales se encuentran los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram-negativas (39, 44). Los granulocitos, neutrófilos y monocitos están involucrados en la resistencia contra las infecciones, en consecuencia se han hecho estudios sobre el efecto de las endotoxinas (LPS) en las actividades proliferativas de las poblaciones celulares, observándose que producen una elevación en los niveles de MGI tanto in vivo como in vitro (6,7,42).

El MGI se considera una glucoproteína termolábil y resistente a la acción de la desoxirribonucleasa y ribonucleasa, con un peso molecular muy variable (según la fuente de obtención); así tenemos que el MGI de orina humana tiene un peso molecular de 45,000 y 85,000 daltones (32), el MGI de medio condicionado de células L de ratón con 70,000 daltones (38) el

de línea celular Yosida Sarcoma con 22,000 y 25,000 daltones- (8), el de medio condicionado de pulmón de ratón con 23,000 -- daltones (5), el de células pancreáticas cancerígenas con - - 50,000 (37) y el de medio condicionado de pulmón humano con - 40,000 y 200,000 daltones (38).

Sistema inmune.- En el organismo el sistema inmune se manifiesta por dos tipos de defensas diferentes; la inmunidad celular y la inmunidad humoral, ambos tipos son controlados por los linfocitos. El linfocito es la célula en inmunología existiendo dos poblaciones; el linfocito T y el linfocito B, los cuales aunque representan poblaciones separadas actúan simultáneamente en diversos campos (2).

Las células B son responsables de las funciones inmunidad humoral, expresada a través de la producción de las proteínas plasmáticas circundantes denominadas anticuerpos o inmunoglobulinas; así como también, de la producción de las proteínas que forman el sistema del complemento el cual es el mediador humoral primario de las reacciones antígeno-anticuerpo (12).

Estructura de las inmunoglobulinas.- Las inmunoglobulinas comprenden un grupo heterogéneo de proteínas que constituyen el 20 por ciento de las proteínas plasmáticas totales. Son glucoproteínas compuestas de 86 - 96 por ciento de poli-

péptidos y de 4 - 18 por ciento de carbohidratos; el componen-
te polipeptídico posee casi todas las propiedades biológicas
asociadas a los anticuerpos (23). Las inmunoglobulinas (Ig) -
se dividen en cinco grandes clases que son: IgG, IgM, IgA, --
IgD e IgE. Todas mostrando ciertas similitudes estructurales,
ya que presentan subunidades básicas compuestas de cuatro ca-
denas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. Las dos --
más grandes con PM de 53,000 a 75,000 daltones son conocidas-
como cadenas pesadas H; las otras dos más pequeñas tienen un-
PM de 22,500 daltones y son conocidas como cadenas ligeras L.
Al romper la molécula de Ig con papaína (la cual actúa en pre-
sencia de cisteína) se producen tres fragmentos, dos de los -
cuales son idénticos y constan de una cadena ligera L y la --
parte final amino de la cadena pesada H, estos fragmentos for-
man la porción llamada Fab (fijadores de antígeno), la terce-
ra pieza es conocida como fragmento Fc (fragmento de tipo - -
cristalizable) que contiene la parte terminal carboxilo en am-
bas cadenas de tipo pesado H. La región Fc regula la fijación
de la molécula de Ig a las células (2, 10, 23) (fig. 1).

La actividad biológica de las Ig parece estar rela-
cionada a los rasgos estructurales determinados por la región
Fc, y por su capacidad para aglutinar células y fijar el sis-
tema del complemento. También son importantes en relación a -

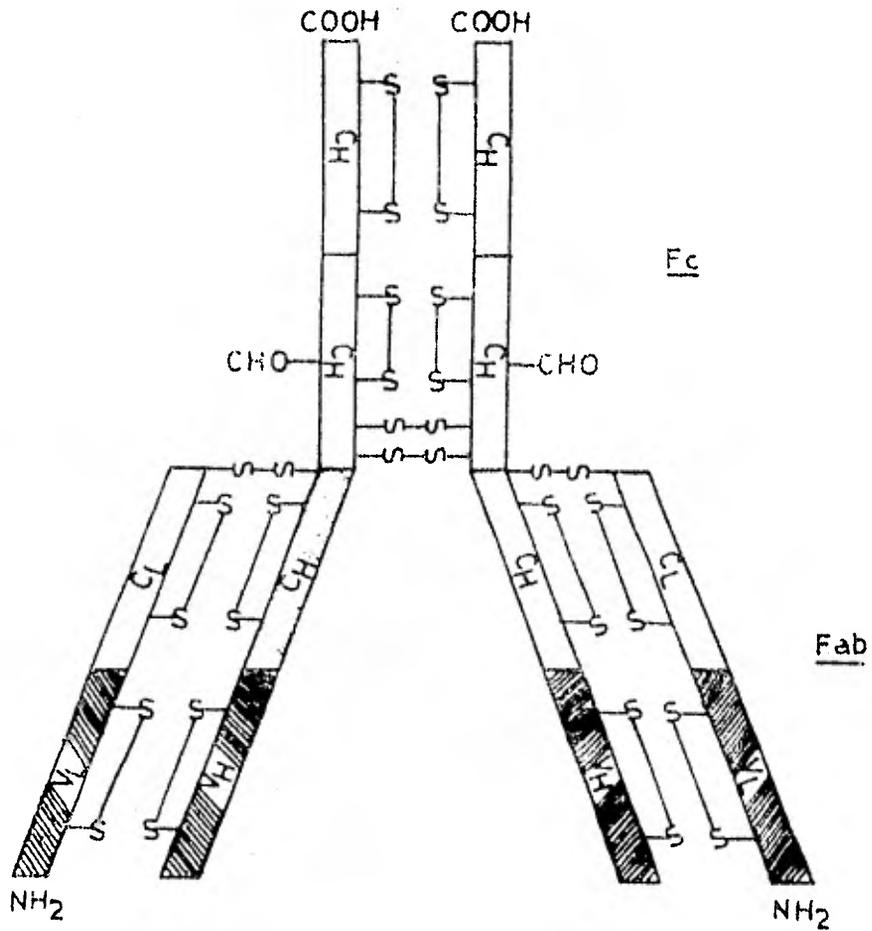


Fig. 1 . Estructura de las inmunoglobulinas. Las moléculas de inmunoglobulina G (IgG), al igual que todas las moléculas de Ig, están constituidas por cuatro cadenas que al romperse da origen a los fragmentos Fc y Fab (Fundebere, 1955).

su capacidad para penetrar a las membranas corporales o para fijarse en los sitios apropiados sobre las membranas celulares.

El sistema del complemento.- El complemento es el mediador humoral primario de las reacciones Antígeno - Anticuerpo (Ag - Ac), consiste de una serie de 15 proteínas séricas química e inmunológicamente distintas que son capaces de actuar de manera recíproca con el Ac y con las membranas celulares (2,22). Esta reciprocidad genera la actividad biológica; es decir, la acción de este sistema va desde la lisis celular hasta la mediación directa de los procesos inflamatorios; además, recluta otros factores humorales y celulares consiguiendo la participación de ellos, induciendo la liberación de histamina de las células cebadas, la emigración de los leucocitos, la fagocitosis y la liberación de los constituyentes lisosómicos de los fagocitos (17). Las proteínas individuales de este sistema se encuentran normalmente en circulación como moléculas precursoras inactivas comprendiendo el 15 por ciento de la fracción globulínica del plasma y se designan: C_1 C_2 C_3 C_4 C_5 C_6 C_7 C_8 y C_9 . Cada componente debe ser activado sucesivamente en condiciones apropiadas para que progrese una reacción del complemento.

La mayor parte de las actividades biológicas impor

tantes del sistema del complemento ocurren durante la activación de los últimos 6 componentes o sea desde el C_3 , hasta el C_9 .

Existen dos vías independientes que conducen a la activación de la porción terminal de la serie del complemento; estas vías son la clásica y la alterna o de la properdina, ambas desencadenadas por substancias diferentes. Las dos vías convergen en el punto medio del sistema (C_3) y el resto de la serie es común para ambas vías (Fig. 2).

Vía clásica del complemento.- La vía clásica comprende los pasos de reacción de los componentes; primario (C_1), secundario (C_2), terciario (C_3) y cuaternario (C_4) del complemento. Esta vía puede ser activada por el complejo Antígeno Anticuerpo o por inmunoglobulinas (principalmente del tipo IgG). Entre las subclases de IgG; la IgG3 es la más activa seguida por IgG1 e IgG2. La activación inmunitaria ocurre cuando se combina el primer componente del complemento (C_1) con un sitio localizado en la región Fc de la molécula de IgG (Fig. 2).

La vía clásica del complemento en una serie de reacciones recíprocas enzima-sustrato y proteína-proteína que conducen a la formación sucesiva de diversas enzimas del complemento. Estas reacciones son altamente específicas y un estímulo

lo relativamente pequeño puede conducir a la generación de - estos productos biológicamente activos (2).

Vía alternativa del complemento. Esta vía también es llamada de la properdina, la cual puede ser activada por IgA, IgG e IgE; así como por ciertos polisacáridos, lipopolisacáridos y enzimas semejantes a la tripsina. Los factores que intervienen en esta vía son; la properdina, el factor A (semejante a C_4), una substancia termolábil llamada factor B (semejante a C_2), y el factor D (fig. 2) (1,22).

Tanto la vía clásica como la vía alternativa se unen en el componente C_3 para formar la proci3n terminal de la serie de factores del complemento que actúa directamente sobre las membranas celulares. Por consecuencia, la interacción en la membrana es realizada por la serie $C_5 - C_9$ generando citotoxicidad y l3sis en ella.

