

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES FAC. DE QUIMICA

“EFECTO DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA SOBRE LA INHIBICION DE OSTEOPONTINA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

SONIA MAYRA PEREZ TAPIA



MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON FALLA DE COPIA

275020



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.

Jurado asignado:

Presidente Prof. SATURNINO DE LEON CHAPA

Vocal Prof. ABEL GUTIERREZ RAMOS

Secretario Prof. IRIS C. ESTRADA GARCIA

1er. sup Prof. MISAEL GONZALEZ IBARRA

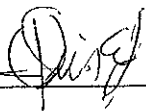
2o. sup. Prof. JORGE PANIAGUA SOLIS

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio de Inmunologia Molecular II.
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
Instituto Politécnico Nacional.

Asesor del Tema:

Dra. Iris Citlali Elvira Estrada García



Sustentante:

Sonia Mayra Pérez Tapia



DEDICATORIAS

A mi madre y hermano:

Por el amor y apoyo que me han dado a lo largo de toda mi vida.

A ella por su esfuerzo constante y a él por su confianza en mí.

Ustedes son los principales motivos de mi vida.

A mi abuela, abuelo (q.e.p.d.), tíos y primos:

Por haberme enseñado que la distancia no es un obstáculo para mantener el cariño y la unión de familia.

A Aliesha, Iliana, Marco, Diana, Gina, Tanya, Mariana, J. Carlos, Gustavo, Ricardo, Norberto, Belén, Miguel y Roberto:

Por las aventuras inolvidables que pasamos juntos. Les agradezco que en las buenas, las malas y la peores siempre estuvieron a mi lado.

A Frida:

Por que en ella encontré una amistad maravillosa, agradezco sus consejos y la oportunidad que me dió al formar parte de su familia

A Martín:

Con todo mi amor, por su apoyo incondicional, por ser mi mejor amigo, mi alegría y mi ejemplo de fortaleza.

Con todo mi cariño:

Mayra

Agradezco con todo mi afecto y de manera muy especial, a la familia Alcalá Espina por haberme recibido en el seno de su hogar . Lo que ustedes me aportaron es invaluable e inolvidable; siempre ocuparán un lugar privilegiado en mi corazón, en cualquier lugar en donde esté.

A la Dr. Iris Estrada García con todo mi respeto, cariño y admiración por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo a su lado, gracias por fomentar mi desarrollo profesional, por su atención y tiempo dedicado y sobre todo por haberse convertido en una de las principales y mejores influencias de mi vida.

Agradezco a la UNAM y al IPN por abrirme un camino lleno de conocimientos y experiencias, que, sinceramente creo; en ningún otro lugar hubiera podido encontrar.

CONTENIDO

Justificación del proyecto	1
Introducción	
Factor de Transferencia	
Historia	3
Definición de términos	6
Características generales del FT	7
Estructura química del FT	7
Especificidad del FT	8
Mecanismo de acción	9
Aplicaciones del FT	9
Osteopontina	
Generalidades	11
Localización	11
Características proteicas	12
Expresión y receptores de Opn	13
Función biológica	13
Objetivo General	15
Objetivo Particular	15
Metodologías	
Extracción y purificación de PBMNC	16
Activación de PBMNC con FT	18
Transcripción inversa PCR (RT-PCR)	20
Análisis de los productos de PCR en geles de agarosa al 2%	24
Resultados	25
Análisis de Resultados	29
Conclusiones	31
Bibliografía	32
Apéndice	37

JUSTIFICACION DEL PROYECTO

Desde 1957 se sabe que los dializados de extractos leucocitarios de donadores inmunes, transfieren la respuesta inmune celular, en una forma antígeno (Ag) específica, a personas no rectoras; es decir que existen moléculas dializables, que se encuentran en los linfocitos de individuos inmunes, que pueden transferir información o "instruir" a linfocitos vírgenes o no inmunes.

La naturaleza química exacta y los mecanismos que provocan estos efectos no han sido bien definidos; sin embargo, estos "factores de transferencia" (FT) han encontrado una amplia aplicación clínica, ya que la respuesta inmune que transfieren provee de beneficios, tanto profilácticos como terapéuticos, a pacientes que debido a una inmunidad celular deficiente, son susceptibles a padecer de infecciones causadas por gérmenes oportunistas, como virus, parásitos, bacterias y hongos.

En los últimos 2 años el uso del FT ha nivel mundial ha aumentado vertiginosamente, y de manera paralela la información acerca de él, sin embargo, en nuestro país su uso aún no es aceptado por muchos médicos, debido a que no se conoce su mecanismo de acción, provocando con ésto que la introducción al mercado nacional se haya visto un tanto limitada, y aún no se haya considerado como una alternativa de tratamiento para diversos padecimientos.

Los efectos benéficos que el FT presenta son innegables, y es por ésto que es fundamental investigar su modo de acción. Muchos de los estudios realizados desde que el FT se empezó a utilizar, se basan fundamentalmente en conocer su estructura química y pocos hay sobre su forma de acción. Este trabajo investigó el efecto que tiene el FT sobre las células mononucleares de sangre periférica (PBMNC) de individuos sanos y para ello se utilizaron PBMNC activadas con FT

nacional, producido en el Depto. de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N. El FT se utilizó a diferentes concentraciones para posteriormente analizar la presencia del RNAm de la β -actina y de la osteopontina (Opn) mediante la técnica de la transcripción inversa asociada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

INTRODUCCION

FACTOR DE TRANSFERENCIA

Historia

A principios de los años 40's Landstainer y Chase describieron por primera vez la transferencia de respuesta inmune celular (RIC) de un donador inmune a uno no inmune utilizando para ello células de exudado peritoneal de cobayos sensibilizados a tuberculina o cloruro de picrilo. Las células de los animales sensibilizados eran transferidas a los receptores no sensibilizados y éstos adquirían la capacidad de expresar la RIC de los donadores. Estudios posteriores en animales indicaron que la transferencia era mejor cuando se realizaba entre donadores y receptores que tuvieran alguna relación y sólo cuando se usaban células intactas y vivas. Las transferencias con células muertas o suero, no dieron resultado (Chase 1942).

En 1949 Lawrence demostró que era posible transferir la RIC en humanos, abriendo con ésto nuevas ramas en la investigación y el inicio en el desarrollo de nuevas formas de inmunoterapia.

Lawrence inicialmente utilizó para preparar el FT, linfocitos viables intactos de un individuo normal con una intradermoreacción (i.d.) positiva a la tuberculina. Con este FT inyectó a un individuo normal que no presentaba i.d. a la tuberculina, provocando que este individuo, al ser posteriormente retado con tuberculina, presentara una respuesta intradérmica positiva. Estas observaciones no causaron un gran impacto dentro de la comunidad científica de la época, debido en gran parte a que al linfocito no se le reconocía aún como una célula del sistema inmunológico, sino que era estudiado únicamente desde el punto de vista hematológico.

