

2434



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

Z A R A G O Z A

CARACTERIZACION DEL FACTOR INDUCTOR A LA APARICION DE RECEPTORES  $F_c$  ( $F_cRI$ ) EN CELULAS DE MEDULA OSEA, EXISTENTE EN VARIOS MEDIOS DE ORIGEN MURINO Y PURIFICACION PARCIAL DE ESTE FACTOR A PARTIR DE ORINA HUMANA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

MAXIMINO GERARDO WALDO HERNANDEZ

1 9 8 6



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 está 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.

## ABREVIATURAS

- E.A. : Eritrocitos activados (eritrocitos-cubiertos con anticuerpos).
- E.C. : Eritrocitos de carnero.
- L.P.S : Lipopolisacárido de bacterias Gramm negativas.
- M.C. : Medio condicionado.
- M.G.I : Macrophage and Granulocyte Inducer
- O.H. : Orina Humana.
- P.B.S : Solución salina amortiguada de fosfatos.
- C<sub>3</sub> : Tercer factor del complemento.

## INDICE

- 1.- PROYECTO INICIAL APROBADO
- 2.- INTRODUCCION
  - 2.1 CINETICA CELULAR
  - 2.2 CULTIVO CELULAR
  - 2.3 ANTECEDENTES SOBRE CULTIVO CELULAR
  - 2.4 LINEAS SEMICONTINUAS DE CELULAS
  - 2.5 LINEAS CONTINUAS DE CELULAS
  - 2.6 MEDIOS DE CULTIVO
  - 2.7 CARACTERISTICAS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO
  - 2.8 FUENTES INDUCTORAS DE LA DIFERENCIACION CELULAR
  - 2.9 PRODUCCION DE MGI
  - 2.10 PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE MGI
  - 2.11 METODOS DE PURIFICACION DEL MGI
  - 2.12 RECEPTORES DE MEMBRANA
  - 2.13 FISIOLOGIA DEL RINON
  - 2.14 GENERALIDADES DE URINA
- 3.- FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA
- 4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
- 5.- OBJETIVOS
- 6.- HIPOTESIS
- 7.- MATERIALES Y METODOS
  - 7.1 MATERIAL Y EQUIPO
  - 7.2 MATERIAL BIOLOGICO
- 8.- METODOS Y TECNICAS I
  - METODOS Y TECNICAS EMPLEADAS EN LA CARACTERIZACION DEL FACTOR INDUCTOR DE LA FORMACION DE SITIOS RECEPTORES - DEL Fc EN CELULAS DE MEDULA OSEA (FcRI)
  - 8.1 TECNICAS BIOQUIMICAS
    - 8.1.1 PROCEDIMIENTO DE SEPARACION BASADOS - EN EL PESO MOLECULAR
    - 8.1.2 DIALISIS
    - 8.1.3 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA CON SEPHADEX-G-50

**8.2. PROCEDIMIENTO DE SEPARACION BASADO EN LA CAR --  
GA ELECTRICA**

**8.2.1 ELECTROOBTENCION**

**8.2.2 DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE --  
FcRI POR ULTRACENTRIFUGACION**

**8.3 TECNICAS ESPECTROFOTOMETRICAS PARA DETERMINA --  
CION DE PROTEINAS**

**8.3.1 METODO DE LOWRY MODIFICADO PARA DETER --  
MINAR PROTEINA**

**8.3.2 METODO DE BRADFORD MODIFICADO PARA --  
DETERMINAR PROTEINA**

**8.3.3 DETERMINACION BIOLÓGICA-ESPECTROFOTO --  
METRICA DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE --  
LA LISOZIMA**

**8.4 METODOS Y TECNICAS PARA LA DETERMINACION DE LA  
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA PROTEINA INDUCTORA --  
A RECEPTORES Fc**

**8.4.1 TECNICA PARA OBTENER CELULAS DE MEDU --  
LA OSEA DE RATON**

**8.4.2 TECNICA DE ROSETAS**

**8.4.3 DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE MGI**

**8.4.3.1 TECNICA DE LA BICAPA**

**9.- METODOS Y TECNICAS II**

**METODOS Y TECNICAS EMPLEADAS EN LA PURIFICACION PAR --  
CIAL DEL FcRI A PARTIR DE M.C., WR19.1 Y ORINA HUMANA**

**9.1 ENSAYO CON CELULOSA FOSFATO**

**9.2 EXISTENCIA DE FcRI EN ORINA HUMANA**

**9.3 BUSQUEDA DE UN METODO A PEQUEÑA ESCALA PARA --  
LA PURIFICACION DE FcRI A PARTIR DE ORINA HU --  
MANA (O.H.)**

**9.4 PURIFICACION PARCIAL DE FcRI DE ORINA HUMANA --  
MEDIANTE UNA COLUMNA DE DEAE-CELULOSA**

**9.5 DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DEL FcRI DE --  
O.H. DEL ELUIDO DE LA COLUMNA DE DEAE-CELULOSA**

**9.6 DETERMINACION DEL pH ISOELECTRICO DEL FcRI DE --  
O.H. DEL CONCENTRADO DE DEAE-CELULOSA**

## 10.- RESULTADOS

10.1 CARACTERIZACION DEL FACTOR INDUCTOR DE LA -  
FORMACION DE SITIOS RECEPTORES DEL Fc EN CE -  
LULAS DE MEDULA OSEA (FcRI)

10.1.1 DIALISIS

10.2 DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DEL FcRI DE-  
M.C.

10.2.1 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA CON - --  
SEPHADEX G-50

10.3 DETERMINACION DE pH ISOELECTRICO DEL FcRI DEL  
M.C.

10.3.1 ELECTROENFOQUE

10.4 DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DEL FcRI DEL  
M.C. POR ULTRACENTRIFUGACION

10.5 PURIFICACION PARCIAL DEL FcRI A PARTIR DE M.C.  
WR19.1

10.5.1 ENSAYO CON CELULOSA FOSFATO

10.5.2 EXISTENCIA DE FcRI EN ORINA HUMANA

10.6 BUSQUEDA DE UN METODO A PEQUENA ESCALA PARA -  
LA PURIFICACION DEL FcRI A PARTIR DE O.H.

10.7 PURIFICACION PARCIAL DEL FcRI DE ORINA HUMANA -  
NA MEDIANTE UNA COLUMNA DE DEAE-CELULOSA

10.7.1 DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR -  
DEL FcRI DE O.H. DEL ELUIDO DE LA -  
COLUMNA DE DEAE-CELULOSA

10.7.2 DETERMINACION DEL pH ISOELECTRICO -  
DEL FcRI DE O.H. DEL CONCENTRADO DE  
DEAE-CELULOSA

11.- DISCUSION , CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

12.- APENDICE

13.- BIBLIOGRAFIA



ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS  
PROFESIONALES "ZARAGOZA".

COORDINACION DE Q.F.B.

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

\*REGISTRO DE TEMA DE TESIS\*

- 1.- Nombre del solicitante MARILINO REYERD MAZCO HERNANDEZ
- 2.- No. Cuenta 7345828-9 3.- Año en que termina la carrera 1980
- 4.- Título del Tema CARACTERIZACION DEL FACTOR INDUCCION A LA ACTIVIDAD OSEA, EXISTENTE EN VARIOS TIPOS DE OJIGOS INTERIORES Y EXTERIORES.
- 5.- Asesor del Tema REPLICACION PARCIAL DE UNO DE LOS FACTORES INDUCIDOS DE LA OSEA.
- 6.- Lugar en el que se desarrollará el trabajo experimental LABORATORIO DE BIOLOGIA CELULAR UNAM ZARAGOZA.
- 7.- Domicilio del solicitante Calle 18 Lote 5 Urb. 148 Valle de los Reyes La Paz Edo. de México.  
Teléfono ---
- 8.- Observaciones. \_\_\_\_\_

9.- Proyecto.

- a. Título.
- b. Area Especifica del Proyecto.
- c. Personas que participan (alumno/s) asesor (es).
- d. Fundamentación de la elección del Tema.
- e. Planteamiento del problema.
- f. Objetivos
- g. Hipótesis de trabajo.
- h. Material y métodos.
- i. Bibliografía que apoya el proyecto.
- j. Cronograma de actividades.

México, D.F. a 10 de agosto de 1980.

\_\_\_\_\_  
Asesor

[Firma]  
Coordinador de  
Investigación.

[Firma]  
Sustentante.

[Firma]  
Coordinador de la  
Carrera.

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

## CINETICA CELULAR.

La cinética celular es la rama de la biología celular - que estudia los hechos dinámicos del crecimiento, declinación, movimiento y control de la población celular y del ciclo celular, diferenciándose profundamente de los hechos morfológicos o descriptivos.

El concepto del ciclo celular introducido por Wintrobe- (1) es decisivo para la comprensión del desarrollo de los tejidos tumorales.

El ciclo celular se define como el intervalo entre el punto medio de la mitosis de una célula y el punto medio de la mitosis siguiente de la misma célula (17,18) Fig. 1.

En el ciclo celular se pueden identificar cuatro fases: mitosis (M), fase 1 ( $G_1$ ), síntesis de DNA (S) y fase 2 ( $G_2$ ) - la mitosis se puede apreciar con el microscopio electrónico - y la fase S con autorradiografía, pero tanto  $G_1$  como  $G_2$ , que no pueden demostrarse directamente, se identifican como intervalos antes o después de la mitosis y de la síntesis de DNA.

