

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



PURIFICACION DE LA FITOHEMAGLUTININA P

CARLOS ZAMAYOA ZAVALA

381

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

MEXICO, D. F.

1 9 7 5



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.

CLAS Tesis
AGE _____
FECHA 1975
PROC M-354



4-2-80

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

"PURIFICACION DE LA FITOHEMAGLUTININA P"

PRESIDENTE PROF. : MAGDALENA ACOSTA SEGURA
VOCAL PROF. : ERNESTINA BALLESTEROS RUEDA
SECRETARIO PROF. : SALVADOR MARTIN SOSA
1er. SUPLENTE PROF. : EDMUNDO CHAVEZ COSIO
2o. SUPLENTE PROF. : BEATRIZ MEDINA JIMENEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: HOSPITAL DEL NIÑO DE LA

I. M. A. N.

NOMBRE DEL SUSTENTANTE: CARLOS ZAMAYOA ZAVALA

ASESOR DEL TEMA : DR. SALVADOR MARTIN SOSA

D E D I C A T O R I A S

-O-O-O-

A MIS PADRES, HERMANAS, TIOS
EDMUNDO Y CARMEN QUE CONTRI-
BUYERON EN MI FORMACION PRO-
FESIONAL.

EN MEMORIA DE MI PRIMO
EDMUNDO.

UN AGRADECIMIENTO ESPECIAL AL
DR. SALVADOR MARTIN SOSA POR-
SU ACERTADA GUIA EN ESTE TRA-
BAJO.

A SILVIA POR SU DESINTERESADA
AYUDA.

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION	
I. GENERALIDADES.....	2
II. MATERIAL Y METODOS.....	12
III. RESULTADOS.....	24
IV. DISCUSION.....	32
RESUMEN.....	36
CONCLUSIONES.....	37
BIBLIOGRAFIA.....	38

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

Las dificultades para conseguir Fitoheماغلوتينina de -- fuentes comerciales en nuestro país, problema al que se enfrentan todos los laboratorios que hacen uso de los cultivos de -- leucocitos de sangre periférica principalmente, ha motivado la realización de este trabajo.

C A P I T U L O I

PURIFICACION DE LA FITOHEMAGLUTININA P

La existencia de hemaglutininas en muchas especies de plantas, particularmente las leguminosas, ha sido conocida por muchos años. Boyd (1) cree generalmente que las lectinas (hemaglutininas vegetales) son proteínas o mucoproteínas.

Los extractos obtenidos de algunas de esas semillas reaccionan específicamente y se les llama lectinas, término propuesto por Boyd (1), derivado del latín legere, escoger o seleccionar. Boyd eligió este nombre para las aglutininas vegetales con especificidad de grupo sanguíneo con el objeto de evitar el empleo de la palabra "anticuerpo", ya que parece ser que el mecanismo de la reacción es más bien fortuito, y no debido a una estimulación aglutinógena.

Ya existen en el comercio cuatro lectinas específicas para ciertos factores sanguíneos humanos. La lectina anti-A₁, preparada a partir de semillas de Dolichos biflorus (2) produce una aglutinación específica de los eritrocitos pertenecientes a los sub-grupos A₁ y A₁B. La lectina anti-H derivada de las semillas del Ulex europeus (3), se emplea para determinar si un individuo es o no secretor y es también útil para diferenciar entre sí los sub-grupos de A. La lectina Anti-N, preparada con semillas de Vicia graminea (4), y la lectina anti-M,

obtenida de las semillas de la *Iberis amara*, constituyen reactivos adicionales para pruebas confirmatorias de los grupos N y M.

La Fitohemaglutinina (FHA) es una mucoproteína que se extrae de la semilla de *Phaseolus vulgaris*, aunque también es posible aislarla de otras especies de leguminosas. Sus propiedades conocidas son dos: produce la aglutinación de eritrocitos, y de leucocitos en menor escala, y es capaz de inducir la división celular. Estudios recientes (5) han demostrado que el efecto de la FHA está determinado por la especie de planta de la que se extrae; así, por ejemplo, la obtenida de la raíz, tallo y semilla de *Dolichos biflorus*, únicamente presenta acción aglutinante, en contraste con la aislada de hojas y raíz de *Phytolacca americana*, que presenta un alto grado mitogénico y muy poco o ningún efecto aglutinante.

Según los mismos autores existen especies en las que se manifiestan ambos efectos, como en *Phaseolus vulgaris* y otras especies de *Phytolacca*; más aún, se ha encontrado que algunas leguminosas poseen efectos eritroaglutinantes y leucoaglutinantes específicos.

En 1909, Wienhaus (6) la purificó parcialmente y la identificó como una proteína, probablemente una albúmina. Rigas y Osgood (7) sabían de la utilidad de la FHA para la separación de leucocitos de eritrocitos en un gran estado de pure-

za, en un mínimo de tiempo, con poco esfuerzo y costo.

Con el objeto de estudiar el metabolismo de los leucocitos, obtuvieron la aglutinina en forma de mucoproteína (FHAM) - parcialmente purificada por el método de fraccionamiento con etanol a baja temperatura; el material purificado en esa forma es una mucoproteína termolábil, soluble en agua destilada, solución salina y soluciones amortiguadoras.

Contiene 6.5% de nitrógeno, determinado por micro-Kjeldahl, y 50.4% de sustancias reductoras estimadas como glucosa por el método de Nelson-Somogyi.