En 1955 Lawrence y col. demostraron que la hipersensibilidad cutánea tardía ó DTH (de las siglas en inglés de *delayed type hypersensitivity*) podía ser transferida utilizando extractos solubles de leucocitos provenientes de 20mL de sangre total. Al componente activo de estos extractos celulares se le llamó **factor de transferencia (FT)**. En estos experimentos Lawrence utilizó lisados de leucocitos de donadores que presentaban i.d. positivas a antígenos tales como la coccidiodina, el toxoide diftérico, la proteína M del estreptococo y el PPD. En todos los casos los receptores eran individuos con i.d. negativas a estos antígenos; pocas horas después de haber recibido el FT, los receptores eran capaces de presentar reacciones de DTH positivas a los antígenos que eran reconocidos por los donadores y el efecto parecía ser antígeno específico.

En 1963 Lawrence y col. dieron a conocer que el FT podía pasar a través de una membrana de diálisis con un corte molecular de 12,000 Da, complicando con ésto, aún más, el entendimiento de los mecanismos inmunológicos involucrados en la transferencia, ya que los investigadores no entendían cómo moléculas tan pequeñas eran capaces de transferir la RIC de manera antígeno específica. Esto provocó que aparecieran varias explicaciones: como que el FT funcionaba simplemente como amplificador de una sensibilización ya existente, ó que los dializados contenían fragmentos antigénicos altamente inmunogénicos (Petersen 1981).

La primera alternativa se descartó al realizar experimentos controlados con ratones y con antígenos sintéticos y la segunda aún no ha sido eliminada.

En los años que le siguieron a 1963, la investigación sobre el FT se vió estancada y fué hasta la década de los 70's donde resurgió, al demostrarse que ciertos síndromes de inmunodeficiencias podían reconstituirse utilizando FT (Levin

1970). En 1973 Levin demostró que el FT además de transferir la RIC, confería la capacidad de inducir la producción de linfocinas en respuesta a antígenos específicos, así como la resistencia a la infección en padecimientos con una inmunidad deficiente de carácter genético.

En la década de los 80's se realizaron numerosos estudios clínicos del efecto del FT en diversos padecimientos, observándose en la mayoría de ellos efectos benéficos (Fudenberg y Pizza 1993).

En los siguientes años, la investigación sobre el FT se enfocó al estudio de su estructura química, utilizando para ello diversas metodologías enzimáticas, químicas y fisicoquímicas (Kirkpatrick y Rozzo 1992).

Kirkpatrick y Rozzo emplearon en 1993 antígeno inmovilizado como "anzuelo" para capturar al FT, obteniendo con éste FT concentrado para posteriormente purificarlo por cromatografía líquida de alta presión (HPLC); en este trabajo también se desarrolló un modelo animal para seguir la purificación del FT específico, induciendo la induración del cojinete plantar de ratones no sensibilizados, y tratados con las diferentes fracciones purificadas.

En los albores del año 2000, el FT ha tenido un repunte impresionante, en diversos países del mundo se utiliza ampliamente como profiláctico, ofreciendo una alternativa a diversos tratamientos, o simplemente como única alternativa de tratamiento, como es el caso de la Hepatitis C.

Actualmente, utilizando la red de comunicación mundial (Internet), es fácil encontrar reportes clínicos e información general sobre el FT. Desgraciadamente, su naturaleza química exacta y su mecanismos de acción, aún no se conocen.

Definición de términos

Es común confundirse con los términos "extracto dializable de leucocitos" y "factor de transferencia", ya que desde el inicio de las investigaciones ambos fueron usados para definir una misma acción, entendiéndose actualmente que :

El extracto dializable de leucocitos (DLE) proviene del rompimiento del paquete de leucocitos ("buffy coat") de una pinta de sangre (450 mL), ó de células linfoides obtenidas del bazo, seguida de un proceso de diálisis donde se obtiene la fracción de bajo peso molecular que dializa.

Desde el principio se pensó que era el FT lo que le daba la actividad al DLE. Sin embargo, al analizar los DLE se encontró que éste contiene más de 200 especies químicas (contrario a lo que suponía Lawrence), y muchas de ellas tienen actividad biológica.

Ciertos componentes del DLE tienen un efecto no específico sobre la inmunidad celular, son antígeno independientes, y participan activamente en el fenómeno inflamatorio, algunos de estos son: prostaglandinas, nicotinamida, ácido ascórbico, histamina, serotonina, factores de diferenciación de linfocitos (timosina), quimioatrayentes para monocitos (quimiocinas) y factores inmovilizadores de neutrófilo (Wilson y Fudenberg 1983).

Por lo tanto quedará reservado el nombre de **factor de transferencia (FT)**, a los componentes del extracto dializable de leucocitos (DLE) que transfieren la respuesta de linfocitos T de una manera antígeno específica. La fracción antígeno específica contiene una multitud de diferentes factores de transferencia (FT's) que corresponden a la suma de las experiencias inmunes del individuo de donde se obtiene el extracto leucocitario dializado.

Características generales del FT

- Todos los FT's son moléculas de bajo peso molecular comprendido entre los 3,500 y 6,000 Da.
- El FT es lábil al calor, pero muy estable al frío, puede ser almacenado por varios años a temperaturas comprendidas entre -20°C y -70°C.
- Existe una interacción única y específica entre el FT y el antígeno que fué utilizado para inducirlo.

Estructura química del FT

La mayoría de los estudios indican que el FT contiene ribonucleótidos unidos a pequeños péptidos, originando una estructura de oligoribonucleopéptido. Hubo cierta discrepancia entre diversos investigadores de todo el mundo en lo que se refería a esta estructura, llegándose a la conclusión de que todo dependía de la forma en la que se obtuviese el FT. Tal parece que el péptido y el oligoribonucleótido se unen *in vivo* y el rompimiento de esta unión destruye su actividad biológica (Fudenberg 1993).

El consenso general es que el FT pesa entre 3,500 y 6,000 Da. Si en realidad existe un FT único para cada antígeno, entonces es posible que los factores de transferencia varíen estructuralmente de una manera muy similar a como lo hacen las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las regiones hipervariables de las inmunoglobulinas (Ig's) o del receptor de la célula T (TCR).

Considerando el peso molecular y la composición de los diferentes FT's aislados hasta el momento, es factible que cada factor contenga por lo menos ocho aminoácidos; por lo tanto, si consideramos las posibles combinaciones con

los 20 aminoácidos conocidos (aunque cabe mencionar que solo se han encontrado 18 de los 20, en FT's purificados), entonces deben existir varios millones de variaciones en la estructura primaria (8^{18}), y por lo tanto varios millones de FT's específicos para todos los diversos antígenos existentes (Kirkpatrick 1988).

Especificidad del Factor de Transferencia

Posiblemente una de las características más importantes y controvertidas del FT, sea que muestra especificidad, y ésta está dada por los antígenos utilizados para inmunizar al donador, o en forma más general, por los antígenos con los que ha tenido contacto. Lo anterior fué propuesto posterior a la realización de experimentos con antígenos sintéticos y microbianos.

La mayoría de los receptores no inmunes, adquieren RIC demostrable por DTH a la mayoría de los antígenos a los cuales los donadores responden, pero hay algunos antígenos a los que no responden. Aún más difícil de entender, es la adquisición de una respuesta en el receptor no inmune, a un antígeno al cual el donador da una prueba negativa (Kirkpatrick y col. 1985). En estos experimentos, se utilizaron grupos de ratones que se inmunizaron con diferentes antígenos, de cada grupo se preparó FT específico, con extracto dializado de los esplenocitos y éste se utilizó para sensibilizar ratones vírgenes. Después de 24h los animales receptores fueron retados con los diferentes antígenos empleados. Los ratones receptores solo reaccionaron a los antígenos con los que el donador había sido previamente inmunizado. Los controles utilizados en estos experimentos eran ratones que recibieron FT provenientes de animales no inmunes, estos animales no

presentaron DTH para ningún antígeno, por lo que quedó descartada una actividad de adyuvante en el FT (Petersen 1981).