La fase  $G_1$  es el tiempo que transcurre desde el final de la mitosis hasta que empieza la síntesis de DNA. En esta fase la célula elabora las sustancias precisas para desarrollar la función a que está destinada. Un aspecto fundamental es la iniciación de la síntesis de proteínas y de RNA para posibilitar el tránsito de  $G_1$  a S.

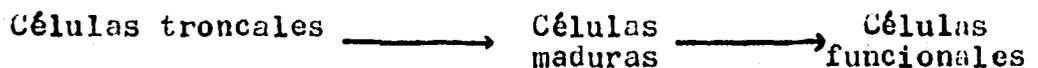
La fase S se inicia cuando, la célula es capaz de sinte



- a. Células cíclicas, que se dividen continuamente.
- b. Células en reposo (Go), han abandonado el ciclo celular pero pueden ser estimuladas para la síntesis de DNA y la mitosis.
- c. Células no divisibles. Estas han abandonado el ciclo celular de un modo definitivo.

Las células de los comportamientos a) y b) se dividen - en células troncales y células no troncales, según sean o no capaces de mantener la integridad y la continuidad de cualquier tejido celular.

Un aspecto decisivo para comprender el crecimiento de los tejidos y su homeostasis depende de los tipos celulares - que se han reportado (8,9,11).



Las características que se reportan de las células - troncales son las siguientes: son capaces de proporcionar - células diferenciadas y células maduras. Estas son capaces - de autorreproducirse y asegurar la diferenciación de las es - tirpes celulares y su maduración. En ellas se pueden encon - trar las posibilidades entre un tejido normal y uno neoplá - sico.

Las células maduras, se encuentran en el momento de ad - quirir las características propias de las células funciona - les, éstas ya han alcanzado todas las características que - las hacen aptas para adaptarse y responder a los requerimien

tos funcionales propios del tejido a que pertenecen.

Por medio de la producción de células los tejidos aumentan su tamaño, pero los requerimientos generales homeostáticos exigen que ocurra la destrucción celular pertinente para mantener el equilibrio tisular. (11,12).

### CULTIVO CELULAR

El éxito más notable en el campo de la diferenciación celular fué la introducción de los cultivos de tejidos. Con estas técnicas se ha logrado el aislamiento de líneas celulares individuales de los tejidos linfoides y hematopoyético, así como la diferenciación de varios estados de desarrollo de células precursoras de estos tejidos (3), se han estudiado, los mecanismos de inmunidad in vitro (4,5), se han analizado la interacción de células de diferentes tejidos y otro factor que aumenta su utilidad es su importancia en los estudios sobre transformación de las células troncales, en células no troncales ó malignas, etc.

### ANTECEDENTES SOBRE CULTIVO CELULAR

Aunque los cultivos de tejidos hematopoyético se intentaron desde 1885 por Wilhelm Roux, que empleó solución salina como medio y placa medular de embrión de pollo, fueron Burrow y Carrel, los que crearon líneas celulares que fueron mantenidas por 34 años introduciendo así el cultivo de tejido en el campo experimental.

Al principio, los cultivos de tejidos se hacían suspendiendo fragmentos de los tejidos en los medios nutritivos. Muchas de las células de esos fragmentos sobrevivían y algunas hasta proliferaban. Estos cultivos tenían la ventaja de que podían mantenerse por períodos largos y el inconveniente de que era imposible observar el efecto individual o fenómenos que sufrían las células al diferenciarse.

Las modificaciones que se les hicieron se refieren a - que los pequeños fragmentos se fijaron sobre la pared de los tubos por medio de plasma coagulado sobre ellos (cultivo de "monocapa" Carrel 1923) y de esta manera se pudieron ver directamente al microscopio las células que se desarrollan a - partir del fragmento, así como efectos citopáticos.

Fue Enders quien introduce la técnica del tambor rotatorio. Los tambores giran lentamente y de este modo los fragmentos quedan, durante unos minutos, sumergidos en el líquido nutritivo y luego, durante un tiempo semejante, quedan - fuera de él. (11).

En técnicas más modernas se utilizan células tripsinizadas. Los tejidos normales tomados de órganos humanos o de - animales, se tratan con sustancias disgregativas como la - tripsina, que separan a las células (fácilmente) del tejido conjuntivo. Este método permite aprovechar una mayor cantidad de células más uniforme, a más de que se puede precisar su número. Las células así obtenidas se pueden hacer crecer en cultivos primarios. Es decir, directamente después de la-

tripsinización, pero hay circunstancias en las que conviene tomar los cultivos que esten creciendo activamente y dividirlos en varios cultivos secundarios o subcultivos. No importando el método que se utilice, el objeto es poder obtener en forma regular un número suficiente de células que crezcan en la pared de los recipientes. (11,12,16).

#### LINEAS SEMICONTINUAS DE CELULAS.

De los cultivos primarios y de los secundarios se pueden hacer subcultivos por varias generaciones. Al principio, dichas generaciones conservan el cariotipo cromosómico, es decir, las características genéticas del tejido original.(6)

A veces, las células diploides humanas retienen su sensibilidad durante muchos pases, aunque después mueren. Son células que pueden dar lugar, durante su fase de crecimiento logarítmico, a grandes cantidades de células que se pueden conservar a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  y luego ser utilizadas.

Tras la repetición de muchos pases, las células pierden su característica diploide y se transforman en heteroploides es decir que tienen números desiguales de cromosomas, y al sufrir este cambio se altera también su sensibilidad. (7,10)

#### LINEAS CONTINUAS DE CELULAS

Es relativamente fácil cultivar indefinidamente líneas continuas de células mediante subcultivos.

Con varias de estas líneas han venido haciendo subcultivos por un buen número de años, Son células heteroploides, y aunque algunas de ellas se originaron a partir de órganos normales, han adquirido después las características de las células malignas, lo que hace que nunca se empleen en la preparación de vacunas etc. Entre las líneas más conocidas, las denominadas HeLa, HEp2 y KB, se originaron a partir de tumores malignos. Entre las procedentes de tejidos normales, la línea L de Earle de ratón, la RKB de riñón de conejo y la LLCMK2 de riñón de mono. (8,9,10,13).

#### MEDIOS DE CULTIVO

Existen medios naturales (suero, plasma, colágena, linfa, sangre, suero placentario, líquido amniótico, líquido ascítico, líquido pleural, humor acuoso ), y otros extractos de tejidos y medios artificiales como son: las soluciones salinas (Ringer 14), que son las aún comunmente usadas para que las células permanezcan en ellas por unos minutos (cuando son "lavadas"), que son isotónicas e impiden cambios bruscos de pH como la empleada de Hanks (1946) y de Dulbecco (1954) que es una solución salina amortiguada de fosfato o "PBS" (apéndice), hasta el que provee los componentes esenciales como es el desarrollado por Eagle (1955) que contiene aminoácidos, vitaminas, glucosa como fuente de energía y rojo fenol como indicador de pH (apéndice).

Es usual la combinación de medios sintéticos con medios

naturales, por ejemplo, medios esenciales a los cuales se le adiciona suero en proporciones variables (15), esto es para que crezcan normalmente, pues no se han determinado ciertos factores específicos. A los medios de cultivo se añaden en porcentajes variables, más usualmente a los tejidos de mamíferos, sueros de caballo, becerro y de humano (14).

### CARACTERISTICAS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

#### A. Factores ambientales:

1. Temperatura. Para células de mamíferos se usa entre 37 y 38.5°C. Sobreviven pocas células por arriba de ese valor, pero por debajo de este rango las células resisten mejor.

2. Presión Osmótica. A 38°C, entre 6 y 7 atm, está determinada básicamente por sales y secundariamente por moléculas como la glucosa. Las células parecen resistir bien los cambios del orden del 10%, sobre todo si son lentos.

3. pH. El rango de supervivencia es entre 6.6 y 7.8. El óptimo es entre 7.2 y 7.4.

4. Iones inorgánicos. Además de los involucrados en la presión osmótica y el pH, destacan: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Fe<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup>, PO<sub>4</sub><sup>=</sup>.

#### 5. Metabolitos.

a) Esenciales: carbohidratos, gases disueltos, aminoácidos, vitaminas, proteínas.

b) Suplementarios: aminoácidos, vitaminas, coenzim

mas, nucleótidos, péptidos.

6. Hormonas y otros factores específicos.

7. Matriz de crecimiento. Los sustratos son bidimensionales o bien hay crecimiento en suspensión, ya que en células in vitro no hay fuerzas de orientación (11,14,19).

El metabolismo de células en cultivo es similar al de las células in situ en animales (17,18,19) los caminos energéticos son la vía de la glicólisis y el ciclo de Krebs. Dentro del metabolismo de las proteínas, se conocen 12 aminoácidos esenciales (17) los restantes son sintetizados por transaminación, desaminación hidrolítica o desaminación oxidativa.

Los lípidos y ácidos nucleicos son usados del medio, si éstos se proveen en él (11, 14).

#### FUENTES INDUCTORAS DE LA DIFERENCIACION CELULAR

En el estudio de la hematopoyesis se ha investigado con amplitud la formación de colonias de granulocitos y macrófagos a partir de tejidos hematopoyéticos de mamíferos en agar y en medios semisolidos (4,5,20,21). Estas células requieren la presencia de una sustancia inductora conocida en la literatura como Colony Stimulating Factor, (CSF) (6,7,22,23), Colony Stimulating Activity, (CSA) (5,24,25), Macrophage and Granulocyte Inducer (MGI) (26,27,28) que probablemente tiene relación estrecha con el llamado Macrophage Growth Factor, - MGF (23). La sustancia inductora MGI, es indispensable para-

la diferenciación in vitro, y se cree que juega el papel de regulador fisiológico in vivo: tanto en animales como en el hombre (5).