. Receptores de membrana. - En años recientes se han identificado una gran variedad de receptores sobre la superficie de varias células entre las que se encuentran; los linfocitos B los linfocitos T macrófagos y células de médula ósea. La identificación de los receptores sobre estas células ha ayudado a distinguir la diferencia entre una y otra célula así como la distinción entre una célula maligna o normal (13).

Los macrófagos, monocitos, leucocitos polimorfonu-

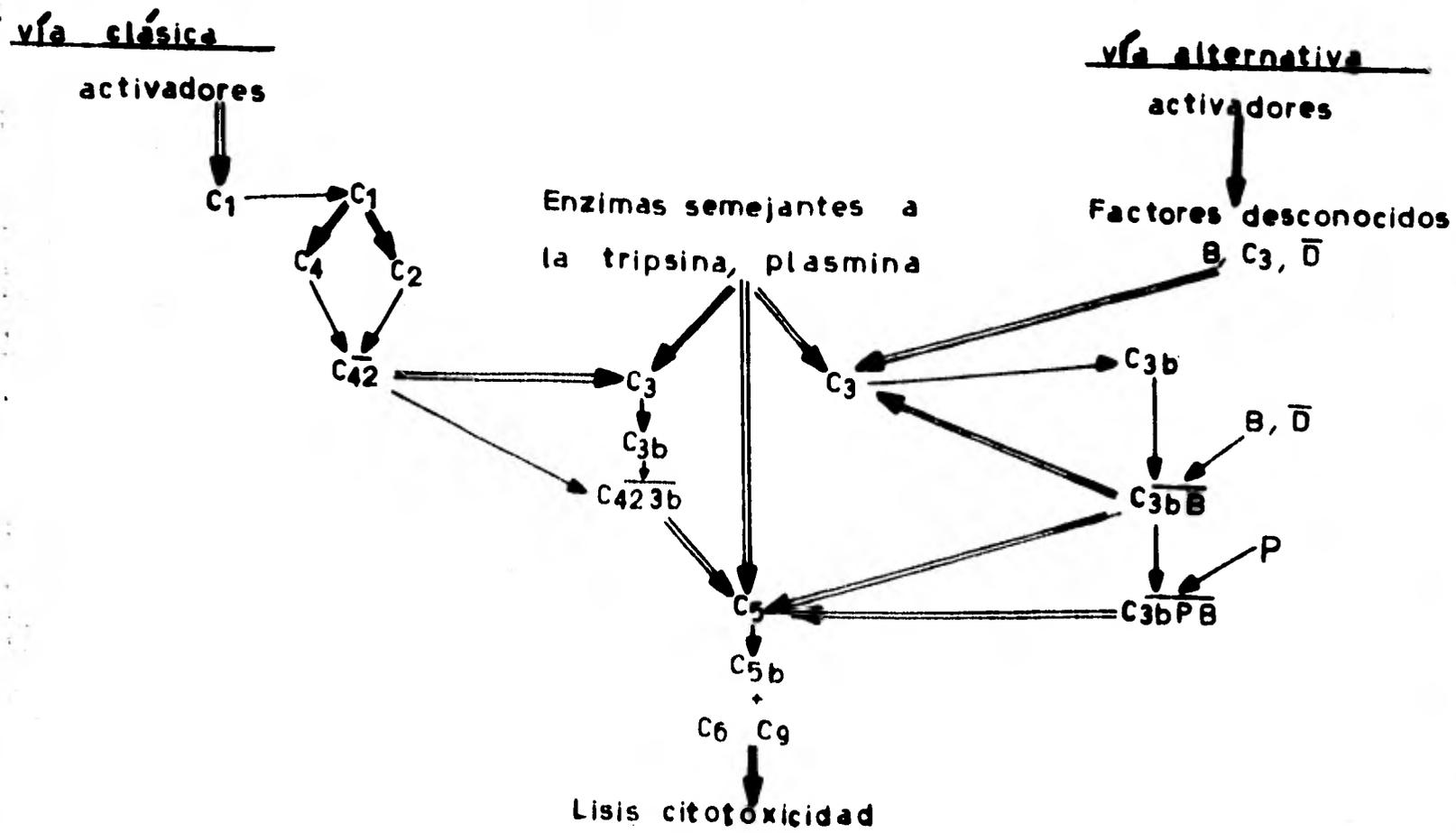


Fig. 2 . Esquema de los mecanismos de acción en cadena del sistema del complemento (C) . Vía clásica y vía alternativa (Funderberg, 1979) .

cleares y los linfocitos B tienen receptores para C_3 y Fc.

Cuando la célula efectora o reaccionante es fagocitaria, la inserción de C_3 facilita la adherencia y la ingestión intensificando así la fagocitosis. Los receptores para C_3 también se encuentran en eritrocitos humanos y en las plaquetas de varias especies animales. El significado biológico de la adherencia de C_3 en los eritrocitos humanos no es clara aunque puede ser un mecanismo inmovilizador importante al enfrentarse con agentes patógenos. En los linfocitos B, los receptores C_3 ayudan a poner a los antígenos en contacto directo con la superficie de las células potencialmente formadoras de los anticuerpos (14). Es posible que de esta manera los componentes unidos del complemento desempeñen algún papel en la inducción de una respuesta inmunitaria (43).

Los receptores para Fc y C_3 pueden alcanzar madurez funcional en lapsos de amplitud variable, limitando la capacidad funcional de la célula (se ha detectado que estos receptores tienen propiedades proteícas). El C_3 activado sobre la superficie de las bacterias sirve aparentemente como un puente entre las bacterias y el fagocito acelerando su ingestión.

Se ha demostrado que hay un distinto orden de aparición de los receptores de membrana durante la diferencia--

ción de los linfocitos T y B. También estudios hechos sobre cultivos de leucocitos de tipo leucémico y normales de médula ósea han indicado la aparición de receptores para C_3 y Fc, relacionados con el proceso de diferenciación celular (25).

Existen varias técnicas para identificar los receptores de membrana; una de ellas es la utilización de rosetas con eritrocitos de carnero más IgG para detectar los receptores Fc: así como también, al agregar el complemento se pueden registrar los receptores C_3 . Otras técnicas son la autorradiografía y la fluorescencia directa o indirecta.

La identificación de los receptores en tejidos seccionados es más difícil que la identificación de los mismos en células en suspensión; esto se debe a que existen pocas -- porciones de membrana expuestas en los tejidos seccionados, -- ocurriendo lo contrario en los tejidos en suspensión. Por esta razón, la técnica de cultivo usada juega un papel importante para la identificación de los receptores.

Los receptores de membrana representan marcadores -- potenciales para el estudio de la distribución y movilidad de los componentes de la superficie celular ya que los receptores están dispersos sobre la membrana celular. Varias evidencias indican que la interacción de microtúbulos con la membrana es un requerimiento esencial para la formación de ciertos-

componentes de la membrana como los receptores, los cuales se ha demostrado que pertenecen a las proteínas de membrana (17, 45).

Formación de rosetas en relación con receptores de membrana.- Los linfocitos humanos y los eritrocitos de carnero llegan a unirse cuando son puestos en estrecho contacto in vitro. Cuando en los linfocitos están adheridos los eritrocitos de carnero dan la apariencia de una roseta al observarlos al microscopio. El descubrimiento de este fenómeno surgió del estudio de receptores para Ag-Ac en linfocitos. Las células de borrego son usadas como antígenos o como células indicadoras de receptores de membrana, inicialmente esta técnica se usó para detectar a los linfocitos T que tienen la propiedad de fijar los eritrocitos de carnero (13).

Estudios de otras subpoblaciones de linfocitos indican que los linfocitos B también tienen receptores de membrana para formar rosetas con eritrocitos de carnero adheridos a Ig o al complemento (C_3). Para que se realice la formación de una roseta debe existir una proporción de 20-100 eritrocitos de carnero por un linfocito, considerándose como roseta cuando seis o más eritrocitos de carnero se adhieren a un linfocito (19).

Cuando las rosetas se forman utilizando únicamente-

eritrocitos; se llaman rosetas E. Cuando se utilizan eritrocitos de carneros más Ig; se llaman rosetas EA, y cuando se utilizan estos eritrocitos con Ig más complemento (C_3), se llaman rosetas EAC.

Además de los eritrocitos de carnero, existen - - otras células capaces de formar rosetas; entre éstas se encuentran, los eritrocitos de mono, los de cerdo, de perro, de caballo, de pollo, de gato, de cabra y de buey (13).

MATERIALES Y METODOS

Animales.- Se emplearon ratones de la cepa CD-1 de ambos sexos y de 6 a 8 semanas de nacidos.

Medio de cultivo.- Se utilizó medio de cultivo de Eagle (EM) (Eagle's Medium, GIBCO U.S.A.) (apendice) con 3.7-g/l de Carbonato de Sodio y antibióticos (penicilina 100 UI/ml, estreptomycin 100 mcg/ml). El medio preparado se ajustó a un pH de 7.2 y se filtró para fines estériles con filtros de membrana (Millipore U. S. A.) con un poro de 0.22 de diámetro. (rutinariamente se verifica su esterilidad) . El medio estéril se guardó en recipiente de vidrio a 4° C y antes de usarse se calentó a 37° C. En el momento de sembrar las células; el medio de cultivo consistió de EM más 10 por ciento de suero fetal (Fetal Calf Serum, GIBCO U.S.A.) previamente inactivado a 56° durante 30 min. el suero es almacenado a -20° C y calentado a 37° C antes de usarse.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).- Esta solución se utilizó para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables, dicha solución tiene en sus componentes sales de fosfatos (apendice). La solución una vez preparada se ajusta a un pH de 7.2 y se filtra con un filtro de membrana con poro de 0.22 μ (Millipore U.S.A.). El medio estéril se guardó a 4° C hasta el momento de su uso, efectuando -

previamente prueba de esterilidad.