Mecanismo de acción

Aunque el mecanismo de acción exacto no se conoce, se han propuesto varias hipótesis para explicarlo: una de ellas es que el FT forma parte del TCR, si ésto es cierto entonces el FT sería necesario para la activación de los Th, ya que la activación se efectúa al unirse el Ag a las MHCII de las células presentadoras de antígeno (APC). Esto se apoya en que el FT específico para PPD se une exclusivamente a PPD (Kirkpatrick 1993).

Otra hipótesis señala que el FT puede desbloquear o desreprimir poblaciones de linfocitos T, responsables de la inmunidad celular, y por lo tanto modular la misma. Ambas hipótesis aún no han sido comprobadas, haciendo falta realizarse más experimentos, ya que queda por explicarse de qué manera se puede transferir la inmunidad a un receptor previamente no respondedor, en una forma totalmente específica.

Aplicaciones del FT

El FT se ha utilizado clínicamente como un agente inmunoprolifático o inmunomodulador en diferentes padecimientos, como se muestra en la Tabla I.

El FT se administra por vía oral o parenteral, y en el mercado se puede adquirir en diversas presentaciones: tabletas, cápsulas, solución ó liofilizado.

No se han reportado efectos adversos después de su administración, y el costo del FT producido en nuestro país es mucho menor en comparación al del producido en otros lugares en el mundo.

TABLA I

I.- Inmunodeficiencias severas	
A.- Defectos congénitos	<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de Wiskott-Aldrich • Ataxia telangiectasia • Síndrome de inmunodeficiencia severa combinada • Síndrome parcial de Di George • Disgamaglobulinemia con defectos en inmunidad celular
II.- Enfermedades infecciosas	
A.- Hongos	<ul style="list-style-type: none"> • Candidiasis mucocutánea crónica • Histoplasmosis diseminada • Coccidioidomicosis diseminada
B.- Virus	<ul style="list-style-type: none"> • Citomegalovirus • Herpes zoster • Sarampión • Otros
C.- Micobacterias	<ul style="list-style-type: none"> • Tuberculosis • Lepra • <i>Mycobacterium fortuitum</i>
D.- Protozoarios	<ul style="list-style-type: none"> • Leishmaniasis cutánea
E.- Cáncer (principalmente cuando tiene etiología viral)	<ul style="list-style-type: none"> • Osteosarcoma • Hipernefoma • Cáncer de mama • Carcinoma nasofaríngeo
II.- Enfermedades autoinmunes	
A.- Enfermedades autoinmunes no órgano específico	<ul style="list-style-type: none"> • Lupus eritematoso crónico discoide • Síndrome de Behcet

Como se puede apreciar en la tabla anterior, los usos clínicos que se le han dado al FT han sido muy variados, utilizándose recientemente, en pacientes con SIDA con muy buenos resultados (Gottlieb & Sizemore 1995).

OSTEOPONTINA

Esta proteína es relativamente joven ya que las investigaciones sobre ella se han realizado en los últimos 10 años. Debido a que ha se ha aislado en diversas especies, y de diferentes tejidos ha recibido nombres tales como: 2ar, 2B7 mRNA, 44K BPP (bone phosphoprotein), 66KDa BPP, bone sialoprotein-1, Eta-1 (early T lymphocyte activation protein 1), M11, Spp-1, transformation-associated secreted phosphoprotein, transformation related phosphoprotein, tumor secreted phosphoprotein, urinary stone protein y uropontina.

Localización

La osteopontina (Opn) es una proteína de adhesión ubicada en la matriz extracelular, es abundante en hueso, donde es sintetizada por los preosteoblastos, osteoblastos y osteoclastos que se encuentran en la fase mineralizada de la matriz ósea. En células osteoblásticas, la expresión del RNAm de Opn es regulado positivamente por factores de diferenciación y factores de crecimiento tales como: el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF β) y la proteína morfogénica de hueso (BMP-7). Otras vías de inducción de síntesis son: estrés que promueva la formación de hueso, y hormonas osteotrópicas como el ácido retinóico y la vitamina D3, que promueven la resorción y remodelación ósea (Rodan 1995).

Esta proteína se encuentra en grandes cantidades en la leche, en orina y se ha encontrada también en células malignas. La Opn se considera una citocina, ya que es secretada por macrófagos activados y representa la molécula más abundantemente secretada por los linfocitos T activados. Es expresada

constitutivamente por líneas de linfocitos inmaduros dobles negativos (Weber 1996).

En la rata, la Opn se encuentra en grandes cantidades en el riñón, y en el ratón se han detectado altos niveles de expresión de esta citocina en médula ósea, tejido epitelial especializado, incluyendo túbulos renales potsnatales y embriónicos, *epitelio uterino; también es sintetizada por odontoblastos.*

Características proteicas

La Opn es una proteína de carácter ácido, fosforilada, rica en ácido siálico y capaz de unir Ca^{2+} , contiene una secuencia señal de secreción. Sus múltiples interacciones con el Ca^{2+} , probablemente influyen en su conformación, pudiendo formar parte importante en procesos mediados o dependientes de Ca^{2+} .

Probablemente existe en isoformas específicas en cada tejido, que pudiesen tener funciones celulares particulares; ésto se apoya en que se han encontrado diferentes fragmentos de la proteína, unidos a trombina, y existen evidencias que sugieren que dicha unión puede ser importante en la regulación de la función de la proteína. La Opn en hueso es extremadamente heterogénea y difiere de la que se encuentra en leche, en que la primera tiene 28 residuos completamente fosforilados. Las células renales de rata secretan tanto la forma fosforilada como la no fosforilada y ambas tienen diferentes propiedades fisiológicas.

Las diversas formas de la proteína parecen estar reguladas de manera de distinta en células normales y células transformadas, a través de mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales que son regulados por hormonas osteotrópicas, factores de crecimiento y factores promotores de tumores, como el 12-0-tetradecanoil-forbol-13 acetato (Mukherjee 1995).

Expresión y Receptores de Opn

El gene que codifica para la Opn ha sido mapeada en el humano al cromosoma 4q y en el ratón al cromosoma 5. La proteína contiene una secuencia de Arg-Gly-Asp (RGD), la cual funciona como una secuencia de adhesión celular que reconoce a la integrina $\alpha V\beta 3$ (receptor de vitronectina). Mediante experimentos de mutagénesis dirigida sobre esta secuencia, se obtuvo una Opn recombinante mutada en esta secuencia; esta proteína perdió su capacidad de adhesión celular. La Opn también parece unirse a otras integrinas tales como $\alpha V\beta 5$ y la $\alpha V\beta 1$ (Sanger 1996), y actualmente se sabe que también puede ser ligando de CD44.

Esta última interacción: Opn-CD44 participa en la quimiotaxis, dependiendo de la presentación de la osteopontina, ya sea en forma soluble o inmovilizada. La secreción de osteopontina y la expresión de CD44 causan la migración de células tumorales a sitios específicos de formación de metástasis (Weber 1997).