#### PRODUCCION DE MGI.

Las diferentes fuentes de MGIs se resumen en la tabla 1. Se ha utilizado frecuentemente medio condicionado de fibroblasto embrionales (29), explantes primarios de tejidos (5, 21, 25, 30), o líneas celulares establecidas (25). En general los fibroblastos, como células primarias o como líneas celulares establecidas, proveen las mejores y más convenientes fuentes de MGI en medios condicionados (23). Se han realizado "extracciones" directas en muchos tejidos de ratón para revelar actividad de MGI endógena, entre ellos: timo, médula ósea, bazo, hígado, pulmón, cerebro, testículos (29), encontrando actividad diferenciadora marginal o no encontrando ninguna en absoluto. En contraste, Sheridan (6, 22) encontró cantidades extraíbles de MGI en glándula submaxilar de ratones machos, pulmón, timo, riñón, nódulos linfáticos, páncreas y médula ósea; pero encontraron fuentes pobres de MGI en cerebro, corazón, intestino delgado, testículos, músculo esquelético, sangre entera y suero normal. Bradley et al (29) mostraron que el pulmón, útero, placenta, membranas fetales, músculo esquelético, corazón y vejiga, mostraron niveles altos de MGI mientras que cerebro, glándula salival, hígado, riñón adulto, testículos, piel, timo, bazo o glándulas adre-

nales casi no tenían actividad diferenciadora.

El suero de ratones ha mostrado actividad diferenciadora bajo ciertas condiciones (31). También se ha demostrado la presencia de MGI en suero humano, tanto en individuos normales como leucémicos (32). Otra fuente potente de MGI es la orina de ratón (33) y la humana (34). Esta última ha sido usada para la estimulación de cultivos de médula ósea de ratón. También los leucocitos de sangre periférica puede producir MGI (24,35).

Otra fuente importante de MGI desarrollada últimamente, es el medio condicionado proveniente de líneas celulares tumorales humanas (36) y murinas (25), la tabla 2 muestra la producción de MGI por varias de estas líneas.

Una de las fuentes más importantes de MGI resulta de la activación con endotoxinas de tejidos o líneas celulares in vitro (37,38), y otra activación de la región peritoneal de ratones. Este es el caso de suero de ratón (37), pulmones (22) células peritoneales (5), linfocitos (6). Entre las endotoxinas se encuentran los lipopolisacáridos de bacterias Gram-negativas. Conocida como LPS, que produce una amplia variedad de efectos farmacológicos y tóxicos en muchos tejidos, que semejan cambios ocurridos durante ciertas infecciones bacterianas (39), además de evocar la producción de anticuerpos específicos (40). Los estudios químicos de LPS derivados de Salmonella, Escherichia y Shigella entre otros, han proporcionado la estructura detallada de estos compues -

tos, revelando que posee una región polisacárida formada con los antígenos O-específicos y el "núcleo" y una región lipídica llamada lípido A (41).

Los granulocitos neutrófilos y monocitos están involucrados en la resistencia contra infecciones, y en consecuencia se han hecho estudios sobre el efecto de la endotoxina en el nivel y actividad proliferativa de las poblaciones precursoras de granulocitos y macrófagos, y se ha visto que producen una elevación en los niveles de MGI (2,7).

Además de la elevación de los niveles de MGI por inyección de LPS en ratones, se ha encontrado un aumento similar en los cultivos in vitro (5,6,7). En líneas leucémicas mieloides la incubación de éstas con LPS induce la diferenciación de éstas células hacia granulocitos, diferenciación que va acompañada de una secreción elevada de MGI (25,42). En la tabla 2 se muestra el efecto de la incubación de líneas tumorales con LPS sobre su producción de MGI.

#### PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE MGI

Este factor ha sido parcialmente purificado y caracterizado en muchas de las fuentes antes descritas. Sin embargo el proceso de purificación de la molécula ha presentado dificultades debido a su aparente heterogeneidad en peso molecular y propiedades químicas (17,36,43,44). Se ha señalado que es posible que se requieran diferentes MGIs para la formación de varias subpoblaciones de células hematopoyéticas,

existiendo por una parte aquellas que tienen una respuesta aritmética con respecto a la dosis y que promueven la formación de colonias de macrófagos; y otras con una respuesta logarítmica, estimulando el crecimiento de granulocitos neutrófilos y macrófagos. Sin embargo se ha sugerido (32) que el estimulador es único y que la diferente respuesta está en función de la dosis.

#### MÉTODOS DE PURIFICACION DEL MGI.

Se han utilizado procedimientos de diálisis, liofilización y evaporación en vacío sin pérdida aparente de actividad del MGI (34,24). Se ha encontrado que la respuesta del medio condicionado aumenta después de la diálisis debido a la eliminación de sustancias inhibitorias.

La filtración con geles ha sido usada tanto para caracterizar como para purificar medios condicionados conteniendo MGI (24,30,31,34,36,43,44). La cromatografía de intercambio iónico ha demostrado también su utilidad para la purificación de MGI (24,34,44,45) aunque el pico de actividad biológica tiende a ser amplio y la ganancia de actividad baja (44).

Diversas técnicas, revelan la presencia de varias proteínas diferenciadoras, con pesos moleculares muy distintos, variando desde los muy bajos, de 1 300 daltones (46) y 5000- (34) hasta pesos mayores de 100 000 Daltones (30,47).

Se ha purificado MGI de orina humana (34), con un peso molecular de 45 000 a 60 000 Daltones. Landau y Sachs (48) han purificado MGI de una línea clonada de fibroblasto de ratón, con un peso molecular de 70 000 Daltones. Watson y Pichard (49) a partir de línea tumoral JLS-V5 obtuvo un peso de 75 000 Daltones, Burgess (45) lo purificó de medio de pulmón de ratón con un peso aproximado de 30 000 Daltones. Fojo (47), utilizando medio condicionado de pulmón humano -- reporta dos pesos distinto, de 200 000 Daltones y de 40 000-Daltones.

Las propiedades químicas de los purificados parciales -- también parecen ser diferentes (34,43,44,24). Estas diferencias pueden deberse tanto a diferencias funcionales como -- a condiciones inadecuadas de cultivo.

**TABLA 1. FUENTES DE OBTENCION DE MGI**

<b>MEDIO CONDICIONADO</b>	<b>EXTRACTOS TISULARES</b>	<b>OTRAS FUENTES</b>
Fibroblastos embriona <u>rios</u> (48)	Glándula salival (29)	Suero normal (32)
Fibroblastos transfor <u>mados</u> por SV40 (25, 48)	Riñón adulto (6,31)	Suero con en <u>dotoxinas</u> - (37)
Fibroblastos transfor <u>mados</u> espontáneos	Bazo (29)	Suero leucémi <u>co</u> (32)
	Utero grávido (6)	Orina humana (33)
Células de riñón (23)	Pulmón (29)	Orina murina (33)
Pulmón de ratones (23)	Placenta (23)	
Linfocitos estimula <u>dos</u> por mitógenos	Líquido de ascitis (23)	
Leucocitos de sangre <u>periférica</u> (23)	Exudado peritoneal (23)	
Macrófagos peritonea <u>les</u> (5)		
Células 3T3 (23)		
Células L (23)		
Placenta humana		
Células de bazo de ra <u>tón</u> estimuladas con mi <u>tógeno</u>		
Células tumorales mono <u>cíticas</u> humanas (36, 25)		
Células tumorales mono <u>cíticas</u> murinas (25)		

**TABLA 2. PRODUCCION ESPONTANEA E INDUCIDA DE MGI POR LINEAS CELULARES TUMORALES (a)**

Línea Celular	Producción de MGI Espontánea (b)	Producción de MGI con LPS (c)
<b>Mielomonocíticas</b>		
WHLI-3	121 ± 8	10
<b>Macrófagas</b>		
PU5-1.8	0	55
P388D1	0	78
J774	0	56
RAW264	0	6
<b>Mastocitomas</b>		
P815	0	0
<b>Mesoteliomas</b>		
BALTNMs201	68 ± 4	-
<b>Fibrosarcomas</b>		
L929	96 ± 2	-
<b>Fibroblastos medulares</b>		
JLSV9	160 ± 11	-
JLSV9-RLV	170 ± 7	-
<b>Linfomas-T</b>		
EL4	0	0
S49	0	0
RBL-5	0	0
P1798	0	0
F22.WC-2	0	0

TABLA 2. CONTINUACION

Línea Celular	Producción de MGI Espontánea (b)	Producción de MGI con LPS (c)
BALENTL5	0	0
BW5147	0	0
Mielomas		
P3	0	0
MoPC315	0	0
Linfomas		
RBL-3	140 ± 16	126
L1210	24 ± 2	92
RS	0	57
RAW309.1	0	0
C1498	0	0
ABPL1	0	0
ABPL2	0	0

a. Según Ralph, Broxmeyer, Malcolm, Moore, Nakoinz (25)

b. Colonias por  $77.5 \times 10^4$  células de médula ósea de ratón - estimuladas por .1 ml de sobrenadante de las líneas celulares, en 1 ml cultivos en agar. Los cultivos de líneas - celulares fueron iniciados con  $2 \times 10^5$  células/ml, coleccionando los sobrenadantes cuando los cultivos alcanzaban -  $10^6$  células/ml. El número de colonias es la media más/menos el error standard.