Prueba de esterilidad.- Se utilizaron cinco gotas de las soluciones y se colocaron en tubos de ensaye conteniendo 2 ml. de caldo de soya tripticaseina (BIOXON MEX.) al 3 -- por ciento (previamente esterilizada en autoclave), incubándose estos tubos con la soya y la solución durante 48 horas a - 36° C; tiempo en el cual se verifica si hay desarrollo de microorganismos contaminantes.

Condiciones de cultivo.- La obtención y manipulación de las células; así como el uso de las diversas sustancias, se trabajaron en una campana previamente esterilizada - durante 20 minutos con luz ultravioleta y posteriormente limpiada con alcohol al 70 por ciento. Para el mantenimiento in vitro de las células de médula ósea se utilizó una incubadora a 37° C con 10 por ciento de bioxido de carbono y humedad a punto de rocío. Los recipientes utilizados fueron platos Petri desechables de 60 X 15 mm. y el sembrado de células se -- realizó utilizando pipetas, bombillas y cristalería previamente esterilizadas en autoclave. Se utilizó un microscopio invertido para la observación y determinación del estado de las células en cultivo.

Células de médula ósea.- Para obtener las células de medula ósea, se sacrificaron mediante decervicación rato--

nes de 6 a 8 semanas de nacidos a los cuales se les extrajo el fémur, colocándolo inmediatamente en platos Petri que contenían PBS. Se perforaron ambos extremos del fémur con una jeringa desechable de 1 ml. haciéndose fluir PBS de un extremo al otro colectando las células en un tubo de ensaye para posteriormente centrifugarlas a 800 g. durante 3 minutos. La cantidad de células obtenidas se determinó por conteo en hemocitómetro, sembrándose 8×10^6 células en 5 ml. de medio de cultivo (EM más 10 por ciento de suero fetal) en cajas Petri.

Suero fresco de ratón.- Esta técnica se utilizó para obtener el complemento (C_3); moléculas que intervienen en la respuesta inmune, por lo que este suero debe ser fresco. - Para su obtención se obtiene la sangre de ratones por medio de punción del plexo de la cavidad ocular (18), colectando la sangre en tubos de ensaye, se tapan estos dejándolos 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se separa el coágulo de las paredes del tubo y se coloca a 4° C durante una hora, finalmente se quita el coágulo y se centrifuga a 1,000 g. durante 15 minutos para separar el suero; el cual, se utiliza inmediatamente.

Eritrocitos con anticuerpo y complemento (EAC).- - Se utilizaron eritrocitos de carnero, los cuales se extraen de la yugular de este animal utilizando una jeringa hipodérmica

ca con anticoagulante (solución de Alsever), (apendice) estéril. La solución de Alsever con los eritrocitos se almacena durante una semana a 4° C hasta el momento de su uso.

Como primer paso se preparan los eritrocitos con un cuerpo (EA), lavándose tres veces 2 ml. de eritrocitos en una centrífuga a 800 g. durante 3 minutos (esto con el objeto de quitar el exceso de la solución de Alsever), después de la última lavada, las células se resuspenden en 4 ml. de PBS -- agregandoles un volúmen igual de IgG (CORDIS U.S.A.) el cual debe estar diluído 1:1500 en PBS, esta mezcla se incubó en baño María a 37° C durante 30 minutos, al término de este proceso los eritrocitos se encuentran unidos con los anticuerpos -- (constituyendo el EA), los cuales se lavan tres veces (en centrifuga a 800 g., 3 min.) con PBS con el objeto de eliminar -- el exceso de IgG, resuspendiéndose finalmente en 10 ml. de -- PBS y almacenando a 4° C hasta el momento de su uso.

Para preparar el EAC se tomaron 2 ml. de EA agregándoles un volúmen igual de suero fresco de ratón diluído 1:10 en PBS, esta mezcla se resuspende y se incuba en baño María a 37° C durante 30 minutos obteniéndose eritrocitos con anticuerpo y complemento (EAC), los cuales se lavan tres veces -- (para quitar el exceso de suero de ratón) y se resuspenden en 10 ml. de PBS conservándose a 4° C un tiempo máximo de dos --

días (2, 7, 19).

Medio condicionado de pulmón (MCP)..- Este medio se utilizó como sustancia inductora de los receptores C_3 en células de médula ósea de ratón, para su obtención se inyectaron a ratones por vía intravenosa un volúmen de 0.2 ml. de lipopolisacáridos (LPS) de Salmonella typhimurium (SIGMA U.S.A) en una dilución de 20 microgramos por mililitro, después de un tiempo de 4 horas se sacrificaron los animales por decervicación se les extirparon los pulmones colocándolos en tubos de ensaye con 5 ml. de EM incubándose durante 48 horas. Para la obtención del MCP se separaron los pulmones mediante centrifugación a 1,000 g. durante 15 minutos, posteriormente el MCP se esterilizó mediante un filtro (Millipore U.S.A.) de membrana con un poro de 0.22 μ . Rutinariamente se efectuó prueba de esterilidad en caldo de soya y se conservó a -20° C hasta el momento de emplearse.

Determinación de los receptores de membrana por formación de rosetas con EAC..- Antes de incubar las células de médula ósea de ratón, se les agregó MCP para inducir la formación de sitios receptores para C_3 . Después de la incubación se colocan las células en tubos para centrífuga con el objeto de lavarse (tres veces) con PBS, centrifugándolas a 800 g. durante 3 minutos. Se resuspenden en 1 ml. de PBS agregándoles-

0.20 ml. de EAC, se incubó por 30 minutos a 37° C sin resuspender las células, de tal manera que quedan 50 células EAC por una célula de médula ósea. Posteriormente se dispersan suavemente las células, contándose el porcentaje de células que han formado un conglomerado con el EAC (llamado roseta) - utilizando para este conteo un hemocitómetro (Neubauer U.S.A.). Como criterio para considerar un conglomerado de células como roseta, se estableció que se requieren un mínimo de 6 eritrocitos (EAC) unidos a una célula de médula ósea.

Cromatografía (apendice). - Se cromatografiaron 3 ml de MCP en una columna de 2.6 X 100 cm. (K26/100 Pharmacia Fine Chemicals) empacada con Sephadex G-50 para pesos moleculares de 1,500 a 30,000 daltones, observándose que la actividad de la molécula inductora para sitios receptores C_3 (C_3 (R_3 RI) se encontraba en el volumen de exclusión, en consecuencia se procedió a cromatografiar el mismo volumen de MCP en otra columna de 1.6 X 80 cm (K16/80 Pharmacia Fine Chemicals) empacada con Sephadex G-75 para pesos moleculares de 3,000 a 70,000 daltones. Como se verá posteriormente, en esta ocasión no hubo actividad del C_3 RI volumen de exclusión sino en el Volumen que fue cromatografiado. Este hecho nos indicó que el peso molecular del C_3 RI era mayor de 30,000 daltones que es el Corte del Sephadex G-50.

La cromatografía en la columna con **Sephadex G-75** se realizó a 4° C eluyendo la columna con solución amortiguadora de TRIS-HCl 75 mM con un pH de 7.7 y a una velocidad de 4 cm/hora dada por una bomba peristáltica. Las fracciones colectadas fueron de 2 ml. en cada tubo de ensaye, los cuales fueron almacenados a -20° C hasta su utilización.

Inicialmente la columna con Sephadex G-75 se calibró con proteínas de peso molecular conocido diluídas en 3 ml. de la misma solución amortiguadora con que se corrió el MCP, dichas proteínas fueron; 4 mg. de hemoglobina de conejo molecular de 67,500 daltones, 5 mg. de Ovoalbumina de pollo con peso molecular de 46,000 daltones, 5 mg de Mioglobulina de caballo con peso molecular de 18,800 daltones, 5 mg de lizosima con peso molecular de 14,000 daltones y azul de extrano usado como indicador. Por medio de esta técnica se pudo determinar por interpolación el peso molecular del C₃RI.

Electroenfoque (Apendice).- Por este procedimiento se determinó el pH isoeléctrico de la molécula de C₃RI mediante el siguiente procedimiento: 20 ml. de MCP fueron desalinizados por medio de una columna de 2.6 X 100 cm. (K 26/100 - - Pharmacia fine Chemicals) empacada con Sephadex G-50. Se obtuvo finalmente un volumen de exclusión de 87 ml, este MCP ya desalinizado se mezcló con 6 ml. de anfolinas (Pharmacia Fine

Chemicals) con un rango de pH de 3 - 10. Como marcador interno se agregó a la mezcla anterior 5 Ug. de hemoglobina, posteriormente se añadieron 8 g. de Ultrodex (gel para electroenfoque, Pharmacia Fine Chemicals) formándose una sustancia pastosa, a la cual se le extrajeron los gases formados en su interior mediante una bomba de vacío. La mezcla anterior se esparce sobre una charola de vidrio de 5 X 125 X 260 mm. y para proporcionarle una consistencia adecuada se esparcen en pequeñas cantidades de Ultrodex en polvo de manera que al poner la placa inclinada con un ángulo de 45° no se corra el gel.