Función Biológica

La Opn tiene un amplio espectro de actividades, sin embargo no todas están relacionadas con células en desarrollo, remodelación y reabsorción de hueso. Las otras involucran reclutamiento y estimulación de macrófagos y linfocitos, como parte de la respuesta no específica a infecciones bacterianas. Diferentes líneas celulares de macrófagos murinos y macrófagos peritoneales muestran diferentes niveles de expresión del gen de osteopontina.

La unión de Opn a CD44:

- 1) Induce actividad quimiotáctica provocando la migración de los macrófagos.

2) El estallido respiratorio y la actividad de la óxido nítrico sintetasa son suprimidas, posiblemente como protección contra daño al tejido durante la migración macrofágica (Weber 1996).

3) Incrementa la proliferación de linfocitos B y la generación de inmunoglobulinas.

Después de la transformación de fibroblastos y células epiteliales, se ha observado un incremento en la secreción de osteopontina, y éste se correlación frecuentemente con carcinogénesis.

La Opn se encuentra involucrada en la inflamación granulomatosa a través de la regulación de la migración de histiocitos. También se ha demostrado que se encuentra involucrada en la calcificación de las placas ateroscleróticas (O'Brien 1994).

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la preparación llamada "factor de transferencia" (FT), que se produce en la ENCB/IPN, sobre células mononucleares de sangre periférica obtenidas de individuos sanos.

OBJETIVO PARTICULAR

Identificar que genes se encienden o apagan en células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos estimuladas in vitro con FT aplicando la técnica de RT-PCR.

METODOLOGIAS

Durante el desarrollo de este trabajo se emplearon 3 metodologías principales:

1.- Extracción y purificación de células mononucleares de sangre periférica (PBMNC).

2.- Activación de PBMNC con FT

3.- Transcripción inversa- PCR (RT-PCR)

Estas se muestran en el diagrama de trabajo en la siguiente página, y se detallan a continuación:

1.- EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMNC).

- Obtener 10 mL de sangre periférica utilizando heparina como anticoagulante.

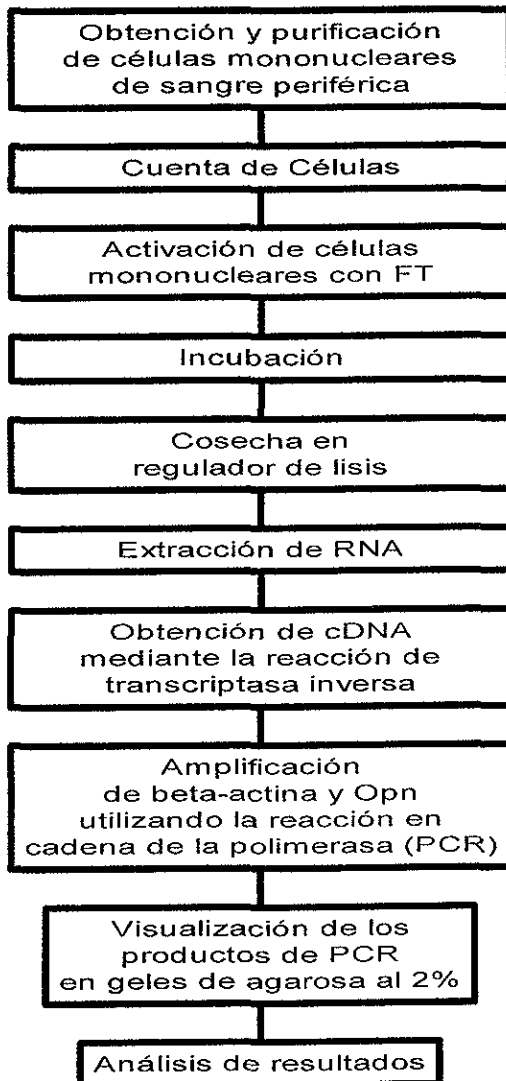
- Diluir la sangre 1:2 con solución de Hank's (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) 1X. Estratificar cuidadosamente la sangre diluida en Lymphoprep (Sigma, St. Lois Missouri, MO, USA) utilizando un tubo cónico de 50 mL estéril. Cuidar que la proporción usada sea de 3mL de Lymphoprep por cada 7 mL de sangre.

- Centrifugar a 1,500 rpm durante 30 min.

- Aspirar cuidadosamente las células mononucleares localizadas en la interfase formada entre los glóbulos rojos y el plasma y transferirlas a un tubo cónico de 50 mL nuevo y estéril .

- Adicionar 30 mL de solución de Hank' s (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) 1X para romper el gradiente de Lymphoprep y lavar las células.

DIAGRAMA DE TRABAJO



- Centrifugar a 1,200 rpm durante 15 min.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el botón de células en 20mL de sol. de Hank's 1X.
- Centrifugar a 800 rpm durante 10 mín.
- Repetir los dos pasos anteriores.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 1mL de medio AIMV (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA).
- Contar las células utilizando la cámara de Neubauer y una dilución 1:10 de las células en azul tripano (ver apéndice).

2.- ACTIVACION DE PBMC CON FACTOR DE TRANSFERENCIA

Se utilizaron cajas de cultivo de 96 pozos con fondo en U estériles (Nunc)

- En cada pozo se sembraron un total de 2×10^5 PBMC, contenidas en 150 μ l de medio AIMV. Se estudiaron cinco variables por triplicado, utilizando para ello 15 pozos por placa y un total de 3×10^6 células por experimento ($2 \times 10^5 \times 15$ pozos).

Se utilizaron 3 lotes diferentes de factor de transferencia (FT) producidos en el Depto. de Inmunología, de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del IPN.

Lote 100497

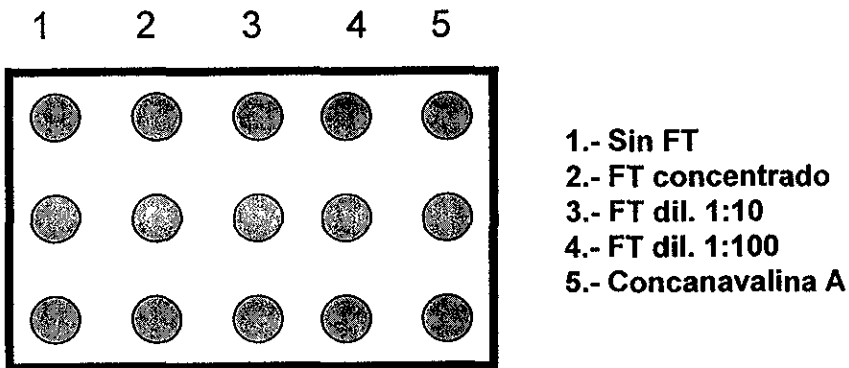
Lote 650397

Lote 1M0397

Agregar en cada pozo, según sea el caso (ver esquema No. 1) las soluciones correspondientes, contenidas todas en un volumen de 50 μ l, para obtener un volumen final de 200 μ l en cada pozo. Consultar apéndice .

•Una vez agregadas las soluciones en cada pozo, incubar a 37°C y 5% presión parcial de CO₂ durante 6 horas.