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

## RECEPTORES DE MEMBRANA.

Los receptores superficiales son de importancia obvia para la actividad biológica de los leucocitos. Se han identificado receptores para la porción Fc de la IgG, receptores para el complemento y receptores no específicos (50).

La función de los receptores superficiales en los leucocitos consiste aparentemente en incrementar la respuesta inmune celular. Estudios morfológicos recientes de las interacciones macrófago-linfocitos en la respuesta inmune a un antígeno dado, proveen una oportunidad para poder apreciar las correlaciones en la estructura y función para estos receptores de membrana (50).

Un macrófago activado, se obtiene mediante la inyección de un irritante extraño, generalmente en la cavidad peritoneal del animal (51). El macrófago activado es capaz de incrementar su capacidad microbicida (52), que trae como consecuencia; un aumento en las siguientes funciones: en la endocitosis (53,54,55), en la expansión y adherencia (54,56), de la citotoxicidad (60,61,62), en la actividad para proliferar in vitro (63,64), en las enzimas lisosomales (65), en la capacidad de ingerir EC (54,55) en su volumen celular (58,66,67), en su actividad quimiotáctica (58,66) y en el metabolismo de la glucosa (69,70), y una disminución de la actividad de la 5'Nucleotidasa en la membrana (54,59).

Sin embargo no todos los agentes utilizados para la activación de los macrófagos producen los efectos arriba mencionados (70,60).

Las inmunoglobulinas unidas a bacterias, han mostrado selectividad a la adherencia y fagocitosis elevando la acción bactericida del macrófago (71,72,73).

El papel de los anticuerpos en la medición selectiva de la fagocitosis, depende de la unión o de la región del anticuerpo para reconocer el sitio, o el receptor sobre la membrana del macrófago. Además las IgG aparentemente enlaza in-situ específicamente a los microorganismos a través de la porción variable de sus regiones Fab y la unión a la superficie del macrófago por medio del segmento Fc (74,75).

Los receptores para las IgG son importantes para combatir infecciones parasitarias (76,77).

Además de su función en la eliminación de agentes extraños, los receptores de superficie para las inmunoglobulinas (receptores Fc), aparentemente funcionan en la eliminación fisiológica de los eritrocitos viejos por medio de los macrófagos (78). Estos eritrocitos son opsonizados por inmunoglobulinas autólogas in situ, promoviendo consecuentemente la fagocitosis por macrófagos hepáticos y esplénicos (79,80,81)

Los receptores para Fc son comúnmente demostrados por medio de la técnica de formación de rosetas eritrocitarias. Cuando los eritrocitos son cubiertos con anticuerpos (EA), que se unen a la superficie del leucocito, dan lugar a lo

que se ha denominado rosetas (82).

La actividad para receptores Fc, se puede considerar - que existe cuando tres o más eritrocitos se adhieren a la - membrana del leucocito.

Existen otras técnicas menos comunes para la valoración de estos receptores, y pueden ser detectados indirectamente - con fluoresceinatos de anticuerpos (83), o por medio de ra - dioisótopos (84,85,86).

La afinidad de los macrófagos por complejos con antígenos formados por la IgG ha sido caracterizada, lo que indica que los enlaces dependen sobre un receptor con un número finito de sitios activos.

Los complejos inmunes se combinan más ávidamente, posiblemente porque ofrecen un número adicional de receptores Fc por complejo molecular (87,88,89), o porque ellos inducen - cambios conformacionales en los componentes del Fc (90,91).

Un macrófago presenta sobre su superficie de  $10^5$  a  $10^6$  receptores Fc. La regeneración o conservación selectiva de - estos receptores después de la unión con complejos inmunes, puede ser un fenómeno que esté en relación al tamaño, o a la cantidad total del material ingerido (92).

Los factores del complemento tienen una función importante en la eliminación selectiva de los patógenos invasores por medio de los macrófagos, de igual forma la adherencia - secuencial de los productos del complemento a partir del tercer componente, dan lugar a una mayor susceptibilidad a la -

ingestión por estas células (93). La importancia biológica - de este sistema, es evidente en aquellos pacientes con una - deficiencia hereditaria o con metabolismo anormal del factor del complemento  $C_3$ . Estos pacientes son susceptibles a in - fecciones bacterianas recurrentes (94,95), que ordinariamen - te pueden ser controladas por los fagocitos en presencia de suero normal (96). La importancia del complemento o de los - receptores para Fc, en el incremento del poder bactericida - de los fagocitos polimorfonucleares ha sido demostrada in - vitro (97,98).

Es posible que los receptores para el complemento, regu - len la inhibición de la migración de los macrófagos por endo - toxinas (99). Esta influencia podría ser efectuada por facto - res que se sabe son generados por el complemento y el siste - ma de coagulación sanguínea y los cuales pueden actuar sobre la membrana plasmática para inducir la activación de los ma - crófagos (55).

La actividad de los receptores para el complemento, ha - sido también demostrada por la técnica de rosetas, utilizan - do para este fin EA más un suero como fuente de complemento (100).

Se sabe que los eritrocitos recubiertos con IgM son in - capaces de unirse a los macrófagos, pero cuando estos eritro - citos son incubados en presencia de un componente del comple - mento o suero fresco, dan lugar a esta unión (93,101).

Los métodos de enlace para el  $C_3$  han sido aplicados en-

el estudio de neoplasias linfoides (102), que evalúan la especificidad para los receptores del macrófago por el complemento.

Los receptores del complemento, juegan un papel importante en el incremento de la endocitosis mediada por los receptores para Fc (103). Además los polimorfonucleares, monocitos y macrófagos peritoneales inducidos con gel de almidón (104,105), ingieren EA más eficientemente en presencia de complemento a concentraciones limitadas de anticuerpos. Apparently tal incremento es una propiedad que caracteriza generalmente la actividad superficial de los fagocitos.

La secuencia de maduración de las células hematopoyéticas ha sido caracterizada tradicionalmente por una serie de cambios notorios en la morfología de las células. Sin embargo, muy poco ha sido hecho para definir la diferenciación de los leucocitos sobre la base de la adquisición de receptores sobre la membrana celular, ya que la célula madre conforme se diferencia, va adquiriendo diferentes marcadores (106).

Los marcadores y receptores de superficie, han probado ser de gran valor a este respecto, pero hasta la fecha muy pocos estudios que utilicen la presencia de marcadores particulares de membrana en el proceso de diferenciación celular (107).

Hämmerling et al (108), son los pioneros de este campo y han mostrado que hay un distinto orden de aparición de receptores o marcadores de membrana durante la diferenciación-

de linfocitos "T" y "B". Además, los estudios hechos sobre -  
cultivos de leucocitos de tipo leucémico y normal de médula-  
ósea, han indicado la aparición de marcadores, o receptores-  
del complemento  $C_3$  y de la porción Fc de la IgG, dichos as -  
pectos pueden estar íntimamente relacionados con el proceso-  
de diferenciación celular (109).

La expresión incompleta de marcadores en cultivo de neu-  
trofilos, presenta un bloqueo en su diferenciación, este -  
bloqueo selectivo puede deberse a la insuficiente concentra-  
ción del factor inductor de la diferenciación: MGI. Por lo -  
tanto es posible que el MGI esté limitando sus efectos en la  
primera semana de cultivo, impidiendo la completa expresión-  
de los receptores de membrana. Por lo que se puede pensar, -  
en una correlación entre la maduración morfológica y la ex -  
presión de los marcadores celulares.

Lotem (110) determinó que esta secuencia podía ser uti-  
lizada para definir los estados de maduración que no siempre  
son obvios cuando se relacionan los cambios en la apariencia  
morfológica.

Lotem y Rabellino (111), dividen la relación entre los  
marcadores o los sitios receptores con el proceso de madura-  
ción morfológica en seis fases: Fase 1: no hay presencia de  
receptores (mieloblasto y promielocito), Fase 2: presencia -  
de receptores para Fc (de mielocitos hasta polimorfonuclea -  
res), Fase 3: aumento de receptores para Fc y presencia de -

sitios para el complemento  $C_2$ , Fase 4: presencia de receptores para Fc y  $C_2$ , Fase 5: aparición de los primeros marcadores para el complemento  $C_1$  (neutrófilos maduros y monocitos) Fase 6: presencia de receptores para Fc y  $C_1$  en macrófagos - activados.

Se ha demostrado que el MGI parcialmente purificado, - induce la formación de células morfológicamente maduras, pero sin receptores para Fc y  $C_3$  (112), demostrando de esta - forma que existe una molécula diferente al MGI que es la inductora a la formación de receptores para Fc y  $C_3$  en células de médula ósea.

## FISIOLOGIA DEL RINON

La nefrona. Los riñones, que en su conjunto constituyen el 0.5 por 100 de todo el peso corporal, reciben el 20 por 100 del consumo cardíaco. Cada día pasan aproximadamente 1,500 litros de sangre a través de los riñones, 150 litros penetran cada día por los túbulos contorneados proximales como orina potencial y se producen 1.5 litros de orina en el adulto metabólicamente estable. La unidad funcional de la actividad renal es la nefrona, de las cuales cada riñon contiene aproximadamente 1.5 millones. Comprendidos dentro de la nefrona están el asa capilar glomerular, el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle, el túbulo contorneado distal y el conducto colector, que se une con los demás conductos para alcanzar en última instancia a la pelvis renal.