En los extremos de la charola se extraen tiras de gel de 5 X 10 X 125 mm, colocando en estos lugares tiras de papel para electroenfoque humedecidas previamente en soluciones extremas de pH (una tira de papel se humedece en ácido sulfúrico 0.1 M, colocándose en el ánodo, la otra se humedece en etilen-díamina 1 M colocándose en el cátodo). La charola preparada para el electroenfoque se coloca en la superficie de la cámara de enfriamiento del Multifor (LKB 2117 - 501 KIT U.S.A.) la cual se encuentra a 4° C, posteriormente se coloca la tapa del Multifor de tal manera que los electrodos de ésta entren en contacto con las tiras de papel humedecido que se colocaron en los extremos de la misma. Para realizar el elec-

troenfoque se aplican 45 Watts durante 5 horas, tiempo suficiente para que la hemoglobina forme varias bandas finas y rectas. El perfil proteínico se determina mediante la aplicación sobre el gel de un papel filtro durante 1 minuto, posteriormente se retira el papel y se deja secar para lavarlo con ácido tricloro acético al 10 por ciento con el objeto de precipitar las anfólicas, el lavado se hace tres veces de 15 minutos cada uno. En seguida se tiñe con azul de comassie R250- y se lava con una mezcla de metanol-agua-ácido acético en una proporción de 50:50:10 respectivamente.

Finalmente el gel se corta en 30 fracciones mediante una plantilla especial, midiendo a cada una de estas fracciones el pH a 4° C, después de lo cual se extraen las muestras utilizando 2 ml. de PBS. Las fracciones así obtenidas se guardan a -20° C hasta su utilización.

Susceptibilidad del C₃RI a la acción enzimática de la tripsina y al efecto de la temperatura.- La fracción de mayor actividad de C₃RI que se obtuvo de la columna de Sephadex G-75, se sometió a una temperatura de 60° C durante 30 minutos con el objeto de comprobar su termolabilidad. Así también con el objeto de comprobar si la tripsina (Sigma Chemical Co U.S.A.) degrada o no a dicha molécula, el C₃RI se sometió a la acción enzimática de ésta durante 30 minutos a tem-

peratura ambiente parando la reacción enzimática con inhibidor de tripsina.

Confiabilidad de resultados.- Todos los experimentos realizados en este trabajo, fueron efectuados un mínimo de dos veces y cada una de estas por duplicado. Cada experimento se realizó independientemente uno de otro y el número de veces necesarias para obtener un máximo de 10 por ciento de error.

RESULTADOS

La titulación de actividad de la molécula C_3RI existente en el MCP, se efectuó mediante la determinación de inducción de receptores C_3 en células de médula ósea utilizando la técnica de rosetas con EAC.

Como primer punto, la determinación se hizo en función de los días en que se mantuvieron las células en cultivo, para este objeto se agregó a las cajas de cultivo 1.00 ml. de MCP. Se determinó la inducción de C_3RI a los 0, 1, 2, 4 y 8 días de incubación y como control se sembraron células sin MCP. En la figura 3 se representan estos resultados, observándose que en la ausencia de MCP el porcentaje de rosetas se mantiene constante en el transcurso de los días de cultivo. En el otro caso, cuando se usó el MCP los resultados indican que el porcentaje de rosetas sube de 15% en el día cero hasta alcanzar un 36% en el día 4 en el cual se alcanza la actividad máxima. Esta actividad de C_3RI desciende a los 8 días en el cual se obtiene un porcentaje de rosetas parecido al inicial.

La actividad del C_3RI también se determinó en función de la cantidad en ml. de MCP indispensable para inducir la aparición de receptores de membrana para C_3 , utilizando 0.000, 0.030, 0.060, 0.250, 0.500, 1.000, 1.500, y 2.000 y 2.50 ml.

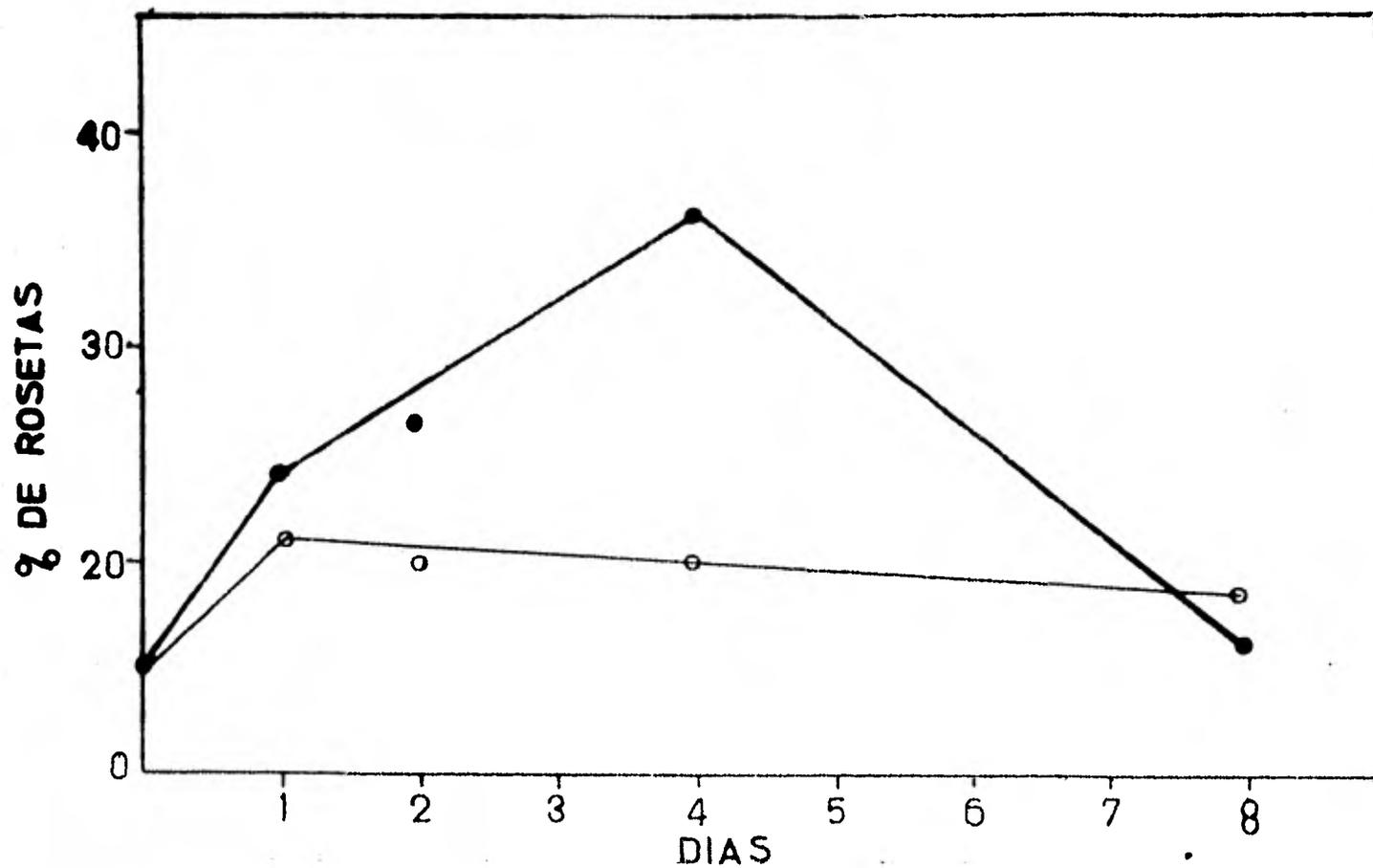


Fig. 3 . Determinación del tiempo de aparición de la molécula C_3RI . Formación de rosetas con MCP (●) y sin MCP (○) .