Esquema No. 1



*Sólo se esquematizan los pozos que se ocuparon en la placa de 96.

Cosecha celular

• Una vez transcurrido el tiempo de incubación, centrifugar la placa de cultivo a 1,500 rpm durante 10 minutos.

• Eliminar el sobrenadante en cada pozo.

•Adicionar 200µl de regulador de lisis frío (ver apéndice) por pozo y resuspender el botón de células formado.

•Unir los 200µl de regulador de lisis correspondientes a la misma variable en un tubo Eppendorf de 1.5mL. De ésta manera se obtuvieron un total de 6×10^5 células lisadas en un total de 600µl de regulador de lisis frío.

• La muestra puede ser almacenada en éste paso a -70°C en caso de no ser procesada inmediatamente.

3.- TRANSCRIPCIÓN INVERSA-PCR (RT-PCR)

A) EXTRACCIÓN DE RNA CON FENOL ÁCIDO-CLOROFORMO PARA ANÁLISIS DE RT-PCR.

Todo el proceso debe realizarse manteniendo siempre la muestra en hielo.

- Añadir a cada 600 μL de lisado que contiene el RNA:
 - 1.- 50 μL de acetato de sodio 2M frío y agitar en vortex 30 seg
 - 2.- 500 μL de fenol ácido (pH 4.3 Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) frío y agitar en vortex 30 seg
 - 3.- 100 μL de cloroformo (Merck 8547) y agitar en vortex 1 min
- Dejar la muestra en hielo durante 15 minutos, agitando vigorosamente cada 5min
- Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min
- Remover la fase acuosa sin tocar la interfase (aprox. 400 μL). Este paso debe realizarse con sumo cuidado para no contaminar el RNA extraído con DNA.
- Precipitar el RNA con un volumen igual de alcohol isopropílico frío (aproximadamente 400 μL).
- Incubar la muestra -70°C por 1 h o en nitrógeno líquido por cinco minutos (para acelerar la precipitación del RNA). En caso de no llevarse a cabo la transcripción inversa en este punto se puede almacenar la muestra a -70°C hasta su uso.

B) TRANSCRIPCIÓN INVERSA DE mRNA

- Centrifugar la muestra a 14,000 rpm durante 20 min para recuperar el RNA.

- Decantar el sobrenadante, con cuidado de no llevarse el precipitado de RNA.

- Añadir 800 μ L de etanol (grado reactivo) al 80 % en agua-DEPC (ver apéndice) y agitar suavemente.

- Centrifugar a 14,000 rpm durante 1 min y decantar el sobrenadante. Eliminar el exceso de etanol sin tocar el total de RNA.

- Repetir los dos pasos anteriores.
- Secar en la estufa a 37°C de 10 a 15 min.
- Resuspender el precipitado seco en 13 μ L de Agua-DEPC aspirando y regresando el RNA varias veces para asegurar su disolución.

- Añadir 2 μ L de la solución concentrada de 5mg/mL de oligo dT (Gibco BRL Oligo dT₁₂₋₁₈).

- Incubar a 65°C por 10 min, en el termociclador (Hybad Omn-E).
- Sacar y colocar en hielo 5 min.
- Agregar 15 μ L de mezcla de reacción (*) para obtener cDNA (volumen final de 30 μ L).

- Centrifugar durante 10 seg para mezclar todos los componentes de la reacción.

- Continuar la reacción en el termociclador con las siguientes temperaturas:

TEMPERATURA	TIEMPO
37°C	1 hora
95°C	5 minutos

*Mezcla de reacción para cDNA

Solución		Concentración final
Agua --DEPC	3.8 μL	
5X 1 st Strand Buffer Gibco BRL 18427-013	6.0 μL	1X
dNTP's 10 mM Gibco BRL 10297-018	1.2 μL	400 μM
MMLV-RT 200 U/ μL Gibco BRL 28025-013	1.0 μL	200 U/ μL
DTT 100 mM Gibco BRL 18418-012	3.0 μL	10 μM

- Terminada la reacción agregar 70 μL de Agua-DEPC para obtener un volumen final de 100 μL . De este cDNA se tomaron 5 μL para hacer el PCR.
- Mantener en congelación el cDNA hasta su utilización.

C) RT-PCR

- Utilizar 5 μL del cDNA diluido anteriormente y adicionar 45 μL de la mezcla de reacción** para PCR obteniendo un volumen final de 50.0 μL .

***Mezcla de reacción para PCR**

Soluciones	volumen	Conc. Final
Agua-DEPC	35.3 μ L	
Regulador 10X PCR	5.0 μ L	1X
MgCl ₂ 50mM	2.5 μ L	2.5mM
dNTP's 10mM Gibco BRL 10297-018	1.0 μ L	200 μ M
Primer 5' 20 μ M	0.5 μ L	0.2 μ M
Primer 3' 20 μ M	0.5 μ L	0.2 μ M
Taq polimerasa 5U/ μ L Gibco BRL 10342-620	0.2 μ L	1-2.5 U/ μ L
cDNA	5.0 μ L	

- Adicionar a cada tubo de reacción 40 μ L de aceite mineral.
- Llevar acabo la reacción de PCR en el termociclador (Hybad Omn-E) con los siguientes parámetros.

No.de ciclos	Temperatura	Tiempo
30	94°C	45 segundos
	60°C	45 segundos
	72°C	90 segundos
1	72°C	7 minutos

Los iniciadores o "primers" utilizados para este trabajo fueron:

β -actina humana

5': TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA

3': CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG

Tamaño del producto: 661 pb

Osteopontina (Opn)

5': GAAGCTTTACAGCCTGCACC

3': GCTTGTGTACTAGCAGTGACGG

Tamaño del producto: 297 pb

D) ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR EN GELES DE AGAROSA AL 2%

- Preparar agarosa (*low eeo*) al 2% en TBE 1X (ver apéndice).
- Agregar a la agarosa 5 μ L de bromuro de etidio (sol. conc. 10mg/mL) por cada 100mL de agarosa.
 - Colocar la agarosa en las placas de electroforésis y dejar polimerizar por lo menos 1 hora.
 - Llenar la cámara con regulador TBE 1X. Por cada 100mL de TBE 1X se adicionan 5 μ L de bromuro de etidio (sol. conc. 10 mg/mL).
 - Mezclar 1 μ L de colorante para la muestra (ver apéndice) con 5 μ L de producto del PCR y colocarla en el pozo correspondiente.
 - Se utiliza un marcador de peso molecular como referencia (1Kb ladder GIBCO) del cual se colocan 2 μ L en el primer carril del gel.
 - Correr el gel utilizando un corriente de 80-100 V durante aproximadamente 1 hora (dependiendo del tamaño del gel), cuidando que los productos no se salgan del gel. Observar en un transiluminador.

RESULTADOS

En las figuras 1, 2, y 3 se muestran consecutivamente los resultados obtenidos del análisis de los productos de PCR utilizando los lotes de FT No. 100497, 650397 y 1M0397.

En las tres figuras los carriles 1,2,3,4,5 y 6 nos muestran un producto de aproximadamente 700 pb, el cual es el peso esperado para la amplificación del gene que codifica para la β -actina. En el carril 6, en todas las figuras se corrió el producto de la PCR para este gen, que funcionó como control interno de reacción.