Posteriormente, los mismos autores purificaron la (FHA-P) por el procedimiento "Salting out". Todo el trabajo fue desarrollado en un cuarto frío a 1°C, y usaron una supercentrífuga Sharples para completar la sedimentación del precipitado. Fraccionaron con sulfato de amonio y dializaron contra corriente de agua destilada.

La FHA P así obtenida es un producto amorfo, insoluble en agua destilada, soluble en solución salina al 0.85% y en soluciones amortiguadoras. En solución es inactivada por la temperatura, pero es relativamente estable a 1°C; la solución guardada en refrigeración a pH=1 por un mes retiene su título-aglutinante original. Contiene $14.6 \pm 0.5\%$ de nitrógeno, $3.4 \pm 0.25\%$ de sustancias reductoras y 7.25% de tirosina (determinada por el método Folin-Ciocalteu). El análisis electroforético

entre $\text{pH}=2$ y 8 mostró un material homogéneo con un punto isoelectrico a $\text{pH}=6.5$.

Un análisis (8) de la FHA al 0.7% en solución amortiguadora de Miller $\text{pH}=7$, fuerza iónica 0.1, en una ultracentrífuga analítica a 52,600 rpm, temperatura de 26°C , reveló un gran -- componente homogéneo con una constante de sedimentación de 7.28 a tiempos de 16,32,56 y 80 minutos.

La insolubilidad de esta proteína en agua destilada y - su baja movilidad electroforética indica que es una euglobulina.

Rigas y Osgood usaron el método de Salk (9) para la titulación de la FHA puesto que les daba un punto final claro, - objetivo y reproducible. Este método consiste en: Hacer diluciones de la FHA en solución salina al 0.85%, de 1:10 hasta -- 1:5120 cuando menos.

A 0.5 ml. de cada dilución se la adicionaron 0.5 ml. de una suspensión al 0.25% de eritrocitos de pollo se mezclaron a la incubadora a temperatura de 38°C durante una hora y media a dos horas. Se utilizó un tubo control con solución salina y -- eritrocitos; el título será la máxima dilución en que haya aglutinación completa.

De esta manera se tituló la FHA M y FHA P dando la segunda 100 veces más actividad.

Es posible que la eliminación del polisacárido desenmas

re sitios activos.

Por otra parte los mismos autores reportan que para la rutina de separación de leucocitos, es preferible el método de titulación de Li y Osgood (10); en el cual: a una serie de tubos de centrífuga se agrega 5 ml. de sangre humana normal oxalatada, haciendo previa cuenta de leucocitos.

Se agregan volúmenes variables de FHA de 0.05 ml., 0.10 ml., 0.15 ml. hasta 3 ml., se mezcla y se centrifuga a 500 rpm (40 g) por 90 segundos; en seguida se procede a contar los leucocitos en el plasma sobrenadante; el título será el volumen de FHA el que produzca el mayor rendimiento de leucocitos con menor mezcla de eritrocitos, lo cual es variable para puntos entre sangres de diferentes individuos, desde 0.1 a 0.25 ml. de solución de FHA esterilizada por 5 ml. de sangre.

La FHA P y M aglutina glóbulos rojos humanos de todos los tipos incluyendo los del grupo "O" y Rh (-); han sido reportados títulos bajos en los glóbulos rojos de tipo "A". Apparently, el tipo de acción es diferente en los glóbulos rojos del grupo: A, B, Rh (-); también es aglutinante de glóbulos rojos de animales como: caballo, puerco, perro, gato, conejo, pollo y rana.

Borjeson y col. (11) purificaron la FHA a partir *Faseolus vulgaris* con amortiguador de fosfatos, calentando y fraccionando con etanol y pasándola posteriormente por una columna

de cromatografía; dichos autores concluyeron que se trata de una sustancia proteica que contiene el 6% de carbohidratos.

Nowell en 1960 (12) descubrió accidentalmente que la FHA P además de su capacidad aglutinante usada inicialmente para la separación de leucocitos de eritrocitos, posee una actividad mitogénica elevada. Su principio hemaglutinante parece ser distinto de su factor mitógeno.

Este mismo autor estudió los posibles factores responsables de la iniciación de la actividad mitótica en cultivos de leucocitos de sangre humana normal, tales como: variaciones de temperatura, pH, tensión de oxígeno, tensión de bióxido de carbono, plasma y concentración celular, así como la agitación y encontró que solo producían cambios cuantitativos moderados en actividad mitótica y que la FHA es un iniciador de la actividad mitótica; en su presencia ocurrió la división celular; y en su ausencia no se observaron mitosis.

Los estudios de Nowell sugieren que la FHA no produce mitosis per se sino que altera los monocitos y grandes linfocitos circulantes a un estado que los hace capaces de dividirse.

Nowell propone que quizá la acción de la FHA es recubrir la superficie celular, alterando la membrana y permitiendo la entrada de alguna sustancia del medio de cultivo y que esta iniciará el proceso mitótico.

Actualmente se ha podido separar el factor aglutinante en la FHA del factor mitogénico (11), el cual retiene su actividad por la membrana de los linfocitos.

Lennox en 1966 (13) demostró que otras sustancias eran capaces de estimular la actividad de los linfocitos pequeños - cultivados in vitro observando que los linfocitos procedentes de donadores sensibles a la tuberculina podrían transformarse por exposición a pequeñas cantidades de esta sustancia.

En el mismo año (1966) Elves y col. observaron el mismo fenómeno de transformación in vitro a consecuencia de una gran variedad de antígeno (Toxoide tetánico, Bordetella pertussis, - toxoide diftérico, vacuna contra la poliomielitis y vacuna contra la viruela) siempre y cuando el donador para el cultivo ha ya tenido experiencia inmunológica con estos antígenos.