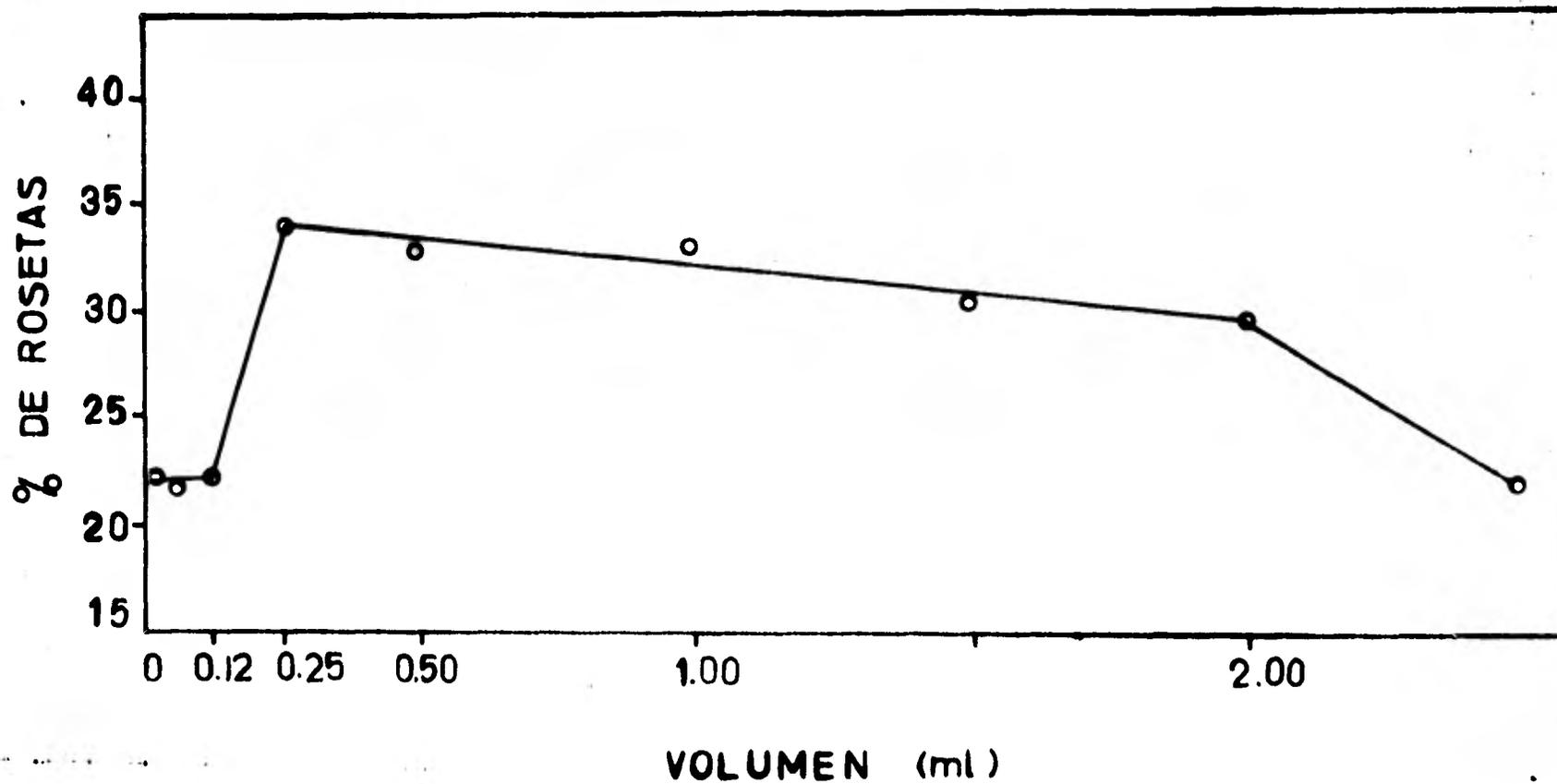


Fig. 4 . Obtención del volumen óptimo de MCP para la aparición de C_2RI . Formación de rosetas (O) .

MCP en platos de cultivo de 60 X 15 mm. y con un volumen final de 5 ml. de medio de Eagle. La actividad de inducción a receptores se manifestó a partir de un volumen de 0.250 ml. manteniéndose constante hasta decrecer a partir de los 2.00 ml. (Fig. 4), manifestándose respectivamente un 34 y un 23 por ciento de rosetas.

DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DEL C_3 RI MEDIANTE-CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-75.

Con el objeto de obtener el peso molecular del C_3 RI responsable de la inducción de sitios receptores C_3 ; se cromatografiaron 3 ml. de MCP en una columna con Sephadex G-75 tal y como se describe en materiales y métodos. Se recolectaron 80 fracciones de 2 ml. cada una, las cuales se leyeron en el espectrofotómetro para posteriormente agregarlas a células en cultivo y hacerles la técnica de rosetas a los cuatro días, así como también se les procesó para determinar la aparición de colonias de macrófagos y granulocitos en agar. En la figura 5 se observan tres picos; el primero de izquierda a derecha corresponde al volumen de exclusión que fue leído en el espectrofotómetro a 280 nm. de absorbancia para determinar el perfil proteínico. El segundo pico corresponde a las fracciones cromatografiadas en donde se encuentra la actividad de C_3 RI detectada por la técnica de rosetas con EAC. Y-

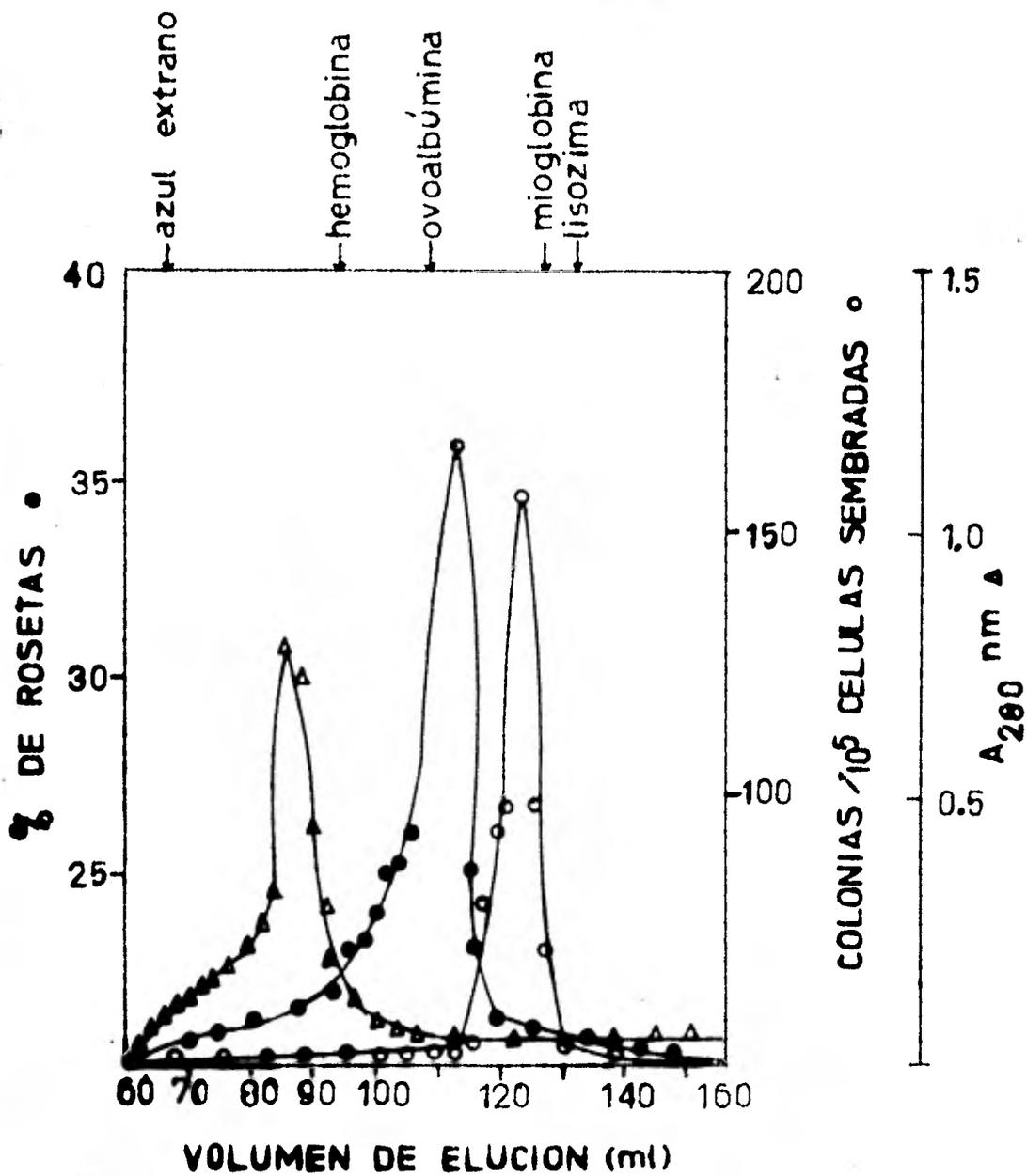


Fig. 5. Cromatografía en Sephadex G-75 y determinación de colonias en agar. Absorbancia a 280 nm (▲), Formación de colonias en agar (○), Formación de rosetas (●).