En la figura1, a partir del carril 7, se observan las bandas correspondientes a la amplificación del gene que codifica para la Opn. Es claramente visible como en el carril 8, que corresponde a las PBMNC activadas con FT concentrado, la intensidad de la banda disminuye notablemente. Los carriles 12 y 13 se utilizaron como controles de reacción para Opn, negativo (agua) y positivo (β -actina), respectivamente.

En las figuras 2 y 3 el orden de los carriles se conserva, observándose el mismo comportamiento en el carril 8, correspondiente a las PBMNC activadas con FT concentrado. En ambas figuras, la banda de OPN no se observa, y vuelve a aparecer conforme disminuye la concentración de FT utilizada. El carril 12 de las figuras 2 y 3 corresponde al control negativo de reacción.

Fig. 1

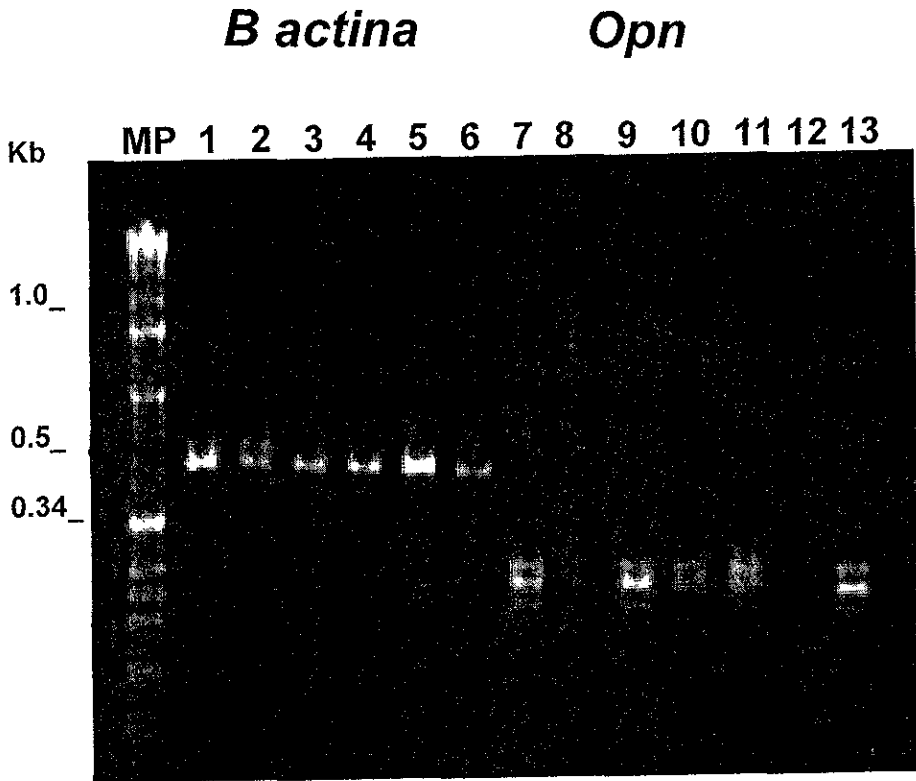


Fig. 1. Expresión de mRNA para beta-actina y Opn en PBMNC estimuladas durante 6 hr con FT producido en la ENCB No. de lote 100497. Se utilizaron 600,000 células para obtener el cDNA, el cual se amplificó, ocupando para ello iniciadores específicos. 1. células sin FT, 2 células con FT concentrado, 3 células con FT dil 1:10, 4 células con FT dil 1:100, 5 cel. con ConA, 6 control +beta actina, 7 cel. sin FT, 8 cel. con FT concentrado, 9 cel. con FT dil. 1:10, 10 cel. con FT dil. 1:100, 11 cel. con ConA, 12 control negativo Opn, 13 control positivo Opn.

Fig. 2

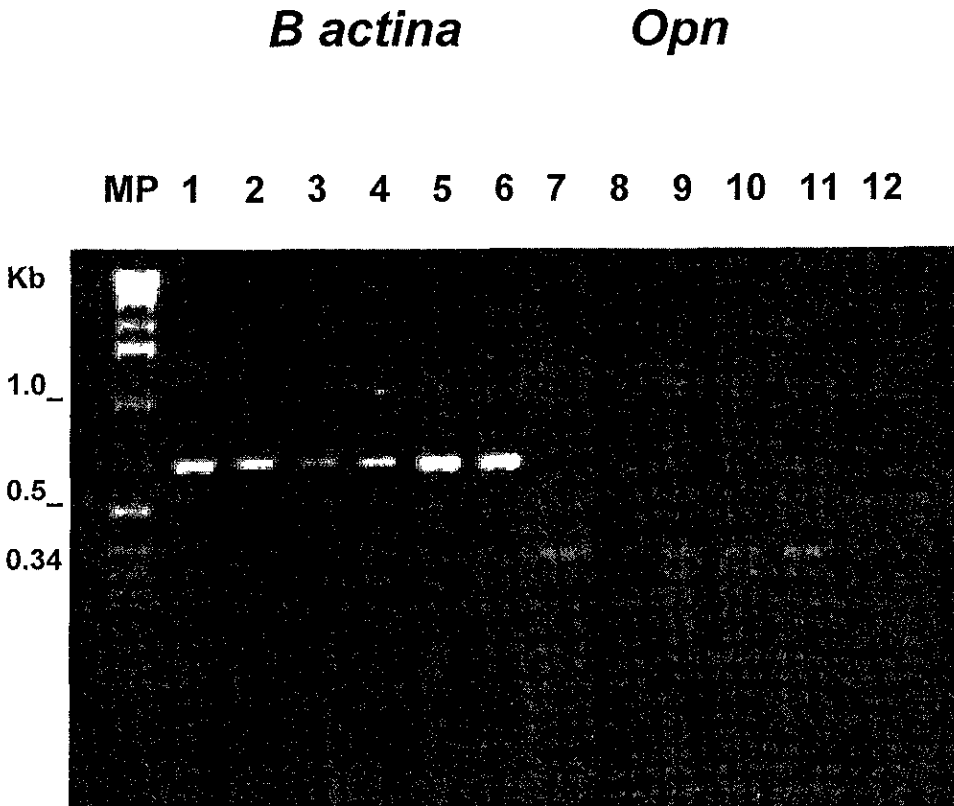


Fig. 2. Expresión de mRNA para beta-actina y Opm en PBMNC estimuladas durante 6 hr con FT producido en la ENCB No. de lote 650397. Se utilizaron 600,000 células para obtener el cDNA. el cual se amplificó ocupando para ello iniciadores específicos. 1.células sin FT, 2 células con FT concentrado, 3 cel con FT dil 1:10, 4 células con FT dil 1:100,5 cel. con ConA, 6 control + beta-actina, 7 cel. sin FT, 8 cel. con FT concentrado, 9 cel. con FT dil. 1:10, 10 cel. con FT dil. 1:100, 11 cel. con ConA, 12 control negativo Opm.