Yunis en 1965 (14) observó que los leucocitos normales en cultivo no se transforman ni proliferan mientras no se sometan a algún estímulo, como a un antígeno al que fueron expuestos previamente. Por lo tanto, consideró que el agente mitogénico en la FHA podría ser algún antígeno de leguminosa para el cual todos los individuos tendrían cierto grado de sensibilidad natural.

Como dijimos, los linfocitos de sangre periférica se ven obligados a transformarse por efectos de mitógenos más o menos específicos, como la FHA y varios antígenos ambientales -

almacenados en su memoria inmunológica como de extraños o no propios.

La respuesta de transformación supone síntesis de ARN, proteínas, ADN, acompañada de crecimiento celular y seguidos de división mitótica.

El estímulo de la FHA parece mediado por un efecto sobre la membrana celular que inicia una pinocitosis intensa. Las vacuolas pinocíticas resultantes se unen con los lisosomas, y estas partículas combinadas limitadas por membranas dejan escapar enzimas proteolíticas, que afectan al citoplasma y al núcleo, y podrían representar el estímulo final para la transformación (15).

La hipótesis de que la FHA induce cambios tempranos en la superficie de los linfocitos que secundariamente presentan alteraciones en los lisosomas se basa en estudios histoquímicos de microscopia electrónica que muestran alteraciones morfológicas y bioquímicas de los lisosomas.

Por otra parte, en un análisis por ultracentrifugación se demostró que los lisosomas estimulados no sedimentaban; tales cambios fueron asociados con el incremento en la permeabilidad total del linfocito a sustancias del medio de cultivo.

En estados fisiológicos, la respuesta de transformación de mitosis parece depender de factores humorales circulantes. Ciertos agentes humorales producidos por el timo facilitan las

respuestas, en tanto que una fracción de alfa globulina circulante la suprime (16).

Paralelamente, desde 1964 se tienen reportes de estudios sobre otra propiedad de la FHA como elemento antigénico, pues se ha logrado aislar hasta 8 diferentes tipos de antígenos de su molécula; posteriormente, esta propiedad ha sido objeto de numerosos estudios. Otros argumentos a favor de esta propiedad son los recientes descubrimientos en cuanto a sus efectos intracelulares "in vitro", que son: alteraciones morfológicas, cambios en el patrón del ARN, aumento en la síntesis de proteínas, inicio de la acetilación de las histonas y aumento en la actividad de la polimerasa del ADN (17), actividades precedentes a la mitosis.

Se han observado alteraciones de los linfocitos en ciertas enfermedades. Como sabemos, los linfocitos de sangre periférica cultivados in vitro, estimulados por FHA o por antígenos con los cuales ya tuvo contacto el donador, presentan transformación en grandes células de tipo primitivo, apareciendo actividad mitótica.

Ling y Soothill (18) encontraron que la velocidad de transformación de linfocitos leucémicos estimulados por FHA en los cultivos era menor que en linfocitos normales.

Hirschhorn, Schreibman y col. (19) observaron modificaciones de las transformaciones de linfocitos frente a estímulo

ción por FHA, en uno o dos casos de enfermedad de Hodgkin, linfoma de folículos gigantes, linfosarcoma y leucemia linfocíti-ca crónica, observándose que la disminución de la tasa de transformación fue proporcional a la actividad de la enfermedad.

Goldberg (20) separó de la FHA la fracción estimulante-
de la síntesis de ARN, la fracción estimulante de la síntesis-
de ADN de la eritroaglutinina, de la leucoaglutinina y facto--
res citotóxicos, considerando que las sustancias estimulantes-
de la síntesis de ácidos nucleicos probablemente no son proteí-
nas, puesto que no son afectadas significativamente por una --
desproteínización rigurosa con tripsina y otras enzimas proteo-
líticas. Igualmente, parece ser que no son ácidos nucleicos, -
puesto que no precipitan con ácido perclórico y son resisten--
tes a la acción de la ARNasa, ADNasa y fosfodiesterasa. Si se-
remueve al 98% de carbohidratos hay una baja moderada de acti-
vidad, por lo que se piensa que tampoco son carbohidratos.

El factor eritroaglutinante sí es afectado por la diges-
tión de enzimas proteolíticas.

C A P I T U L O I I

MATERIAL Y METODOS

Materia prima y purificación de la FHA (P) .

Pruebas de control de actividad biológica:

Prueba aglutinogénica a 38°C

Prueba mitogénica a 4°C

Prueba mitogénica con variación de la concentración -
de la FHA. .

Pruebas de estabilidad.

Refrigeración

Congelación

Liofilización

Para realizar esta tesis, se utilizó harina de frijol ----
(Phaseolus vulgaris o Phaseolus communis) como materia prima y -
se usó el método de "Salting out" para la purificación de la pro-
teína.

El trabajo fue desarrollado en un cuarto frío a 4°C y se -
usó una ultracentrífuga SORVALL (RC2-B) refrigerada para la sepa-
ración de los componentes insolubles.

Dadas las características del laboratorio y del material,-
se trabajó con volúmenes relativamente pequeños, con la ventaja-
de hacer manipulaciones más cómodas.