Función glomerular. El flujo sanguíneo glomerular es regulado por las arteriolas aferentes (preglomerular) y eferentes (posglomerular). La función principal del asa capilar glomerular es la filtración, por medio de la cual los líquidos y solutos asociados abandonan el torrente circulatorio para formar parte de la orina. La presión de filtración, el empuje que expelle líquido de la luz capilar, es la suma neta de la presión hidrostática dirigida hacia fuera y la presión osmótica coloidal dirigida hacia dentro. Los niveles de proteína sérica son los que determinan principalmente la presión osmótica, mientras que los cambios en la constricción

arteriolar regulan la presión hidrostática intracapilar.

Después de abandonar la luz del capilar, el filtrado atraviesa la masa de elementos celulares y acelulares que permiten pasar a los solutos del plasma pero que privan el paso a las moléculas más grandes, particularmente las proteínas. Normalmente penetran el filtrado pequeñas cantidades de las proteínas plasmáticas más pequeñas. La hemoglobina, que es una molécula compacta esférica, puede pasar fácilmente el filtro, pero su presencia en el plasma es anormal. Cuando la presión hidrostática es excepcionalmente alta, pueden penetrar cantidades anormales de proteínas en el filtrado, y lo mismo sucede si existe lesión del endotelio, membrana basal o estructuras epiteliales que constituyen la barrera física, o si existen en el plasma moléculas proteicas excepcionalmente pequeñas de cualquier origen.

El túbulo proximal. Los 150 litros de filtrado que penetran en el túbulo contorneado contienen más de 1 kg de cloruro de sodio e innumerables constituyentes más. Mientras atraviesa el túbulo contorneado proximal, la "preorina" pierde del 80 al 85 por 100 de sus aguas y sales, y virtualmente todos sus azúcares, aminoácidos y proteínas. Las células epiteliales que cubren este segmento consumen energía en la reabsorción de sodio; el agua y el cloruro acompañan pasivamente hacia la circulación general al sodio reabsorbido. Esta porción de la regulación de sal y agua no responde al cambio de los estímulos fisiológicos y su regulación final -

se produce más distalmente.

El asa de Henle. La recuperación de líquido y electrolitos en el túbulo contorneado proximal reduce el volumen por minuto del contenido tubular de 120 ml a 20 ml, pero una excreción a este ritmo produciría aún 29 litros de orina al día. Cuando el líquido tubular penetra en el asa de Henle es isoosmótico con el plasma (aprox. 300 mOsm/L); el asa descende dentro de la médula renal, donde el líquido intersticial es intensamente hipertónico. El agua y los electrolitos se mueven entre la luz tubular y el líquido intersticial en una serie de relaciones complejas conocidas como multiplicación contracorriente de concentración. Después de su paso a través del asa de Henle, el líquido que penetra en el túbulo contorneado distal es hipotónico con relación al líquido intersticial concentrado situado por fuera del túbulo.

El túbulo contorneado distal. En el túbulo contorneado distal y conductores colectores se produce el ajuste, del volumen y composición electrolítica de la orina. La hormona antidiurética controla el volumen de excreción variando la interacción entre el contenido tubular diluido y el líquido intersticial concentrado. Cuando está presente la hormona antidiurética, la pared de estos segmentos se hace permeable al agua sin soluto. Desde el líquido intersticial el agua retorna a la circulación, conservando de esta manera el agua corporal y dejando una orina bastante concentrada. Sin hormona antidiurética, las paredes se oponen al movimiento hídri-

co, el líquido tubular permanece hipotónico y se excretan - grandes cantidades de orina diluída.

Tanto el túbulo contorneado proximal como distal participan en la regulación ácido-base y del ión potasio. En el túbulo proximal se extraen potasio y bicarbonato del filtrado, en tanto que aumenta el contenido de hidrogeniones del líquido tubular. El epitelio del túbulo proximal regenera iones de bicarbonato y los restaura a la circulación con iones de sodio. En el túbulo distal el epitelio regula la excreción de hidrogeniones y potasio; mientras que el organismo mantenga un equilibrio metabólico aproximado, estos iones se excretan de una manera aproximadamente recíproca. El exceso de hidrogeniones se excreta combinándolo con amoníaco (para formar iones de amoníaco) o con amortiguadores filtrados tales como  $\text{HPO}_3^-$ .

Cuando aumenta la excreción de  $\text{H}^+$  la concentración urinaria de  $\text{K}^+$  disminuye. Si las reservas orgánicas de potasio están reducidas, se conservará  $\text{K}^+$  y se excretará  $\text{H}^+$ . Esto puede ocurrir aunque el estímulo para la depleción de  $\text{K}^+$  conduzca a la alcalosis generalizada, de forma que la orina pueda ser, paradójicamente, ácida en presencia de una alcalosis corporal total (113).

## GENERALIDADES DE ORINA

El examen general de orina incluye la observación del color, concentración, pH de orina, conjuntamente con el examen microscópico de los elementos formes y la investigación de elementos patológicamente significativos que no existen normalmente, tales como glucosa, proteína, sangre, cuerpos cetónicos y pigmentos biliares (121).

El pH de la orina. El pH normal es ligeramente ácido, aproximadamente de 6, cuando se consume una dieta normal de residuos ácidos. Los límites de variación de pH son de 4.5 hasta cerca de 9. Cuando existe una función renal adecuada, el pH de la orina tiende a reflejar el pH del plasma.

Color. La orina normal varía en color del amarillo pálido al amarillo intenso dependiendo de la concentración de los solutos. Aunque generalmente transparente, la orina puede hacerse turbia cuando se le deja curante cierto tiempo, o si los uratos precipitan en la orina ácida o los fosfatos precipitan a un pH alcalino. El cambio patológico significativo más frecuente del color es el resultado de la presencia de sangre productos de degradación de la hemoglobina o bilirrubina y sus metabolitos.

Proteínas. Una excreción proteica superior a 150 mg al día casi siempre es significativa. La proteína más frecuente es la albúmina. La albuminuria indica, frecuentemente, una permeabilidad glomerular anormal debida bien a enfermedad

glomerular intrínseca bien a modificaciones en la presión -- sanguínea, como hipertensión y anormalidad de las venas re-- nales.

Cuerpos cetónicos. Si los tejidos necesitan agotar las-- reservas disponibles de glucosa, la combustión de las gra -- sas sustituye a la glucosa como fuente de energía. Como el -- metabolismo de las grasas, en condiciones patológicas, no es completo, se acumulan metabolitos intermedios como son los -- cuerpos cetónicos que se excretan en la orina. Los cuerpos -- cetónicos encontrados en la orina son el ácido beta-hidroxibutírico, el ácido acetoacético y la acetona.

Examen microscópico del sedimento. El sedimento urina -- rio que contiene células y otros elementos formes constitu -- ye una muestra directa de la morfología del tracto urinario. Los elementos que aparecen son los glóbulos rojos, los gló -- bulos blancos, las células epiteliales, los cilindros.

Cristales. La mayoría de los cristales o sustancias -- amorfas tienen poco significado clínico. Los cristales se ha -- cen importantes en algunos trastornos del metabolismo de -- los aminoácidos, particularmente de la cistina, leucina o -- tirosina.

Los hallazgos más frecuentes en el sedimento urinario -- son los uratos cristalinos o amorfos, el oxalato de calcio -- y los fosfatos cristalinos o amorfos. La bilirrubina y el -- colesterol pueden aparecer ocasionalmente como cristales -- urinarios.

## FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA

Se ha descrito la existencia de un factor, que induce a la formación in vitro de sitios receptores para Fc (FcRI) en células de médula ósea de ratón. El factor se encontró en medio condicionado obtenido de la línea leucémica de tipo macrófago WR19.M.1, la cual fue estimulada con lipopolisacárido (LPS) provenientes de la bacteria Salmonella typhosa. El peso molecular del FcRI obtenido fue de 16 000 daltones y con un pH isoeléctrico de 7.4.

El FcRI presentó características de tipo proteínico, al ser una molécula termolábil y susceptible a la acción enzimática de la tripsina.

Las moléculas con peso molecular de menos de 60 000 daltones, están por debajo del límite de corte de la filtración glomerular del riñón humano, por lo que es posible que el factor (FcRI) sea eliminado en la orina, es de esperarse que también se encuentre en diversas fuentes de origen murino (suero endotóxico, medio condicionado, etc), en consecuencia es posible determinar el FcRI en diversos medios de origen murino y encontrarlo en la orina humana por la semejanza con los factores de diferenciación celular.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se desea obtener una fuente rica en el factor FcRI, para proceder a su purificación, y en un futuro al estudio básico de la molécula y su posible aplicación diagnóstica y terapéutica.

Para ello se determinará el nivel del FcRI en diversas fuentes murinas, se comparará con el nivel detectado en orina humana, y se procederá a efectuar una purificación parcial a partir del mejor medio.

## OBJETIVOS

- 1.- Obtener diversas fuentes (suero normal, leucémico y en - dotóxico etc.) de origen murino, con actividad biológi - co de FcRI.
- 2.- Identificar el factor (FcRI) en las diversas fuentes an - teriores.
- 3.- Caracterizar el FcRI, determinando su peso molecular y - su punto isoeléctrico, en las fuentes murinas, en que se haya encontrado.
- 4.- Identificar el factor (FcRI) en orina humana.
- 5.- Caracterizar el FcRI en orina humana determinando su pe - so molecular, punto isoeléctrico así como que tipo de - proteína es.
- 6.- Purificación parcial del factor (FcRI) en la fuente que - presente mayor rendimiento.