Fig. 3

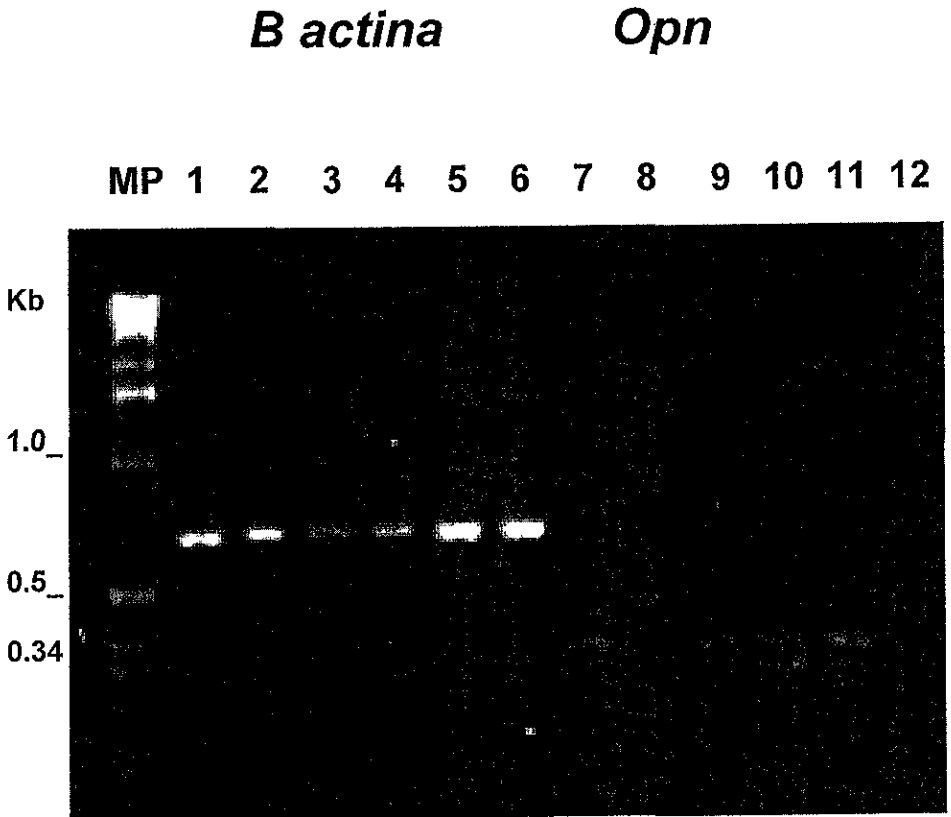


Fig. 1. Expresión de mRNA para beta-actina y Opn en PBMNC estimuladas durante 6 hr con FT producido en la ENCB No. de lote 1M0397. Se utilizaron 600,000 células para obtener el cDNA. el cual se amplificó ocupando para ello iniciadores específicos. 1.células sin FT, 2 células con FT concentrado, 3 células con FT dil 1:10, 4 células con FT dil 1:100,5 cel. con ConA, 6control + B actina, 7 cel. sin FT, 8 cel. con FT concentrado, 9 cel. con FT dil. 1:10, 10 cel. con FT dil. 1:100, 11 cel. con ConA, 12 control negativo Opn.

ANALISIS DE RESULTADOS

El efecto que se presenta en la banda de osteopontina es claramente visible: a altas concentraciones de FT, la banda de Osteopontina no se encuentra presente o se encuentra notablemente disminuida y conforme disminuye la concentración de FT, la banda aparece nuevamente; es decir el efecto es dependiente de la concentración.

Es importante mencionar que dicho efecto se mantuvo en los tres lotes de FT analizados (100497, 650397 y 1M0397), indicando con ésto, que el efecto es constitutivo del FT. Dichos lotes de FT, provenían de personas diferentes y fueron preparados en diferentes fechas.

Al buscar la expresión de una molécula constitutiva, que en este caso es la β - actina, nos aseguramos de que las células se mantuvieron viables durante el cultivo al que fueron sometidas; por lo tanto, antes de realizar la PCR para osteopontina, primero siempre se verificó la presencia de esta banda.

La osteopontina se expresó fuertemente tanto en las PBMNC que contenían concanavalina A , como en las que solo contenían el medio de cultivo, lo cual nos indica que dicha expresión es independiente de la activación celular y que es expresada constitutivamente por algunos (o todos) los grupos celulares que conforman las PBMNC.

Conociendo las propiedades biológicas que se le atribuyen a la osteopontina, es relevante el hecho, de que el FT sea capaz de inhibirla, ya que *así se podrían formular varias hipótesis acerca de su mecanismo de acción, tales como que:*

a).- El FT favorecería al estallido respiratorio y la actividad de la óxido nítrico sintetasa provocando con esto una activación macrofágica y favoreciendo

la eliminación de microorganismos. Esto se basa en reportes que indican que la Opi inhibe el estallido respiratorio (Weber 1996).

b).- Muchos artículos reportan que la osteopontina es una molécula supresora, el hecho de que el FT la inhiba, se interpretaría como que el FT está activando de manera directa a las células que la producen, inhibiendo su síntesis, e indirectamente modulando la respuesta inmune.

Aún es mucho lo que queda por hacer en el campo de la investigación sobre el FT, entre más se sepa acerca de los efectos que éste tiene sobre las células del sistema inmune, en este caso representadas por las PBMNC, se esclarecerá más rápidamente su mecanismo de acción y por lo tanto se aceptará su uso más ampliamente.

CONCLUSIONES

- El factor de transferencia inhibe la expresión de osteopontina en PBMNC cultivadas *in vitro*.
- La inhibición se realiza de manera dosis- dependiente; a mayor concentración del FT, mayor inhibición en la expresión de Opn.
- El efecto de inhibición es reproducible, ésto se comprobó al utilizar diferentes lotes de FT.

BIBLIOGRAFIA

Cabezas-Quiroga R, Estrada-Parra S, Abdo-Rodríguez A, Selman-Housein Sosa S, Chávez Sánchez R, Estrada-García I, Berrón-Pérez R, Fernández-Ortega C, Herrera Rojas A M, Araña Rosainz J; 1996. Inmunoterapia con Factor de Transferencia. Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas, Centro de Investigaciones Biológicas, Cuba, y Escuela Nacional de Ciencia Biológicas del I.P.N., México. Cabezas Quiroga R y Estrada Parra S. **Inmunoterapia con factor de transferencia 1996.**

Chase MW. 1942. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **49:688**

Denhardt DT. 1995. Osteopontin-induced modifications of cellular functions. *Ann. NY Ac Sci* **760:127-142.**

Estrada-Parra, S.; O. Velasco–Castrejon, F. Rébora; M.L. Díaz y J. Padierna 1983.

Inmunoterapia de la tuberculosis pulmonar avanzada con factor de transferencia específico. *Salud Pública de México* **25:589-599.**

Fudenberg HH.1989. Transfer factor: Past, present and future. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **29:**

Fudenberg HH & Pizza G.1993. Transfer factor 1993: New frontiers. *Progresses in Drug Research*. Vol **42: 309-400**

Gottlieb AA, Sizemore RC, Gottlieb MS & Kern CH.1995. Rationale and clinical results of using leucocyte-derived immunosupportive therapies in HIV disease. *Biotherapy* **9**:27-31.

Horton Ma. 1995 Interactions of osteopontin with osteoclastos integrins. *Ann NY Acad Sci* **760**: 190-200.

Katagiri Y I. 1995. Functional analysis of the osteopontin molecule. *Ann NY Acad Sci* **760**: 371-374.