Extracción: A 1 Kg. de harina de frijol (*Phaseolus vulgaris* o *Phaseolus communis*) se adicionan 5 litros de HCl diluido (aproximadamente 0.1 N) de pH 1, con agitación constante. La suspensión se agitó durante 24 horas y se centrifugó de 10 a 15 minutos a 1000g. El sobrenadante turbio se decantó; contiene la FHA y otras proteínas que son eliminadas en los pasos siguientes:

FRACCIONAMIENTOS CON SULFATO DE AMONIO:

Al extracto se le adicionó igual volumen de solución de sulfato de amonio saturado de pH 1, con agitación constante -- hasta obtener una concentración de 25.4 gramos de sulfato de amonio por 100ml. de solución. La suspensión obtenida se centrifugó a 10,000 rpm el tiempo necesario para que el sobrenadante quede apenas turbio y de un color rosado.

A la solución clarificada se le adicionó igual volumen de sulfato de amonio saturado de pH 1, con agitación constante hasta tener una concentración de 38.1 gramos por 100 ml. Se dejó sedimentar y se decantó el sobrenadante, descartándolo. El resto se centrifugó a 10,000 rpm el tiempo necesario para que ocurra una clarificación completa. El precipitado de color rosado se diluye en un volumen aproximadamente doble de H₂O destilada.

DIALISIS:

El material obtenido se transfirió a tubos de celofán para diálisis y se procedió a dializar contra H_2O corriente (a $14^{\circ}C$ por 36 horas) hasta obtener un incremento de volumen de 50%. -- Luego se dializó a $1^{\circ}C$ durante 36 horas también con agua corriente. La suspensión se centrifugó y la solución sobrenadante clara se decantó para proceder a la purificación final de la FHA. - Esta se precipitó en forma pura por adición de 10 volúmenes de H_2O destilada fría; el sedimento se recuperó por centrifugación, se redisuelve en agua destilada y se procede a su esterilización.

ESTERILIZACION:

Esta solución se pasó por filtro Seitz tipo EKS-1 y a partir de este momento se manipuló en condiciones de esterilidad.

PRUEBAS DE CONTROL DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Prueba aglutinogénica:

Para titular el factor aglutinante de la FHA P se usó el método de Salk con la modificación siguiente:

En lugar de usar eritrocitos de pollo, según la técnica original se utilizaron glóbulos rojos humanos normales (de preferencia grupo 0).

METODOLOGIA:

Se hicieron diluciones de la FHA P en solución salina al-

0.85% de 1:10 hasta 1:16, 384 cuando menos, en tubos de 10 x -- 75 mm y fondo redondo. A 0.5 ml. de cada dilución se les adi- - cionó 0.5 ml. de una suspensión al 0.25% de eritrocitos humanos en solución salina, se mezclaron y se llevaron a la incubadora- a temperatura de 38°C durante una y media a dos horas. Se utili- zó un tubo control con solución salina y eritrocitos; el título será la máxima dilución en que haya aglutinación completa. Para fines comparativos se tituló simultáneamente una FHA M comer- - cial (DIFCO).

Los resultados son interpretados observando el fondo de - los tubos en la gradilla, directamente, o por medio de un espe- jo fijado a un ángulo apropiado bajo una mesa de vidrio.

Se realizaron pruebas simultáneas a 38 y 40°C a tiempos - constantes.

Prueba mitogénica:

Cultivo de linfocitos "in vitro"

El origen de la técnica de cultivo de tejidos "in vitro"- para observaciones morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, gené- ticas se remonta a 1898, cuando Ljunggren demostró la supervi- - vencia de fragmentos de piel en condiciones artificiales.

A partir de 1929 y gracias a la idea de Kemp de emplear el cultivo de tejidos para el estudio de cromosomas, se realizaron importantes progresos en la observación de mitosis somáticas. - En 1934, Kroutchouv y Berlin observaron mitosis en cultivo de -

leucocitos.

En 1937, Cavaudan-Pomrianskinsky descubrieron el efecto-mitostático de la colchicina.

En 1960, Moorhead, Nowell, Hungerford, Beck y Donnelly, -hicieron una recopilación de datos a partir de los cuales desarrollaron una nueva técnica para la obtención de cromosomas humanos a partir de linfocitos de sangre periférica. Así, por --ejemplo, utilizaron el pretratamiento hipotónico descrito por Hsu y Pomerat en 1952, empleando la técnica descrita en 1960 -por Nowell para cultivo de sangre periférica y los conocimientos anteriores sobre el efecto estimulante de la FHA obtenidos en 1959.

La técnica base (21) utilizada en este trabajo para evaluar la actividad del factor mitogénico, es la siguiente:

Técnica para preparar medio completo para cultivo de leucocitos en sangre periférica.

Todo el trabajo se realiza con material y en ambiente --estéril (campana de flujo laminar).

Para cada frasco de cultivo (frasco ampula de 60 ml.) se usan 5 ml. de medio completo. Este medio contiene:

- a) Medio de Mc Coy (22) modificado, con glutamina, 5 ml.
- b) Solución de antibióticos (Penicilina-Estreptomicina) -
0.2 ml.

Penicilina 10,000 u.o.

Estreptomicina 10,000 mcg x ml.

- c) Fitoheماغلوتينا M (GIBCO) como testigo de comparación 0.1 ml.
- d) La FHA "P" preparada se utilizó a igual volumen que la comercial.