## HIPOTESIS

Dado que la molécula de FcRI ha sido detectada en un me dio de origen murino junto con otros factores de diferencia- ción, se esperaría que en otros medios condicionados del mis- mo, también se encuentre el FcRI.

Asimismo, dado que el factor presenta un peso molecular de alrededor de 16 000 daltones, esperamos encontrarlo en la orina humana.

MATERIALES Y METODOS

## MATERIAL Y EQUIPO

	MARCA	MODELO
1.- Agitador Magnético	MAGNESTIR	1250
2.- Ahuja esteril desechable	YALE	20 X 32 mm (1 1/4)
3.- Autoclave	IMMSA	AV3860
4.- Balanza Analítica	METTLER	H54AR
5.- Balanza Ol	Scientific Products	B1302-1
6.- Baño térmico con Agitador	Lindberg	53166
7.- Bulbos para pipeta	BELLCO GLASSING	1225-1111
8.- Cajas de Petri de Plástico	Durango Vela, S.A.	12533
9.- Centrifuga	BECKMAN	TJ-6
10.- Centrifuga Refrigerada	BECKMAN	J-6 (6000 rpm)
11.- Cronómetro	General Electric	881
12.- Espátula de Acero inoxidable	SOLINOX	76 cm.
13.- Espectrofotómetro	BECKMAN	IR-4260
14.- Hemocitómetro	SUPERIOR	Tiefe 0.100 mm.
15.- Incubadora	Forma Scientific	3157
16.- Liofilisador	S. P.	D6805
17.- Matraces aforados	PYREX	5641
18.- Matraz erlenmeyer	PYREX	4980
19.- Matraz Kitasato (2000ml)	PYREX	5340
20.- Mechero	HANAV	Touch-o-Matic
21.- Medidor de Conductividad	BECKMAN	Type RC-16C

	MARCA	MODELO
22.- Microscopio	ZEIZZ	Standard 14
23.- Microscopio Invertido	American Optical	1810
24.- Papel Parafilm "M"	American Company	06830
25.- Parrilla con agitador Magnético	American Optical	2156
26.- Pipetas de precisión	Scientific Products	B7025-1
27.- Pipetas graduadas	BELCO	(10X0.2ml)
28.- Pipetas -Pasteur	BECKMAN	4771
29.- Porta objetos	MADE S.A.	26 X 76 mm.
30.- Potenciómetro	BECKMAN	3500
31.- Probetas graduadas	KIMAX	20024-D
32.- Refrigerador	REUCO	ULT358A
33.- Resirculador	NGW LAUDA	K2RD
34.- Soporte	Scientific Products	C5950-1
35.- Termómetro (-20 a 110°C)	Fisher Scientific	14-986B
36.- Tubos de ensaye	PYREX	9820
37.- Tubos para ultracentrifuga	BECKMAN	326815
38.- Ultracentrifuga	BECKMAN	L5-65
39.- Vasos de precipitado	PYREX	100 y 1000 ml.
40.- Volt-OHM-Milliammeter 62	S.P.	E 2057

## MATERIAL BIOLÓGICO

**LINEA CELULAR.** La línea celular de tipo leucémico en -- estudio fue la WR19m.1 con características fagocíticas, se -- cretora de lisozima, de etiología viral (proporcionada por -- el Dr. Jay Unkeless de Rockefeller University New York U.S.A

**MEDIO CONDICIONADO. (M.C.).** Para obtener el medio condi -- cionado donde se encontraba la proteína diferenciadora MGI -- y el FcRI, se estimuló a las células de la línea leucémica -- con 10 ug/ml de lipopolisacárido (LPS) proveniente de la bac -- teria Salmonella typhosa (Difco U.S.A), el M.C. se obtuvo -- de manera estéril en fracciones de 5 ml, hasta coleccionar un -- volumen de 500 ml.

**CELULAS INDIFERENCIADAS.** La fuente de células indiferen -- ciadas fue, la médula ósea de ratones de la cepa CD-1 de am -- bos sexos de 6 a 8 semanas de edad, además se empleó suero -- de éstos.

**ERITROCITOS DE CARNERO.** Los eritrocitos se obtienen de -- carneros machos sanos sangrados en forma aséptica, vertidos -- en solución de Alsever en proporción 1:1.

**INMUNOGLOBULINAS G (IgG).** Se usó inmunoglobulina G (Cor -- dis labs. U.S.A.). Se empleó en una dilución 1:100, se di -- luían 10 microlitros de ésta en 16 ml de SAF, para su empleo

Se empleó además orina de origen humano, recogida des -- pués de que se dejó escapar el flujo inicial y mantenida en -- congelación hasta su empleo.

**METODOS Y TECNICAS I**

**METODOS Y TECNICAS EMPLEADAS EN LA CARACTERIZACION**

**DEL FACTOR INDUCTOR DE LA FORMACION DE SITIOS**

**RECEPTORES DEL Fc EN CELULAS DE MEDULA**

**OSEA (FcRI)**

## MÉTODOS

### TECNICAS BIOQUIMICAS

#### PROCEDIMIENTO DE SEPARACION BASADOS EN EL PESO MOLECULAR

##### DIALISIS.

En nuestro caso por los antecedentes bioquímicos del FcRI se empleó un amortiguador TRIS-HCl 75 mM a un pH de 7.7 a una temperatura de 4°C y cinco ml de M.C. fueron dializados con agitación continua y se observó que parte de la actividad del FcRI se perdía. En consecuencia, se dializó en un saco de celofán benzoilado (corte de 2,000 daltones aproximadamente).

##### CROMATOGRAFIA EN COLUMNA CON SEPHADEX G-50

Para determinar el peso molecular del FcRI se utilizó una columna de Sephadex G-50 para pesos moleculares de 1,500 a 30,000 daltones, la elección de esta columna se hizo basándose en los resultados de la dialisis anterior, se pasaron por la columna 5 ml del M.C. dializado previamente en celofán benzoilado y se eluye con TRIS-HCl 75 mM a pH 7.7.

La preparación del gel es de la siguiente manera, el gel se puede hinchar en el amortiguador TRIS-HCl 75 mM a un pH de 7.7 durante 3 horas a una temperatura de 92°C, o se deja remojando toda una noche, después de esto se empaca la-

columna K 9/11 (Pharmacia Fine Chemical Suecia). Se lava el gel con la solución amortiguadora a un flujo de 4 cm/hora.

Se calibra la columna con proteína de peso molecular conocido, (Inhibidor de Tripsina 20,000 Da., mioglobina --- 17,300 Da. y la lisozima 14,200 Da.), además se emplea azul-de dextrano para calcular el volumen de exclusión. (121).

#### PROCEDIMIENTO DE SEPARACION BASADO EN LA CARGA ELECTRICA.

Las propiedades características ácido-básicas de las -- proteínas permiten la separación y el análisis de mezclas de éstas, utilizando las técnicas de electroenfoque isoelectrico ó cromatografía de intercambio iónico. Debido a que el - FcRI y el MGI provienen del mismo medio condicionado, para - diferenciarlos considerando que son dos proteínas diferentes esperamos que tuvieran diferente pH, por lo cual se procedió a determinar su pH isoelectrico, conociendo éste, se podría purificar el FcRI mediante una cromatografía de intercambio-iónico, y a la vez se diferenciaría el FcRI del MGI del M.C. de la línea Leucémica WR19 M.1.

#### ELECTROENFOQUE

El electroenfoque fué de tipo preparativo en capa gruesa (0.5 cm. espesor de la cama) con Sephadex G-75, se coloca

ron 30 ml (pH 6.6) del M.C., WR19M.1 del que previamente se había eliminado las sales y el indicador de pH del medio Eagle (rojo fenol), haciéndole pasar por una columna de G-50 de esta cromatografía las fracciones que contenían proteína detectada a 280 nm sumaron 115 ml los cuales se concentraron por ventilación a 15 ml en un saco de celofán benzoilado. El rango de pH utilizado en este electroenfoque fue con anfotinas de 3 a 10, el pH se determinó directamente en la cama y las fracciones se diluyeron con 3 ml de PBS, los filtrados se mantuvieron a 4°C hasta efectuar el ensayo biológico.

#### DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE FcRI POR ULTRACENTRIFUGACION

Normándonos por el objetivo de caracterizar el FcRI y con la finalidad de obtener otra estimación de su peso molecular por una técnica diferente a la de cromatografía, se procedió a determinar éste por medio de ultracentrifugación. Se emplearon únicamente las fracciones del electroenfoque previo con actividad de MGI ( pH 5.1 ) y FcRI ( pH 7.6 ) 10 ul, de cada una.

Se empleó un gradiente formado con sacarosa de 0.5 % a 28 % disuelto en TRIS 40 mM, pH 7.25 a 5°C, el gradiente fue lineal preparado de acuerdo al procedimiento Martin y Ames (116), en un formador de gradiente Beckman. Cinco mililitros de la solución gradiente y problemas, se centrifugaron a 65,000 rpm durante 18 horas a 5°C, en tubos de nitrato

de celulosa con un rotor SW-65 (Beckman Instruments, Palo Alto, Calif. Al termino de la centrifugación se perforó el fondo de los tubos y se colectaron 32 fracciones en gotas de 25 microlitros cada una. Posteriormente cada fracción fue diluída a 500 microlitros para poder determinar su absorbancia a 280 nm para cuantificar las proteínas en general y a 410nm para las hemoproteínas. Para evaluar a la lisozima se empleó el ensayo biológico enzimático. (verlo mas adelante).