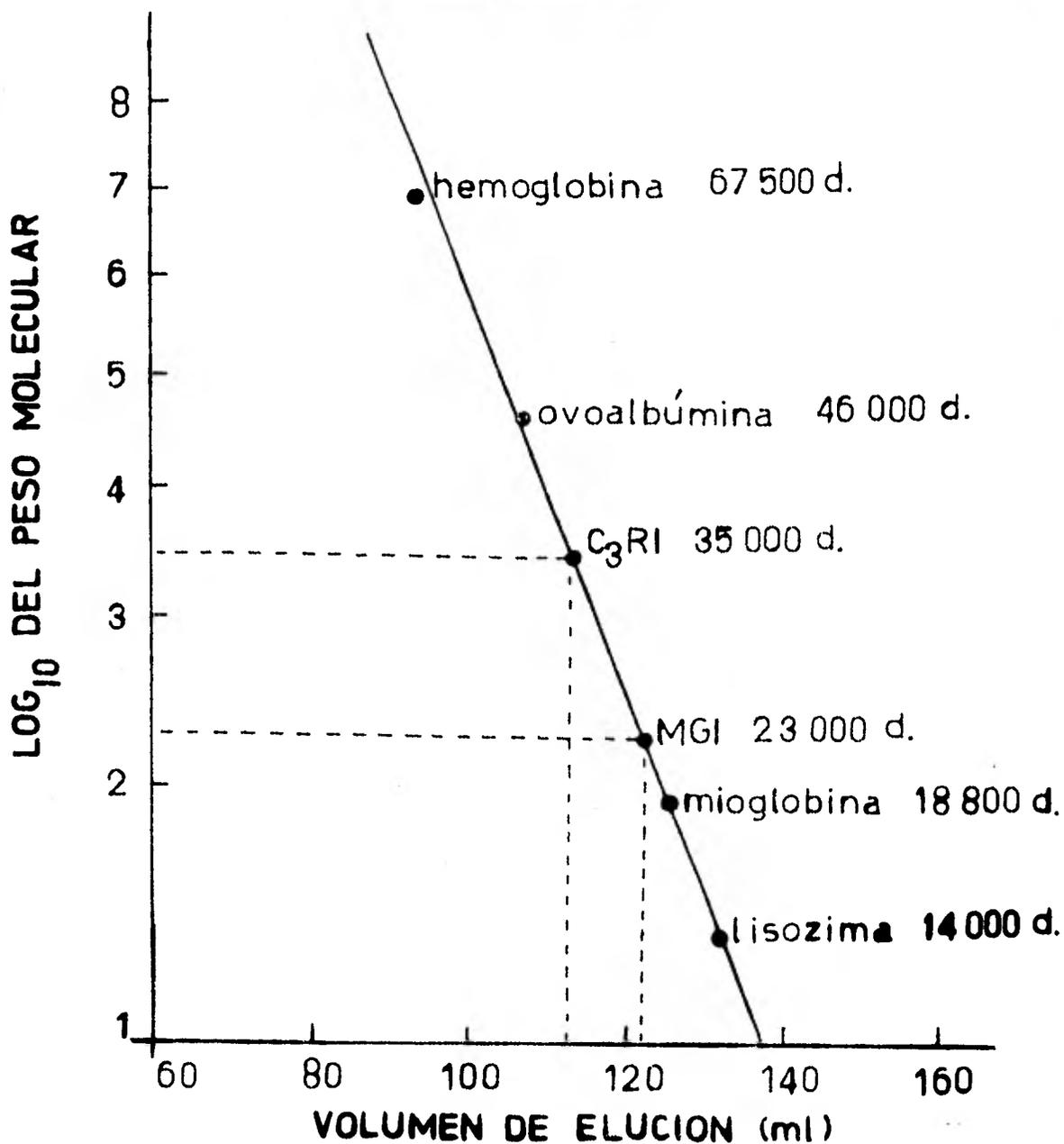


Fig. 6 . Calibración para la determinación del peso molecular del C₃RI, empleando varias sustancias de PM conocido. De la misma manera se procedió a determinar el PM del MGI .

por último el tercer pico corresponde a las fracciones en donde se encuentra la actividad de formación de colonias de granulocitos y macrófagos desarrolladas en agar (MGI).

La columna de Sephadex G-75 fue inicialmente calibrada con varias proteínas de peso molecular conocido, esto con el objeto de tomar puntos de referencia y así poder determinar el peso molecular del C_3RI y del MGI (ó CSF). De ésta calibración se encontró un peso de 35,000 daltones para el C_3RI y de 22,000 daltones para el MGI (Fig. 6.).

DETERMINACION DEL pH ISOELECTRICO DEL C_3RI

Para determinar el pH isoelectrico del C_3RI , se utilizó la técnica de electroenfoque en placa con Ultrodez y anfolinas de rango de pH conocido (ver materiales y métodos). Se colocaron 20 ml. de MCP previamente desalinizados en una columna de Sephadex G-50. Como resultado se obtuvo que la actividad para la formación de rosetas con EAC estaba exclusivamente en la fracción No. 5 del electroenfoque, dando para el C_3RI un pH isoelectrico de 3.9, mientras que el MGI daba un pH isoelectrico de 6.6 (Fig. 7).

SUSCEPTIBILIDAD DEL C_3RI A LA ACCION ENZIMATICA DE LA TRIPSINA Y AL EFECTO DE LA TEMPERATURA.

La fracción con actividad de C_3RI proveniente del electroenfoque en Ultrodex (Fig. 7) fue usada para determinar

la termolabilidad del factor (C_3RI) así como la acción proteolítica sobre éste de la tripsina. Para determinar la acción proteolítica de la tripsina (SIGMA U.S.A.), se agregó ésta en una cantidad de 1 mg/ml. a la molécula C_3RI en un tubo de ensaye durante 30 minutos a $37^\circ C$, al término de este tiempo se adicionó inhibidor de tripsina (SIGMA U.S.A.) en una cantidad de 1 mg/ml, en un segundo tubo con C_3RI se le adicionó una mezcla de tripsina con inhibidor de tripsina (1 mg/ml. de cada una) manteniéndose igualmente 30 minutos a $37^\circ C$. Asimismo se incluyó como control positivo un tubo sin tratamiento, es decir, únicamente con C_3RI . Después del tratamiento los volúmenes de los tubos de ensaye se colocaron en igual número de cajas de cultivo con células de médula ósea efectuando la incubación por cuatro días para posteriormente hacerles la técnica de rosetas con EAC.

A esta misma fracción con actividad de C_3RI se le sometió a una temperatura de $60^\circ C$ durante 30 minutos. Obteniéndose que el C_3RI fué desactivado por esta temperatura.

Los resultados indican que la molécula C_3RI es desactivada por la tripsina y por la temperatura elevada, lo cual indica que posee características proteicas (TABLA 1).

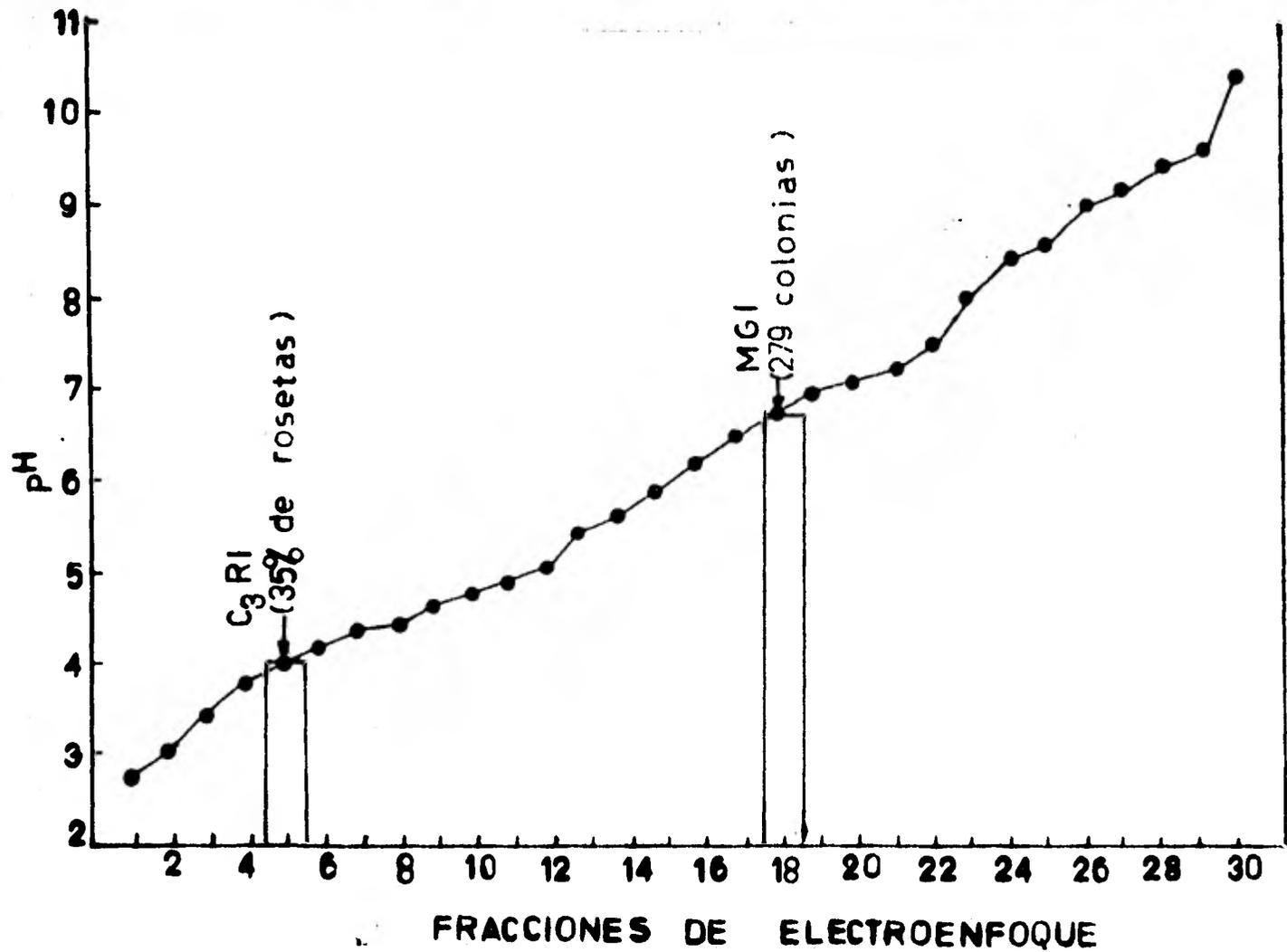


Fig. 7 . Determinación del pH isoeléctrico del C₃RI y del MGI.

TABLA 1

| TERMOLABILIDAD Y SENSIBILIDAD A LA TRIPSINA DEL C ₃ RI | | | | | |
|---|-------------------------------------|--------------------------------------|---------|-------------------------------|----|
| CONTROL SIN C ₃ RI | TRATAMIENTO DEL C ₃ RI | | | CONTROL CON C ₃ RI | |
| | TEMPERATURA DE 60°C DURANTE 30 MIN. | ACCION PROTEOLITICA DE LA TRIPSINA + | | | |
| | | ANTES | DESPUES | | |
| % DE ROSETAS | 19 | 22 | 37 | 23 | 34 |

Tabla 1 . La molécula C₃RI fue sometida a la sensibilidad de la tripsina y a la acción de la temperatura.