TECNICA DE SEMBRADO E INCUBACION

A.- Si la sangre se siembra inmediatamente después de su extracción:

- 1) Se prepara el medio de cultivo completo.
- 2) Se sangra a la persona, heparinizando previamente la jeringa.
- 3) Se ponen 6 a 8 gotas de sangre en los frascos que con tengan 5 ml. de medio completo y se tapan con tapones de hule.
- 4) Los cultivos se incuban en una estufa a 37°C durante 72 horas.
- 5) A las 72 horas se agregan a cada cultivo 4 gotas de Colcemida (10 mcg/ml) y se dejan en incubación a 37°C durante 3 horas.
- 6) Se procesan los cultivos (si se saca la sangre y no se siembra inmediatamente o se transporta a otro lugar pa ra su siembra; se conserva a \pm 4°C hasta el momento de utilizarla).

TECNICA PARA PROCESAR LOS CULTIVOS

- 1.- Resuspender las células y trasferirlas a un tubo de centrífuga.
- 2.- Centrífuga a 1,000 rpm durante 10 min.
- 3.- Descartar el sobrenadante, resuspender las células y agregar solución hipotónica de NaCl, primero 2 ml. y después completar el volumen inicial con la misma solución hipotónica, dejándolo reposar durante 20 minutos.
- 4.- Centrífugar a 1,000 rpm durante 3 min.
- 5.- Descartar el sobrenadante y agregar 3 ml. de fijador (alcohol metílico-ácido acético en relación 3:1) las células se dejan reposar 15 min.
- 6.- Centrífugar a 1,000 rpm durante 3 min.
- 7.- Se repiten los pasos 5 y 6 varias veces (generalmente 3 bastan).
- 8.- Se guardan los tubos en el refrigerador hasta el día siguiente .
- 9.- Se hacen las preparaciones:

TECNICA PARA HACER Y TEÑIR LAS PREPARACIONES

- 1.- Se sacan del refrigerador los tubos de centrífuga que contienen las células.
- 2.- Si las células no están limpias se repiten los pasos-

- 5 y 6 de la técnica para procesar los cultivos.
- 3.- Se quita el sobrenadante hasta dejar más o menos 0.5 ml arriba del botón y se resuspenden las células.
 - 4.- En un porta-objetos limpio y frío (sumergido previamente en agua fría). Se dejan caer unas gotas de la suspensión de células, desde unos 20-30 cm. de altura, lo cual tiene por objeto hacer estallar los leucocitos.
El porta-objetos debe estar ligeramente inclinado al recibir las gotas de suspensión celular; en seguida, se -- sopla ligeramente las células.
 - 5.- Se secan los porta-objetos por calentamiento suave (a la flama).
 - 6.- Las preparaciones así obtenidas se tifen en una solución de Leishman-Giemsa-agua (en proporción 3:1:36) durante 20 minutos.
 - 7.- A los 20 minutos se sacan las preparaciones y se lavan en:
 - a) agua
 - b) alcohol metílico al 50%
 - c) aguaSecar al aire y observar al microscopio con objetivo de inmersión.

TECNICA DE LAVADO DE MATERIAL DE CRISTALERIA PARA CULTIVO DE -
TEJIDOS.

El material de vidrio que se utiliza para el cultivo de - leucocitos debe prepararse en forma especial.

El lavado debe ser muy cuidadoso y efectivo para eliminar totalmente cualquier contaminante que pudiera resultar tóxico - para las células. En nuestro estudio utilizamos el siguiente -- procesamiento rutinario:

- 1.- Colocar el material usado en tinas de plástico que -- contengan solución de lavado.

Solución de lavado: Detergente 7X al 1% (7X es un pro- ducto atóxico para células en cultivo).

- 2.- Sumergir completamente el material en la solución y - dejarlo durante varias horas (1-12 horas):
- 3.- Cepillar perfectamente el material con esta solución.
- 4.- Enjuagar en agua corriente varias veces (8-10 veces).
- 5.- Enjuagar 3 veces con agua destilada.
- 6.- Sumergir el material en una cubeta conteniendo agua - destilada durante 20 minutos.
- 7.- Pasar el material a otra cubeta que contenga:
15 ml. de HCl N.
3 litros de agua de la llave,
- 8.- Mantenerlo en esta solución durante 20 min. Este paso es para evitar la alcalinización del cristal.

- 9.- Cepillar nuevamente el material en agua corriente.
- 10.- Enjuagar 7 veces en agua de la llave.
- 11.- Enjuagar 3 veces en agua destilada.
- 12.- Sumergir todo el material en agua bidestilada durante algunos minutos y escurrir.
- 13.- Secar en el horno a 80°C.
- 14.- Envolver y etiquetar para esterilizar.
- 15.- Esterilizar al autoclave a 20 libras de presión, temperatura de 121°C durante 30 minutos.
- 16.- Dejar enfriar y guardar.

COMENTARIO A LA TECNICA:

Se añade colchicina o su derivado desacetil N-metilado, - Colcemid, a los cultivos celulares para interrumpir las mitosis en metafase.

Es un alcaloide que se extrae de la raíz de Colchium autumnale; algunos prefieren utilizar el Colcemid por su menor toxicidad en relación a la del alcaloide puro, y aun así debe emplearse a concentraciones muy bajas, como en la técnica base.

Debe hacerse notar que, como la acción primordial del -- Colcemid durante la mitosis es impedir el desplazamiento de los cromosomas a los polos por alterar la consistencia citoplasmática (23) y romper el huso acromático, posiblemente por acción directa sobre sus componentes lipídicos, haciendo que permanezcan en la placa ecuatorial (metafase). Además, la falta de túbulos -

del huso facilita la dispersión de los cromosomas por efecto -- de los líquidos hipotónicos, de modo que se obtienen cromosomas dispersos que pueden contarse e identificarse con mayor facilidad y seguridad.