Los estandar internos empleados fueron 10 ug de lisozima, 10 ug de mioglobina, media hemoglobina humana y 10 ug de ovoalbúmina, todos diluidos en amortiguador TRIS-HCl, pH 7.25 a 5°C.

Los problemas 10 ul de las fracciones con actividad FcRI y MGI.

TECNICAS ESPECTROFOTOMETRICAS PARA DETERMINACION  
DE PROTEINAS

Las siguientes técnicas que se describen más adelante - como son: el Método de Lowry, Método de Bradford y la determinación biológica de la lisozima, se emplearon para precisar las fracciones en que aparecían los patrones internos - en las cromatografías.

METODO DE LOWRY MODIFICADO PARA DETERMINAR PROTEINAS.

(0.05 mg A 0.02 mg)

( 124 )

Este método se basa en la presencia de tirosina y triptofano en las proteínas. Los reactivos son: Solución A. --- NaOH (0.1N) conteniendo  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2 %. Solución B.  $\text{CuSO}_4$  al 1 % (refrigerar). Solución C. Tartrato de sodio y potasio al 2% (refrigerado). Solución D. Reactivo de Folin-Cicalteu diluido 2:1 con agua destilada recién preparada.

Método:

- 1.- a) Mezclar 1 ml de la solución B con 1 ml de la solución C, agitar y aforar a 25 ml con la solución A, agitar perfectamente.
- b) Mezclar 1 ml de Folin-Cicalteu en 0.5 ml de agua.
- 2.- Curva Patrón. De una solución de albúmina bovina 1 mg/ml en agua, tomar 0,5,10,15,20,30 microlitros, que corresponden a 0,5,10,15,20 y 30 microgramos de albúmina. En cada caso completar a 50 microlitros con agua adicionan-

- do 50,45,40,35,30 y 20 microlitros de agua.
- 3.- Problema: Adicionar a cada tubo 3 concentraciones crecientes de proteína (entre 5 y 30 microgramos), completar a 50 microlitros con agua.
  - 4.- Después de completar la curva patrón y los problemas -- adicionar 1 ml de la mezcla de las soluciones A+B+C y -- agitar en vortex perfectamente.
  - 5.- Dejar reposar 10 min. a temperatura ambiente y adicionar 50 microlitros a cada tubo de la dilución de Polin -- Cicalteu, agitando cada tubo inmediatamente en el vortex
  - 6.- Dejar reposar 10 min. a temperatura ambiente y leer en -- el espectrofótometro a 540 nm, usando como blanco el tubo número 1 de la curva patrón, sin albúmina. (124).

#### METODO DE BRADFORD MODIFICADO PARA DETERMINAR PROTEINA

Este es un método rápido y muy sensible para el microanálisis se basa en la absorción máxima (595nm), de una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G-250, cuando se une a una proteína. Los reactivos son los siguientes: el Coomassie brilliant blue G-250 (100 mg), se disuelve en 50 ml de etanol (95 %), a esta solución se le agregan 100 ml de ácido fosfórico y se disuelve perfectamente.

El ensayo se realizó de la siguiente forma: se colocaban 100 ul de muestra en la cubeta y se añadían 2.5 ml de reactivo, se esperaban aproximadamente 2 minutos y se realizaba la lectura a 595 nm. Para la calibración se empleó --

albúmina bovina (115).

DETERMINACION BIOLÓGICA-ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA  
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA LISOZINA

Esta prueba se basa en la actividad degradativa de la lisozima sobre polvo de pared de bacteria de Micrococcus Lyso deikticus. Los reactivos son los siguientes: polvo de bacteria 33.2 mg/100 ml, solución (1) NaCl (0.3 M), la solución (2) se prepara con 0.92 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  disueltos en 100 ml de agua destilada (solución A) y 0.945 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y disueltos en 400 ml de agua destilada (solución B), se hace una solución de 3 partes de A con una parte de B y se ajusta el pH a 6.3, después se le agrega el polvo de bacteria, procediéndose a incubar 4 hrs a  $4^\circ\text{C}$  antes de su empleo.

El ensayo se realiza de la siguiente manera: se colocan 0.5 ml de la solución 1, más 1.5 ml de la solución 2, se disuelve y se coloca en el espectrofotómetro en donde se añade 1 ml de la muestra que contiene la lisozima y se lee a 540 nm, la velocidad de degradación del polvo de bacteria.(125)

MÉTODOS Y TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
BIOLOGICA DE LA PROTEINA INDUCTORA  
A RECEPTORES Fc

La actividad biológica de la proteína inductora a receptores Fc, fué el único índice para seguir a la proteína en los procedimientos de separación bioquímicas que se hicieron en este proyecto, más específicamente la cantidad de rosetas por unidad de volumen concentrado con proteína, concentrado hecho con las técnicas bioquímicas antes descritas.

La inducción a la producción de receptores a Fc, se hizo en células de médula ósea de fémur de ratón de la cepa CD-1, las cuales se extraen por la técnica descrita más adelante, el grado de producción de receptores para Fc se evaluó con la producción de rosetas con eritrocitos de carnero según la metodología siguiente: (119)

TECNICA PARA OBTENER CELULAS DE MEDULA OSEA DE RATON

- 1.- Sacrificar ratones de 4 a 6 semanas mediante la dislocación cefalo-medular.
- 2.- Obtener fémures, colocarlos rápidamente en cajas de Petri con medio Eagle.
- 3.- En una campana eliminar la mayor cantidad de tejido muscular circundante del fémur.
- 4.- Perforar ambos extremos del fémur con una jeringa de 1 ml y hacer fluir medio Eagle por los extremos, hasta desalojar el mayor número posible de células.

- 5.- Colectar las células en un tubo cónico estéril y centrifugarlas.
- 6.- Resuspender en medio Eagle y proceder a contar en un hemocitómetro, posteriormente diluir con medio Eagle hasta obtener la cantidad deseada.

### TECNICA DE ROSETAS

Para esta técnica empleamos eritrocitos de carnero, -- extraídos de la yugular estérilmente, se colocaron en solución también estéril de Alsevers, dejándolos reposar durante una semana, posteriormente realizamos un conteo con hemocitómetro para diluir y poder tomar  $10^9$  células /ml. y así manejar volúmenes medibles fácilmente.

Los eritrocitos se sometieron a un proceso de lavado -- con PBS, para retirarlos de la solución Alsevers, posteriormente se les adicionó 4.6 ml de IgG (IgG diluida 1/1 800 en PBS) y la misma cantidad de PBS. Se mantuvieron los eritrocitos en baño María a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, al término -- del período se lavaron dos veces con PBS para quitar el excedente de IgG, por último se resuspendieron en 10 ml. de PBS.

Previamente se sembraron 5 millones de células de médula ósea de ratón por caja de Petri, adicionando medio de Eagle y suero al 10 % más la sustancia problema (muestras obtenidas en la purificación). Las condiciones de incubación fueron: humedad a punto de rocío, temperatura  $37^{\circ}\text{C}$  y atmósfera con 10 % de  $\text{CO}_2$  durante un período de 48 hrs. al cabo de la-

incubación, se recogió el medio en tubos cónicos de centrifuga despegando las células adheridas a la caja con un gendarme.

Las células fueron centrifugadas a 500 X g. durante 3 minutos. Como paso siguiente las células se lavaron 3 veces con PBS y por último resuspendidas. Les agregamos un volumen suficiente de eritrocitos preparados con IgG (relación 50 globulos rojos por cada célula), luego fueron incubadas a 37°C en baño María durante 30 minutos, posteriormente se resuspendieron las células con una pipeta Pasteur, tomamos una gota la que colocamos en el hemocitómetro. En el conteo microscópico de rosetas, el criterio para considerar que una célula indiferenciada de médula ósea de ratón, poseía ya la capacidad de formar rosetas por inducción del FeKI, era el siguiente: que debían de tener 6 o más eritrocitos adheridos a cada célula de médula ósea de ratón.

Control positivo y negativo. El control positivo se empleó medio condicionado proveniente de pulmón de ratón agregándose en un 10 % por plato Petri. Para el control negativo se le agregó un 10 % de medio Eagle solamente. (119).

DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE MGI  
TECNICA DE LA BICAPA

La actividad de MGI se detectó con base en la producción de colonias de granulocitos y macrófagos, empleando células precursoras obtenidas de la médula ósea de fémur de ratón de la cepa CD-1, mediante la utilización de la técnica de bicapa en agar y empleando cajas de Petri de 60 X 15 mm.

Este método (119) consiste en:

- 1.- Se colocó una capa inferior con agar al 5% (2 ml), medio de Eagle doble (1.0 ml) suero fetal al 10 % (0.5 ml ). Se mantuvo 15 minutos el agar a temperatura ambiente (durante éste lapso se sacrificó al ratón y se extrajeron las células de médula ósea).
- 2.- Posteriormente se coloca una capa superior, conteniendo agar al 1.5 % (1.0 ml) medio de Eagle sencillo (2.5 ml) con  $10^5$  células de médula ósea/ml y se deja reposar 20 minutos para que tome consistencia el gel antes de introducir el cultivo a la incubadora.