+ El inhibidor de tripsina fue agregado antes y después de los 30 min de la acción proteolítica de la tripsina a 37°C.

DISCUSION

La técnica de cultivo de tejidos es de gran ayuda - para el estudio de los procesos de diferenciación celular in-vitro, así como las sustancias moleculares que intervienen - en este proceso. Una de estas sustancias es la conocida como MGI, la cual interviene en la diferenciación y proliferación- de las células mieloides. El MGI es una molécula glucoproteí- cas y termolábil que es producida en forma normal por varios- tejidos del cuerpo entre los que se encuentran los pulmones.- El peso molecular del MGI varía enormemente, dependiendo de - su fuente de obtención; así tenemos que el peso molecular del MGI proveniente de los pulmones de ratón es de 23,000 dalto-- nes.

El MGI también se puede inducir de manera artifi- - cial con el objeto de obtener grandes cantidades de esta subg- tancia; tal es el caso al utilizar lipopolisacáridos de pare- des celulares de Salmonella typhymurium (LPS) como estimulan- te, inyectado por vía intravenosa a ratones obteniendo así el medio condicionado de pulmón (MCP) de ratón con característi- cas de MGI.

Se sabe que el MGI induce la diferenciación de ma-- crófagos y granulocitos hacia células maduras. Sin embargo en un trabajo previo se demostró que el MGI parcialmente purifi-

cado induce a la formación de células morfológicamente maduras pero sin receptores para Fc; demostrándose que existe una molécula diferente al MGI que es la inductora a la formación de receptores Fc en células de médula ósea (FcRI).

En el presente trabajo se evidencia la incapacidad del MGI para la inducción de receptores para C_3 en células de médula ósea. Encontrándose una molécula purificada parcialmente por cromatografía y electroenfoque; con un peso molecular de 35,000 daltones y un pH isoeléctrico de 3.9, la cual tiene la propiedad de inducir la aparición de los receptores C_3 y para la cual se propone el nombre de C_3 RI (C_3 Receptor Inductor).

A partir de los resultados anteriormente citados -- se cree tener evidencia para asegurar que el MGI induce a la formación de células morfológicamente maduras, mientras que para la inducción a la diferenciación hacia células funcionalmente maduras se necesita de varios factores inductores tales como el FcRI y el C_3 RI.

Al efectuar la técnica de bicapa en agar para verificar la aparición de formación de colonias a partir de precursores mieloides se encontró que el C_3 RI no tiene esta actividad, lo cual demostró la independencia de este factor con el MGI ya que mediante dos técnicas diferentes; cromatografía

por peso molecular en Sephadex y por enfoque isoeléctrico en Ultrodex, se obtuvieron picos con actividad para estos factores completamente separados.

La molécula de C_3RI perdió su propiedad inductora - al ser tratada con tripsina y al ser sometida a una temperatura de $60^\circ C$, previamente al ensayo biológico, en consecuencia se cree que el C_3RI es una molécula de naturaleza proteica.

Durante la determinación de las condiciones óptimas para la obtención y ensayo del C_3RI , se encontró que después de 4 días de cultivo, la cantidad de este factor en el medio de cultivo decrecía hasta desaparecer por completo a los 8 -- días de cultivo, de igual manera al aumentar la concentración óptima del MCP (la cual fué del 5 por ciento) en el ensayo -- biológico, disminuía la formación de receptores C_3 hasta desa parecer por completo al llegar a un 50 por ciento del MCP. Es tos resultados nos indican que a partir del cuarto día de incubación, la inducción a la formación de receptores C_3 sufre un fenómeno inhibitor el cual puede ser debido a la existen-- cia de un factor supresor a la aparición de los receptores C_3 de igual manera el efecto inhibitor del 50 por ciento de MCP-- nos indica la posible existencia de elementos tóxicos en el - ensayo biológico. Sería interesante el estudiar los factores-- inhibidores a la formación de receptores C_3 en leucocitos, pa

ra de esta forma entender el mecanismo de regulación existente en las células para la aparición de estos receptores.

Por último considero que se debería intentar la purificación total del C_3RI con la finalidad de estudiar a nivel celular de inducción a la formación de receptores C_3 en precursores mieloides con el fin de determinar su posible aplicación terapéutica en enfermedades en las cuales sea necesario elevar el número de receptores para C_3 . Así también sería recomendable determinar la posible existencia del C_3RI y sus propiedades moleculares en otros medios condicionados y en diferentes organismos para verificar su existencia en todos ellos y si al igual que el MGI tiene pesos moleculares diferentes según el medio de que se trate.

LITERATURA CITADA

- 1.- Gotze, O. Muller-Eberhard, H.J. (1971). The C₃ activator system an alternate pathway of complement activation. J. Exp. Med. 134:90-98.
- 2.- Fundenberg, H. (1979). Manual de Inmunología Clínica. El Manual Moderno. México. p 14-73.
- 3.- Eaves, A. and Bruce, W. (1973). In vitro production of colony stimulating activity: I. exposure of mouse peritoneal cells to endotoxin. Cell tissue Kinet 7:19-27.
- 4.- Price, G. Krostrup, R. Stewart, S. and Sen J. (1978). Heterogeneity of Colony Stimulating Activities. In Hematopoietic Cell Differentiation. Academic Press. New York. p 214-241.
- 5.- Burges, A. Camakaris, J. and Metcalf, D. (1976). Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung conditioned medium. J. Biol. Chem. 252:1998--2008.
- 6.- Cline, M. Rothmann, B. and Golde, D. (1974). Effect of endotoxin on the production of colony stimulating factor - by human monocyte and macrophage. J. Cell Physiol, 84: -193-201.
- 7.- Lotem, J. and Sachs, L. (1974). Different blocks in the differentiation of myeloid leukemic cell. Proc. Natl. -- Acad. Sci. 71:3507-3516.
- 8.- Ohono, T. Sehi, M. and Shikita, M. (1978). Colony stimulating factor active on human bone marrow cells from a Yoshida sarcoma cell line. Blood 51:5-14.
- 9.- Maxwell, W. Lee, R. Bithell, T. Athens, J. and Forster, -

- J. (1975). Clinical Hematology. 7 ed. Lea Febiger. Philadelphia. p 97-136.
- 10.- Cells, P. and Combs G. (1977). Clinical Aspects of Immunology. Blackwell. Oxford. p 33-48.
- 11.- De Robertis, E. D. (1976). Biología Celular y Molecular. El Ateneo. México. p 10-143.
- 12.- Brent, L. and Holborow, J. (1975). Progress in Immunology. North-Holland Publishing Co. New York p 56-78.
- 13.- Blom, B. and David. R. (1976). In vitro Methods in Cell-Mediated and Tumor Immunity. Academic Press. New York. - p 71-587.
- 14.- Rabelino, E. and Metcalf, D. (1975). Receptors for C₃ -- and IgG on macrophage, neutrophil and eosinophil colony-cell grown in vitro. J. Immunology. 155:668-709.
- 15.- Lehninger, A. (1976). Biochemistry. 2a. ed. Worth. New York. p 157-163.
- 16.- Anders. W. and Hilary, J. (1976). Preparative flat-bed - electrofocusing in granulated gel with the LKB 2117 Multiphor. Application Note. 198:217-221.
- 17.- Nelson, S. D. (1976). Immunology of the Macrophage. Academic Press. New York. p 617-675.
- 18.- Weir, D. M. (1978). Application of Immunological Methods. Handbook of Experimental Immunology. Blackwell Scientific Publications. London. p 273-285.
- 19.- Bianco, D. Patrick, R. and Nussinz. W. (1970). A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for an -

- tigen-antibody-complement complexes. J. Exp. Med. 132: - 702-711.
- 20.- Paul, J. (1973). Cell and Tissue Culture. 4a. ed. Churchill Livingstone. London p 14-79.
- 21.- Fischer, L. (1975). Introducción a la Cromatografía en Gel. El Manual Moderno. México. p 1+36.
- 22.- Osler, A. G. and Sandberg, A. L. (1973). Alternate complement Pathways. Prog. Allergy. 17:51-58.
- 23.- Porter, R. R. (1976). La estructura de los anticuerpos - Scientific American. ed. Blume. España. p 341-349.
- 24.- Wessells, K. and Rutter, J. (1969). Fases de la diferenciación celular. Scientific American. ed. Blume España - p 332-340.
- 25.- Czop, K. and Austen F. (1980). Functional Discrimination by human monocytes between their C_3 receptors. J. Immunology. 1251: 124-135.
- 26.- Carrel, A. Harrison, J. Hugles, A. (1959). History of Cytology. Abelard Schuman. London p 11-37.
- 27.- Needham, J. (1942). Biochemistry and Morphogenesis. Cambridge University Press. London. p 117-128.
- 28.- Metcalf, D. and Moore, M. (1971). Hematopoietic Cells. - Noth Holland Publishing Co. Amsterdam. p 15-34.
- 29.- Luriya, E. (1977). Hematopoietic and Lymphoid Tissue in Culture. Consultants Bureau. New York. p 44-61.