Otros compuestos que además de la colchicina, pueden utilizarse para eliminar el huso acromático, son la vinblastina y -- la griseofulvina.

PRUEBA MITOGENICA CON VARIACION DE LA CONCENTRACION DE LA FHA.

Se siguió la misma técnica descrita con la única modificación de variar la concentración de la FHA en cultivos simultáneos.

Las diluciones de FHA "P" probadas fueron las siguientes: 1:2, 1:3, 1:4. Se usó como diluyente solución salina estéril al 0.9%.

PRUEBAS DE ESTABILIDAD

La FHA fue conservada en diferentes condiciones con el objeto de probar su estabilidad.

REFRIGERACION

CONGELACION

LIOFILIZACION

REFRIGERACION: Se conservó los lotes obtenidos de FHA -- "P" en refrigeración a una temperatura de 4°C, por espacio de -- 4 meses, realizando pruebas periódicas de hemaglutinación y mitogénicas.

CONGELACION: Se conservaron lotes estériles en condiciones de congelación controlando su actividad biológica igual que los lotes refirgerados.

LIOFILIZACION: Los lotes se esterilizaron por filtración (Saitz) y se liofilizaron en frascos con 10 ml. de FHA cada uno. Los frascos liofilizados se conservaron a una temperatura de --4°C. Las pruebas biológicas fueron las mismas que los lotes anteriores.

C A P I T U L O I I I

RESULTADOS

Para llevar un orden que simplifique la interpretación de nuestros resultados, los expondremos de la forma siguiente:

TABLA	LOTES	
I	(1, 2)	PRUEBA COMPARATIVA DE HEMAGLUTINACION A 38°C CON FHA "M" COMERCIAL.
II	(3, 4)	TITULOS DE HEMAGLUTINACION A DIFERENTES TEMPERATURAS.
III	(5, 6)	ESTABILIDAD DE LA FHA "P" A 4°C PRUEBA DE HEMAGLUTINACION Y MITOGENICA.
IV	(7, 8)	ESTABILIDAD DE LA FHA "P" EN CONGELACION. PRUEBA DE HEMAGLUTINACION Y MITOGENICA.
V	(9, 10)	ESTABILIDAD DE LA FHA "P" A LA LIOFILIZACION. PRUEBA DE HEMAGLUTINACION Y MITOGENICA.
VI	(11)	PRUEBAS MITOGENICAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FHA "P".
VII	(12)	PRUEBAS MITOGENICAS COMPARATIVAS CON FHA M COMERCIAL.

TABLA I

PRUEBA COMPARATIVA DE HEMAGLUTINACION A 36°C CON FHA M
COMERCIAL

LOTES 1 Y 2

LOTE	TIEMPO TRANSCURRIDO (HORAS)			
	1.30	2.00	6.00	24.00
1	1:2560	1:2560	1:2560	1:2560
2	1:10240	1:10240	1:10240	1:10240
FHA M (COMERCIAL)+	1:10240	1:10240	1:10240	1:10240

+ Lote No. 580663
Marca DIFCO.

TABLA II

TITULOS DE HEMAGLUTINACION A DIFERENTES TEMPERATURASLOTES 3 Y 4

LOTE	TIEMPO TRANSCURRIDO (HORAS)		TEMPERATURA °C
	2.00	24.00	
3	1:320	1:320	21
3	1:640	1:640	38
3	1:1280	1:1280	4
4	1:160	1:160	38
4	1:320	1:320	4

TABLA III

ESTABILIDAD DE LA FEA "P" A 4 °CLOTES 5 Y 6

P R U E B A	LOTE	TIEMPO TRANSCURRIDO (DIAS)					
		0	15	30	60	90	120
HEMAGLUTINACION	5	1:2560	1:2560	1:2560	1:1280	1:1280	1:1280
	6	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280
MITOGENICA	5	<u>200</u> 32	<u>200</u> 38	<u>200</u> 33	<u>200</u> 43	<u>200</u> 50	<u>200</u> 36
	6	<u>200</u> 58	<u>200</u> 72	<u>200</u> 60	<u>200</u> 49	<u>200</u> 65	<u>200</u> 59

La prueba mitogénica es evaluada por su índice mitótico:

$$I M = \frac{\text{No. de células contadas}}{\text{No. de células en mitosis}}$$

Nota: Cada I.M. es el promedio de 10 lecturas.

TABLA IV

ESTABILIDAD DE LA FHA EN CONGELACION (-15 A -20 °C)LOTES 7 Y 8

P R U E B A	LOTE	TIEMPO TRANSCURRIDO (DIAS)					
		0	15	30	60	90	120
HEMAGLUTINACION	7	1:2560	1:2560	1:2560	1:2560	1:2560	1:2560
	8	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640
MITOGENESIS	7	$\frac{200}{108}$	$\frac{200}{76}$	$\frac{200}{92}$	$\frac{200}{86}$	$\frac{200}{101}$	$\frac{200}{95}$
	8	$\frac{200}{58}$	$\frac{200}{92}$	$\frac{200}{69}$	$\frac{200}{54}$	$\frac{200}{39}$	$\frac{200}{63}$

TABLA V

ESTABILIDAD DE LA FHA A LA LIOFILIZACIONLOTES 9 Y 10

P R U E B A	LOTE	TIEMPO TRANSCURRIDO (DIAS)		
		0	30	330
HEMAGLUTINACION	9	1:640	1:640	1:640
	10	1:320	1:320	1:320
MITOGENESIS	9	$\frac{200}{64}$	$\frac{200}{74}$	$\frac{200}{61}$
	10	$\frac{200}{105}$	$\frac{200}{85}$	$\frac{200}{93}$