Kirkpatrick CH. & JI Gallin. 1974. Treatment of infections and Neoplastic diseases with transfer factor. *Oncology* **29**: 46-73.

Kirkpatrick CH, SJ Rozzo & JJ Mascali.1985. Murine transfer factor II. Transfer of delayed hypersensitivity to synthetic antigens. *J Immunol* **134**:1723-1727.

Kirkpatrick CH, S.J. Rozzo & J.J. Mascali 1985. Murine transfer factor III. Specific Interactions between transfer factor antigen. *J Immunol* **135**:4027-4033.

Kirkpatrick CH. 1988. Transfer factor. *J.Aller Clin Immunol* **81**: 803-813

Kirkpatrick CH & Rozzo SJ. 1992. Purification of transfer factors. *Mol. Immunol* **29**:167-182.

Kirkpatrick CH. 1993. Structural nature and functions of transfer factors. *Ann NY Acad Sci* **685**:362

Kirkpatrick CH, R Hamad & LC Morton 1995. Murine transfer factors. Dose response relationships and routes of administration. *Cell Immunol* **164**:203-206

Landstainer K. & Chase MW. 1942. Experiments on transfer of cutaneous sensitivity to simple compounds. *Proc Soc Exp Biol Med* **49**:688-690

Lawrence HS. 1949. The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin in man. *Proc Soc Exp Biol Med* **71**:516-519.

Lawrence HS. 1955. The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leukocytes. *J Clin Invest* **34**: 219

Lawrence HS. & Ascher MS. 1974. *In vitro* properties of leukocyte dialysates containing transfer factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. **71**:1178-1182

Levin AS. 1973. Transfer factor therapy in immune deficiency states. *Ann. Rev. Med.* **24**:175-208.

Levin AS.1970. Wiskott-Aldrich syndrome, a genetically determined cellular immunology deficiency: clinical and laboratory responses to therapy with transfer factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **67**:821-828

Liaw L., M. Skinner, E. Raines. R. Ross, D. Cheresh,. S. Schwartz, C. Giachelli. 1995. The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. J Clin Invest **95**:713-724.

Mukherjee BB. 1995. Interaction of osteopontin with fibronectin and other extracellular matrix molecules. Ann NY Acad Sci **760**:201-212.

Nabel G. , Greenberger JS, Sakakeeny M and Cantor H. 1981. Multiple biologic activities of a cloned inducer T-cell population. Proc. Natl. Acad. Sci. **78**:1157-1161.

O'Brien ER., Garvin MR, Stewart DG, T. Hinohara, B. Simpson. S.M. Schwartz, C. Giachelli. 1994. Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. Arteriosclerosis Thrombosis **14**:1648-1656.

Patarca R., Freeman GF, Singh SP, Wei FY, Durfee T. Blattner T. Regnier DC, Kozak CA, Mock BA. Morse HC. Cantor H. 1989. Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. J Exp Med **170**:145-161.

Petersen EA, Greenberg LE, Manzara T, Kirkpatrick CH. 1981. Murine transfer factor I. Description of the model and evidence for specificity. *J Immunol* **126**:2480-2484.

Rodan GA. 1995. Osteopontin overview. *Ann NY Acad Sci* **760**: 1-5

Rozzo JF, Merryman & Kirkpatrick CH. 1988. Murine transfer factor. IV Studies with genetically regulated immune responses. *Cell Immunol* **115**:130-145

Viza D., Vich JM, Phillips J, Rosenfeld F & Davies DA 1986. Specific transfer factor protects mice against lethal challenge with Herpes simplex virus. *Cell Immunol* **100**:555-562

Wilson GB & Fudenberg HH. 1983. Is controversy about transfer factor therapy nearing an end? *Immunol Today* **4**:157-161

Weber GF, Askhar S, Glimcher MJ & Cantor H. 1996. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* **271**:509-512.

Weber GF. & Cantor H. 1996. The Immunology of Eta/Osteopontin. *Cytokine and Growth Factor* **7**:241-248.

APENDICE

Agua DEPC 0.1%

Dietilpirocarbonato (Sigma)	100 μ L
-----------------------------	-------------

Preparar en una campana de extracción. En un matraz Erlenmeyer colocar 99.9 mL de agua desionizada y adicionar el dietilpirocarbonato, agitar durante 2 horas, utilizando un agitador magnético y esterilizar en autoclave (121 ° C) durante 15 minutos.

Azul Tripano

Azul tripano (Sigma)	0.16 g
----------------------	--------

NaCl (Merck)	0.85 g
--------------	--------

En 100 mL de agua destilada adicionar el azul tripano y solubilizar, posteriormente adicionar el NaCl y agitar hasta su disolución. Guardar en un frasco ámbar y en un lugar fresco.

Citrato de Sodio 1M

Citrato de sodio (Merck)	29.41g
--------------------------	--------

En un matraz Erlenmeyer colocar 70 mL de agua desionizada y agregar el citrato de sodio, agitar hasta su completa disolución. Adicionar agua desionizada hasta completar un volumen de 100 mL . Esterilizar en autoclave (121 ° C) 15 minutos.

Regulador de lisis:

Isotiocianato de guanidinio (Gibco) 4M	5mL
Citrato de sodio (Merck) 1M	125 μ L
2-mercaptoetanol (Sigma)	45 μ L
Sarcosyl 10% (Sigma)	250 μ L

Mezclar los volúmenes correspondientes en un tubo de 10 mL y agitar ligeramente.

IMPORTANTE: El regulador debe de prepararse en el momento en que se va utilizar.

Regulador de la muestra de PCR

Para 20 mL:

Tris-HCl pH 8 1M	4.8 mL
EDTA pH 8 (Sigma)	960 μ L
Glicerol estéril 70%	1.71 mL
Azul de bromofenol 1%	1.2 mL
Agua destilada estéril	11.37 mL

Mezclar todos los componentes perfectamente y distribuir los 20 mL finales en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Conservar a -20° C.

Sarcosil 10%

N-lauril sarcosina (SIGMA)	2.5 g
----------------------------	-------

Disolver en 25 mL de agua desionizada y esterilizar en autoclave 15 minutos.

ESTA TESIS
SALIR DE LA
NO DEBE
BIBLIOTECA

TBE 10X

Para preparar 1 L:

Tris base (Merck)	108.0 g
Acido bórico (Merck)	55 g
EDTA (Merck)	7.44 g

En un matraz Erlenmeyer de 1 L, colocar 700 mL de agua desionizada y disolver el Tris base, el ácido bórico y el EDTA. Una vez disueltos completar a un volumen final de 1000mL.

Para preparar TBE 1X para uso en geles, sólo diluir la solución anterior 1:10 con agua desionizada y adicionar 5 μ L de bromuro de etidio (sol. conc. 10 mg/mL) por cada 100 mL de TBE 1X.

Tris base pH 8

Para 250 mL:

Trizma base (Merck)	30.275 g
---------------------	----------

Disolver llevando a $\frac{3}{4}$ partes del volumen final y ajustar el pH a 8 utilizando HCl concentrado. Aforar a 250 mL y esterilizar en la autoclave (121 ° C/15 min). Se debe tener cuidado al ajustar el pH porque esta cerca del pK_a del Tris.