- 30.- Parker, P. C. (1961). Methods of Tissue Culture. 3 ed. - Paul B. Hoeber. New York. p 10-29.
- 31.- Steward, C. and Lin, H. (1978). Macrophage grow factor - and its relationship to colony stimulating factor. J. Reticuloendothel soc. 4: 269-281.
- 32.- Laudel, H. Gasel, W. Doch, M. Haverman, K. (1978). Preparation of colony stimulating activity from large batches of human urine and production of antisera against its. - J. Cell Physiol. 94: 21-37.
- 33.- Sheridan, J. Metcalf, D. and Stanley, E. (1974). Further studies on factor in lung conditioned medium stimulating granulocyte and monocyte colony formation in vitro. J. - Cell Physiol. 84: 147-159.
- 34.† Grobstein, C. (1967). Mechanisms of organogenetic tissue interaction. Nat. Cancer Inst. Monogr. 26: 279-285.
- 35.- Gurdon, J. B. (1968). Nucleic acid synthesis in embryos - and its bearing on cell differentiation. Assay Biochem. 4: 26-32.
- 36.- Swift, H. (1962). Molecular Control of Cellular Activity. Mc Graw Hill Brook Co. New York. p 213-234.
- 37.- Ming Chi Wu and Cini, J. (1979). Purification of a colony stimulating factor from culture pancreatic carcinoma - cells. J. of Biol. Chem. 254: 14-24.
- 38.- Burges, A. and Metcalf, D. (1976). Purification and Characterization of Cell Specific Colony Stimulating Factor. Academic Press. New York. p 7-21.
- 39.- McGhee, R. Kiyono, H. and Michalek, M. (1980). Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response. J. -

Immunology. 1244: 1603-1609.

- 40.- Stein, H. and Moore, S. (1951). Chromatography. Scientific American. 184:3.
- 41.- Broxmeyer, E. Ralph. P. Bognacki. J. Kincaide. W. and De-sousa, M. (1980). Inhibiting of granulocyte-macrophage - colony (MGI) stimulatory activities. J. Immunology. 12-52: 903-913.
- 42.- Griffin, D. F. (1981). Activation of murine B lymphocytes with LPS. J. Immunology. 1262: 1186-1194.
- 43.- Hu, V. Esser, A. Podack. E. and Wisnieski, B. (1981). - The membrane attack mechanism of complement. J. Immunology. 1271: 380-393.
- 44.- Apte, R. Hertogs. Ch. and Pluznik, D. (1980). Regulation of LPS induced granulopoiesis and macrophage formation by spleen cells. J. Immunology. 1243: 1223-1234.
- 45.- Schmitt, M. Mussel, H. and Dierich, M. (1981). Qualitative and quantitative assessment of C₃ receptor reactivities on Lymphoid and phagocytic cell. J. Immunology - 1261: 2042-2050 .
- 46.- Moore, R. Oppenheim, J. Farrar, J. Carter, Ch. and Shad-duck R. (1960). Production of Lymphocyte activating -- factor by macrophage activated with colony stimulating-factor. J. Immunology. 1253: 1302-1313.
- 47.- Scher, I. Bernig, A. Kessler, S. and Finkelman, F. (19-80). Development of B lymphocytes in mouse. J. Immunology. 1254: 1688-1695.
- 48.- Du Pasquier, L. (1973). Ontogeny of the immune response in coldblooded vertebrates. Curr Top Microbiol Immunol 61: 37-48.

APENDICES
MEDIO DE EAGLE

CONCENTRACIONES

| | Miligramos por 1000 ml. de H ₂ O | Equivalente aprox. en - milimoles. |
|------------------------|--|--|
| Arginina | 105 | 0.6 |
| Cisteína | 24 | 0.2 |
| Histidina | 31 | 0.2 |
| Isoleucina | 52 | 0.4 |
| Leucina | 52 | 0.4 |
| Lisina | 58 | 0.4 |
| Metionina | 15 | 0.1 |
| Fenilalanina | 32 | 0.2 |
| Treonina | 48 | 0.4 |
| Triptófano | 10 | 0.05 |
| Tirosina | 36 | 0.2 |
| Valina | 46 | 0.4 |
| Glutamina | 292 | 2.0 |
| Colina | 1 | |
| Ac. Nicotínico | 1 | |
| Ac. Pantoténico | 1 | |
| Piridoxal | 1 | |
| Riboflavina | 0.1 | |

| | |
|---|-------|
| Tiamina | 1 |
| Inositol | 2 |
| Ac. Fólico | 1 |
| Glucosa | 2,000 |
| NaCl | 8,000 |
| KCl | 400 |
| CaCl | 140 |
| Mg SO ₄ . 7 H ₂ O | 100 |
| Mg Cl ₂ . 6 H ₂ O | 100 |
| Na ₂ HPO ₄ . 2 H ₂ O | 60 |
| KH ₂ PO ₄ | 60 |
| Na HCO ₃ | 350 |
| Rojo Fenol | 20 |
| Penicilina | 0.5 |

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS)

Con el objeto de contar con una solución amortiguadora para el mantenimiento de las células, se utilizó la solución amortiguadora de fosfatos (PBS) la cual contiene los siguientes elementos en 1000 ml. de agua destilada.

| | | |
|------|---|---|
| 8.0 | g | NaCl |
| 0.2 | g | KCl |
| 0.2 | g | KH_2PO_4 |
| 0.1 | g | CaCl |
| 0.1 | g | $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ |
| 2.16 | g | $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ |

El CaCl y el MgCl se diluyen por separado en 100 ml. de agua destilada. Los componentes restantes se diluyen en 800 ml. de agua destilada, agregando al final poco a poco los 100-ml. que se prepararon inicialmente. Se afora a 1000 ml. y se esteriliza por medio de un filtro de membrana (Millipor U.S.A.) con un poro de 0.24 μ . Se hace prueba de esterilidad en solución de soya. Se guarda en refrigeración a 4° C hasta el momento de su uso.

SOLUCION DE ALSEVER

Esta es una solución amortiguadora para mantener -- los eritrocitos de carnero en condiciones normales in vitro - durante largo tiempo (5 semanas). La forma en que se prepara es la siguiente:

| | |
|----------|-----------------------------|
| 20.50 g. | $C_6H_{12}O_6$ |
| 8.00 g. | $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ |
| 0.55 g. | $H_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$ |
| 4.20 g. | Na Cl |

Se disuelven las substancias en un litro de agua y se esteriliza en autoclave, ajustando el pH a 6.1 Se efectúa prueba de esterilidad en caldo de soya.

CROMATOGRAFIA

La cromatografía en columna es fácil de llevar a cabo, desde el punto de vista técnico ya que es notablemente insensible a la composición del eluyente y a la temperatura, pudiéndose tratar en esta forma compuestos muy lábiles con pocas posibilidades de que se destruyan pues tampoco produce desnaturalización. Fracciona substancias de muy alto peso molecular dependiendo del tipo de gel que se use, determinando de esta manera el peso molecular de macromoléculas. También se usa para la desalación de substancias proteícas.

El gel usado (en este caso Sephadex) es bastante estable y se puede utilizar durante años sin que cambien sus propiedades cromatográficas, siempre que se evite que se desarrollen algún tipo de microorganismos contaminantes.

Mediante la cromatografía en gel de Shephadex se separan las substancias de acuerdo con su tamaño molecular: las moléculas grandes emergen primero de la columna, mientras que las moléculas pequeñas son retardadas, esto es debido a que las moléculas grandes no pueden penetrar los enlaces cruzados que constituyen un armazón tridimensional en cada una de las partículas del gel. Las moléculas pequeñas acceden a todos los espacios entre las cadenas de la matriz del gel y por lo tanto, estarán distribuidas igualmente entre el líquido libre y-

el líquido en el Shephadex, lo que origina que las moléculas-pequeñas permanezcan estacionarias en el gel y viajen a menor velocidad siendo arrastradas por el líquido que se hace fluir a través del medio cromatográfico (15,21,40).

ELECTROENFOQUE

Esta técnica saca partido de la migración de iones en un campo eléctrico. Cuando se hace pasar una corriente continua entre dos electrodos en un medio con iones, los iones negativos (aniones) se mueven hacia el electrodo positivo (ánodo), mientras que los iones positivos (cationes) se mueven hacia el electrodo negativo (cátodo). La velocidad de migración de un ion dependerá entre otras cosas, del tamaño de la carga que lleva y de la magnitud de la corriente empleada. En el electroenfoque se utiliza una matriz sólida de gel (de Ultrodex) material que es hidratado y poroso, pero que posee rigidez mecánica. La matriz sólida impide la convección y las alteraciones por vibración. No se necesita un sistema óptico complicado para poner de manifiesto la posición de las proteínas, ya que pueden detectarse fácilmente por medio de ensayos coloreados cualitativos. En esta técnica la mezcla problema de proteínas se encuentra sometida simultáneamente a un campo eléctrico y a un gradiente de pH en el gel dado por una serie de anfólinas de pH conocido. Las proteínas se separan en bandas de acuerdo con su carga eléctrica y su pH, permitiendo realizar análisis de gran resolución con cantidades mínimas de mezclas complejas de proteínas (15, 16).

AGRADECIMIENTO

Deseo dar las gracias al Dr. Benny Weiss, del laboratorio de Diferenciación Celular de la ENEP-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 ENEP-Zaragoza por su colaboración en todo lo relacionado con la parte bioquímica del trabajo.

También expreso mi agradecimiento a la Dra. Luz María López de la Rosa, al Biol. Marco Antonio Martínez Avila, a la Dra. Regla María Aroche Alfonso y a la Biol. Leonor Peralta Zamora por la revisión del manuscrito y sus útiles observaciones.

Finalmente agradezco a la Biol. Gloria Cabrera y al QFB Gerardo Waldo por su cooperación en la purificación de la molécula C_3RI y a todas las personas que trabajan y colaboran en los laboratorios antes mencionados.