TABLA VI

PRUEBAS MITOGENICAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FHALOTE 11

CULTIVOS	DILUCIONES			
	1:1	1:2	1:3	1:4
1	$\frac{200}{64}$			
2		$\frac{200}{172}$		
3			$\frac{200}{106}$	
4				$\frac{200}{32}$

Nota: Las diluciones se hicieron con solución estéril de NaCl al 0.9%

TABLA VII

PRUEBAS MITOGENICAS COMPARATIVAS CON FHA COMERCIALLOTE 12

LOTE	D I L U C I O N E S			
	1:1	1:2	1:3	1:4
12	<u>200</u> 160	<u>200</u> 180	<u>200</u> 74	<u>200</u> 33
FHA M + (COMERCIAL)	<u>200</u> 169			

+ FHA M marca GIBCO
Lote A545323

C A P I T U L O I V

DISCUSION

En la prueba comparativa de hemaglutinación (Tabla I) - todas las muestras fueron diluídas inicialmente 1:5 con solución de NaCl al 0.85%, y ese material fue considerado la dilución 1:1. Se consideran significativas las diferencias mayores de 1 dilución en + ó en -.

En la Tabla II se encuentran los resultados obtenidos - en las pruebas de hemaglutinación a diferentes temperaturas, - los que se realizaron con la finalidad de precisar las condiciones óptimas para la misma. Aún cuando los títulos de los lotes estudiados son relativamente bajos, se aprecia claramente que en ningún caso la diferencia fue mayor de 1 dilución, lo - cual nos ha llevado a considerar que esta variable no es crítica en esta prueba. Sin embargo, el hecho de que tanto a temperatura ambiente como a 4°C los títulos fueron consistentemente más altos, aunque sea una sola dilución, también nos ha llevado a considerar como preferibles las temperaturas indicadas. - Por otra parte, como ya se expresó anteriormente, el título hemaglutinante de la FHA no correlaciona necesariamente con su - actividad mitogénica. Es más, nos ha quedado la impresión de - que si existe alguna correlación esta sería inversa, es decir, que la mayor actividad mitogénica se observa cuando el poder -

hemaglutinante es menor, dentro de ciertos límites obviamente. (Ver tablas III, IV y V).

Debido a que uno de los problemas muy importantes relacionados con cualquier producto biológico es su estabilidad, - realizamos algunas pruebas tendientes a precisar la estabilidad de nuestra preparación. Según puede verse en la tabla III- estudiamos la estabilidad de 2 lotes conservados a 4°C en el - transcurso de 4 meses y a los intervalos indicados en la tabla; es evidente que en las condiciones en que se realizó esta prueba longitudinal no hubo pérdida de actividad mitótica ni de poder hemaglutinante como puede verse en las tablas IV y V en -- condiciones de congelación y en material liofilizado tampoco - fue posible detectar una disminución significativa de actividad mitogénica o hemaglutinante en los lotes 7, 8, 9 y 10.

Vale la pena recalcar (ver tabla V) que las pruebas de estabilidad en material liofilizado se realizaron a otros intervalos de tiempo, y que consideramos particularmente importante el hecho de que a los 11 meses de preparados los lotes 9 y 10 su estabilidad haya resultado excelente. Por supuesto debe considerarse conveniente estudiar la estabilidad de este material biológico a más largo plazo.

También se consideró apropiado, por razones de rendimiento, determinar la dilución óptima de nuestro material biológico para obtener la máxima actividad mitogénica, por ser esta -

la fundamental en el cultivo de leucocitos de sangre periférica para estudios de tipo genético.

Sabiendo que la FHA puede resultar un tanto tóxica (21) e inhibir la mitogénesis. Nuestro lote No. 11 fue utilizado para este proceso, y los resultados que se presentan en la tabla VI indican claramente que cuando menos para el lote probado la dilución 1:2 produjo una actividad mitótica considerablemente más elevada que el producto sin diluir o a mayores diluciones.

Además, otro lote (No. 2) fue probado en forma similar y comparativa simultáneamente con la FHA de origen comercial (Gibco) que ha utilizado de manera rutinaria el Laboratorio de Genética del Hospital del Niño IMAN, por varios años y con resultados habitualmente satisfactorios. Fue muy satisfactorio comprobar que la actividad mitogénica de nuestra FHA lote No. 12 resultó igual o mejor, a las diluciones 1:1 y de 1:2, que el producto comercial sin diluir, como puede observarse en la tabla VII.

Parece claro que los métodos muy simplificados no son satisfactorios para preparar FHA de origen vegetal con actividad mitótica útil en el cultivo de leucocitos de sangre periférica. El método de Rigas y Osgood nos ha permitido obtener, a partir de *Phaseolus vulgaris* una FHA de excelente actividad mitogénica, poder hemaglutinante y estabilidad en diferentes condiciones de conservación.

La metodología utilizada en las diversas pruebas de laboratorio, recomendadas por especialistas con gran experiencia en éste campo, ha funcionado muy satisfactoriamente en nuestras manos y no presentó mayores dificultades de orden técnico. Conviene aclarar, sin embargo que la prueba sujeta a mayores factores de subjetividad es la de actividad mitogénica, por lo cual se trató de realizarla siempre en condiciones de establecer posibilidades de comparación.

Tal parece que la capacidad hemaglutinante de un producto de esta naturaleza tiene una importancia secundaria en relación a su actividad promotora de mitosis, al menos cuando se le utiliza con el fin ya indicado. Asimismo, parece aconsejable hacer siempre una prueba comparativa utilizando cultivos activados con la FHA a diferentes diluciones, lo cual puede redundar no solamente en mejores preparaciones para estudios cromosómicos sino en una reducción de su costo por este concepto.

A reserva de confirmarlo experimentalmente prolongando los períodos en las pruebas de estabilidad a 4°C y -20°C, por ahora recomendaríamos la liofilización como el mejor procedimiento de conservación.

R E S U M E N

Se prepararon 12 lotes por el método de Rigas y Osgood y se sometieron a una serie de pruebas de poder hemaglutinante, actividad mitogénica y estabilidad, en distintas condiciones experimentales y a lo largo de 11 meses. Se estudiaron las características mencionadas en función de las siguientes variables: Título de hemaglutinación a las temperaturas de 4°C, ambiente (\pm 22°C) y 38°C; actividad mitogénica a diferentes concentraciones y en comparación simultánea con un producto comercial de calidad reconocida; estabilidad de congelación (-15 a 20°C) y liofilizado.

C O N C L U S I O N E S

Los resultados indican que el método de preparación es - satisfactorio y que el producto obtenido a partir de Phaseolus vulgaris posee excelente actividad mitogénica que no necesariamente correlaciona con su poder hemaglutinante, así como una-- estabilidad muy satisfactoria en las condiciones experimenta-- les antes mencionadas.

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

- (1) Boyd, W.C. : "The proteins of immune reactions, en The -- Proteins", Ed. Neurath H. y Bailey K., Vol. 2, parte b, -- p. 789, Academic Press, Inc., Nueva York, 1954.
- (2) Bird, G.W.G. : "Specific agglutinating activity for human red blood corpuscles in extract of Dolichos biflorus". -- Curr. Sci. 20:298, 1951.
- (3) Cazal, P., y Lalaurie M. : "Recherches sur quelques phyto agglutinines spécifiques des groupes sanguins ABO". Acta-haema., 8:73, 1952.
- (4) Ottensooser, F., y Silberschmidt K. : "Haemagglutinin anti-N in plant seeds".- Nature 172:914, 1953.
- (5) Downing, H.J. : "Plant agglutinins and mitosis".- Nature-217:654-655, 1953.
- (6) Wienhaus. O., Biochem. Z., 18, 228, 1909. Tomando de la - referencia (7).
- (7) Rigas, D.A., Li, J.G., and Osgood, E.E., Abstracts, Wes-- tern Society for Clinical Research, Seattle, Jan. 26-27, - 1951; Am. J. Med., 10:776, 1951.
- (8) Rigas, D.A., Li, J.G., and Osgood, E.E., Abstracts, Wes-- tern Society for Clinical Research, Seattle, Jan. 26-27, - 1951; Am. J. Med., 10:776, 1951.
- (9) Salk, J.E., J. Immunol., 49:87, 1944.
- (10) Li, J.G., and Osgood, E.E., Blood, 4:670, 1949.
- (11) Borjeson J., Chessin N.L. y Landy W. : "Dissociation of -- leukoagglutinin and transforming properties of phytohae-- magglutinin and transforming properties of phytohaemagglu tinin of lymphocytes with Vi. Polisacchariede. Int. Arch. Allergy. 31:184, 1967.
- (12) Nowell P.C. : "Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res. 20:462, 1960.

- (13) Lennox, B. : "Chromosomal abnormalities in man". Harrison, C.V. (dir.) : Recent Advances in Pathology, 8a. -- ed. I. & A. Churchill, Ltd., London, pp. 1-55, 1966.
- (14) Yunis, J.J. (dir.): "Human chromosome methodology". Academic Press, New York, 1965.
- (15) Hirschhorn, R., Briltinger, G., Hirschhorn, K. y Weissmann, G.: "Studies on lysosomes. XII. Redistribution of acid hydrolases in human lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin". J. Cell Biol., 37:412, 1968.
- (16) Cooperband, S.R., Bondevik, H., Schmid, K. y Mannick, J. A. : "Transformation of human lymphocytes: inhibition by homologous alpha globulin". Science, 159:1243, 1968.
- (17) Loeb, L.A. : "Induction of DNA polimerase in human lymphocytes by phytohaemagglutinin". Nat. Acad. Sci. 61, -- 3:827-834, 1968.
- (18) Ling, N.R. y Soothill, J.F. : "Lymphocyte transformation" Brit. Med. J., 2:1460, 1964.
- (19) Hirschhorn, K., Schreiberman, R.R., Bach, F.H. y Siltzbach, L.E. : "In vitro studies of lymphocytes from patients --- with sarcoidiosis and lymphoproliferative diseases". Lancet, 2:842, 1964.
- (20) Goldberg, M.L., W. Rosenau, and G.C. Burke, Federation -- Proc., 28:566, 1969.
- (21) Cameron, Gladys.- Tissue culture technique- Dept. of Biology Washington College. New York University. Academic -- Press. Inc. Ed., 1950.
- (22) McCoy, T.A., Maxwell, M., and Kruse, P.F. : Proc. Soc. -- Exper. Biol. & Med, 100:115-118, 1959.
- (23) Sharma, A.K. and Sharma, A. : Chromosome techniques theory and practice. Butterworths, London. p. 474, 1965.