El agar se diluyó con agua bidestilada para no alterar la concentración de sales, esterilizándose en autoclave y manteniéndose en baño María a  $46^{\circ}\text{C}$ , antes de usarse. Para observar resultados se esperaba de 5 a 7 días.

MÉTODOS Y TÉCNICAS II

MÉTODOS Y TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA PURIFICACION

PARCIAL DEL FERI A PARTIR DE M.C., WR19.1

Y ORINA HUMANA

## ENSAYO CON CELULOSA FOSFATO

Conociendo el peso molecular del FcRI y su punto isoe -  
léctrico se intentó adelantar el diseño de una purificación -  
para lo que se procedió de la siguiente manera: para elimi -  
nar sales se pasaron 100 ml del M.C., WR19M.1 en una columna -  
de G-15 eluida con TRIS-HCl 75 mM, después de pasarlo por la  
columna se recuperó el volumen excluido el que se diluyó 5 -  
veces dando un volumen final de 500 ml. Se toma la fracción -  
de 215 ml que presenta por absorbancia a 280 nm la mayor con -  
centración de proteína, se concentra aproximadamente 11 ve -  
ces por liofilización quedando 10 ml. Este concentrado se hi -  
zo pasar por una columna de celulosa fosfato (pH 6 a 4°C , -  
amortiguada con ácido succínico 0.020 M.).

Se eluyó mediante un gradiente con 200 ml de amortigua -  
dor de succinato 20 mM pH 6 y 0.5 M de NaCl. En el ensayo -  
biológico se detectaron las fracciones donde apareció el --  
FcRI en el gradiente obteniéndose 35 ml.

## EXISTENCIA DE FcRI EN ORINA HUMANA

Siendo que para intentar producir suficiente FcRI para una posible purificación a partir de N.C., WR19M.1 resultaría costoso, y tomando en consideración el peso molecular tan pequeño de este factor, se procedió a evaluar la utilidad de la orina humana como fuente de FcRI, ya que una molécula de este tamaño debería atravesar la barrera glomerular del riñon con cierta facilidad.

Para ello se tomaron 3 muestras de 3 diferentes donadores, se esterilizaron y se procedió a la realización del bioensayo descrito en la técnica de Rosetas, con la cual se determinará la existencia del FcRI en orina, a cada plato de células indiferenciadas se le adiciona 0.2 ml de orina humana. Asimismo con la finalidad de determinar si las sales o algún otro elemento tóxico en la orina pudiesen haber afectado la actividad del FcRI se procedió a dializar en celofán benzoilado y por desalinización en columna con G-25 usando PBS como eluyente.

## BUSQUEDA DE UN METODO A PEQUEÑA ESCALA PARA LA PURIFICACION DEL FcRI A PARTIR DE URINA HUMANA (O.H.)

Siendo que se detectó actividad FcRI en O.H., y que como mencionamos es una fuente ideal para intentar una purificación bioquímica, se intentó probar a pequeña escala técnicas clásicas de purificación. Se comenzó con pruebas en lotes de geles de intercambio iónico tales como de DEAE-celulosa a pH 8.5 (en amortiguador TRIS) y el gel de celulosa fosfato en amortiguador de acetato a pH 5, y los de gel de fosfatos a 3 diferentes valores de pH (7, 8 y 9) en TRIS. El ensayo se efectuó en vasos de precipitado con 10 g de cada gel y a la orina empleada se le eliminó previamente las sales, mediante una columna de G-25. A las dos primeras muestras después de lavarlas con sus respectivos amortiguadores, se les despegó las proteínas con una solución de NaCl (0.5M) al mismo pH utilizado, mientras a las de gel de fosfato se les despegó con solución salina 0.25 M amortiguada a pH 7.

La solución que contenía las proteínas (y posiblemente el FcRI) se mantuvo en congelación hasta su subsecuente empleo en el bioensayo.

Utilizando 50 ml de O.H. y después de 8 hrs. de electroforesis a 40 W, se encontró un valor de 7.4 para el punto isoeléctrico de este factor.

## PURIFICACION PARCIAL DEL FERI DE URINA HUMANA MEDIANTE UNA COLUMNA DE DEAE-CELULOSA

La O.H. recolectada de sujetos normales, se mantenía siempre en congelación para evitar su descomposición y prevenir ataque de bacterias, hasta que se obtuvieron 4 litros. Esta se filtró para eliminar los cristales precipitados que se formaban en congelación, y posteriormente se trataba a 4°C y a pH 7.6 (el que se ajustó adicionando TRIS, para pasarla por una columna de DEAE-celulosa.

Se consideró pertinente diluir la muestra, para poder bajar su conductividad (pH 7.6 y 4°C), lo cual aumentó el volumen a 5 litros. Una vez que pasó toda la muestra a través de la columna se lavó esta con amortiguador de TRIS-HCl a 0.75 mM, pH 7.6 a 4°C.

Las proteínas se eluyeron con un gradiente de NaCl (0.2 M a 1.0 M) con volumen total de un litro. Como la concentración de proteínas en las fracciones eluidas era muy baja, ya que no se pudo detectar por el método de Lowry, se procedió a emplear el método de Bradford.

DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DEL FcRI DE O.H.  
DEL ELUIDO DE LA COLUMNA DE DEAE-CELULOSA

Con los 7 ml del tubo de máxima actividad biológica del eluido de la columna de DEAE-celulosa, se procedió a determinar el peso molecular del FcRI, en una columna de Sephadex G-50. Se eluyó con TRIS-HCl 75 mM, pH 7.6 y se calibró con 5 proteínas de peso molecular conocido (10 ug de hemoglobina 64,500 Da, 10 ug de anhidrasa carbónica 30,000 Da. mioglobina 17,800 Da. citocromo C 14,000 e insulina 11,300 Da ). La columna fué una K 9/11 (Pharmacia Fine Chemical Suecia),- el flujo fué de 4 cm/Hora.

DETERMINACION DEL pH ISOELECTRICO DEL FcRI DE U.H.  
DEL CONCENTRADO DE DEAE-CELULOSA

Un electroenfoque fue nuevamente realizado en condiciones semejantes al realizado con el crudo de orina, pero ahora empleando un concentrado de FcRI que posteriormente se purificó pasandolo por una columna de Sephadex G-50, en este caso se empleó hemoglobina como referencia interna con P.I.-6.8, esto fué con el propósito de visualizar el frente de la banda.

El rango de pH utilizado fué de 3 a 10 (anfolinas 5.4ml se utilizó una corriente de 20 mA con un poder de 40 W, y un tiempo de aplicación del voltaje de 12 hrs. a 4°C.

## RESULTADOS

## RESULTADOS

### CARACTERIZACION DEL FACTOR INDUCTOR DE LA FORMACION DE SITIOS RECEPTORES DEL Fc EN CELULAS DE MEDULA OSEA ( FcRI )

Como este factor ( FcRI ) fué detectado en medios condi  
cionados ( M.C. ) por una línea leucémica la WR19 M.1 induci  
da con solución de lipopolisacáridos de Salmonella typhi en  
solución amortiguadora SAF. (Apen.), se procedió a caracteri  
zarlo; determinando para ello su peso molecular y punto iso-  
eléctrico, ya que con estos datos se puede proceder a un en-  
sayo de purificación de dicha molécula.

### DIALISIS

Los resultados de la diálisis (Tabla I), nos indica --  
ron que el FcRI era una molécula mayor de 2,000 daltones -  
pero menor de 20,000 daltones, y que en la diálisis se debe-  
utilizar una membrana de celulosa benzoilada. En adelante -  
el material proveniente del M.C. de la línea leucémica, pre-  
viamente se dializa en estas condiciones antes de su purifi-  
cación o determinación biológica.

	DIALIZADO DE CELULOSA		DIALIZADO DE CELULOSA BENZOILADA.		CRUDO	CONTROL SIN M. C.
	dentro	fuera	dentro	fuera.		
% DE ROSETAS	3	13	14	2	23	3

TABLA I EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD FCRI CONTENIDA EN EL M.C. MEDIANTE DIALISIS EN BOLSAS DE DIFERENTE PORO.

El % de rosetas se midió 4 días después de sembrar -  $8 \times 10^6$  células de médula ósea de ratón con 0.5 ml de M. C.

La diálisis tanto en celulosa normal como en la benzoilada se efectuó contra TRIS-HCl 75 mM a 4°C durante toda la noche.

## DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DEL FcRI DE M.C.

### CRONATOGRADIA EN COLUMNA CON SEPHADEX G-50

Esta cromatografía se empleó para determinar el peso molecular del FcRI proveniente del M.C., los resultados se muestran en la figura I donde se distinguen 3 picos de absorción a 280 nm. Siendo que estos M.C. fueron producidos en ausencia de suero en los medios de cultivo no hubo salida de proteínas detectables a 280 nm, sin embargo en la figura I, se presenta el perfil obtenido a esta longitud de onda de moléculas utilizadas para la calibración (Inhibidor de tripsina 20,000 Da. , mioglobina 17,300 Da. y la lisozima 14,200 Da. ). Como forma de corroborar que el pico pequeño pertenecía a la lisozima se detectó ésta por medio de su bioensayo enzimático a 540 nm ( ver métodos).

El volumen de elución en el que aparece la actividad biológica del FcRI aparece en líneas punteadas, entre el pico del inhibidor de tripsina y la mioglobina.

Al representar el logaritmo del peso molecular de las proteínas patrones (figura II) se estimó un peso molecular de 18,500 daltones para el FcRI, interpolando el volumen de máxima actividad biológica encontrada.

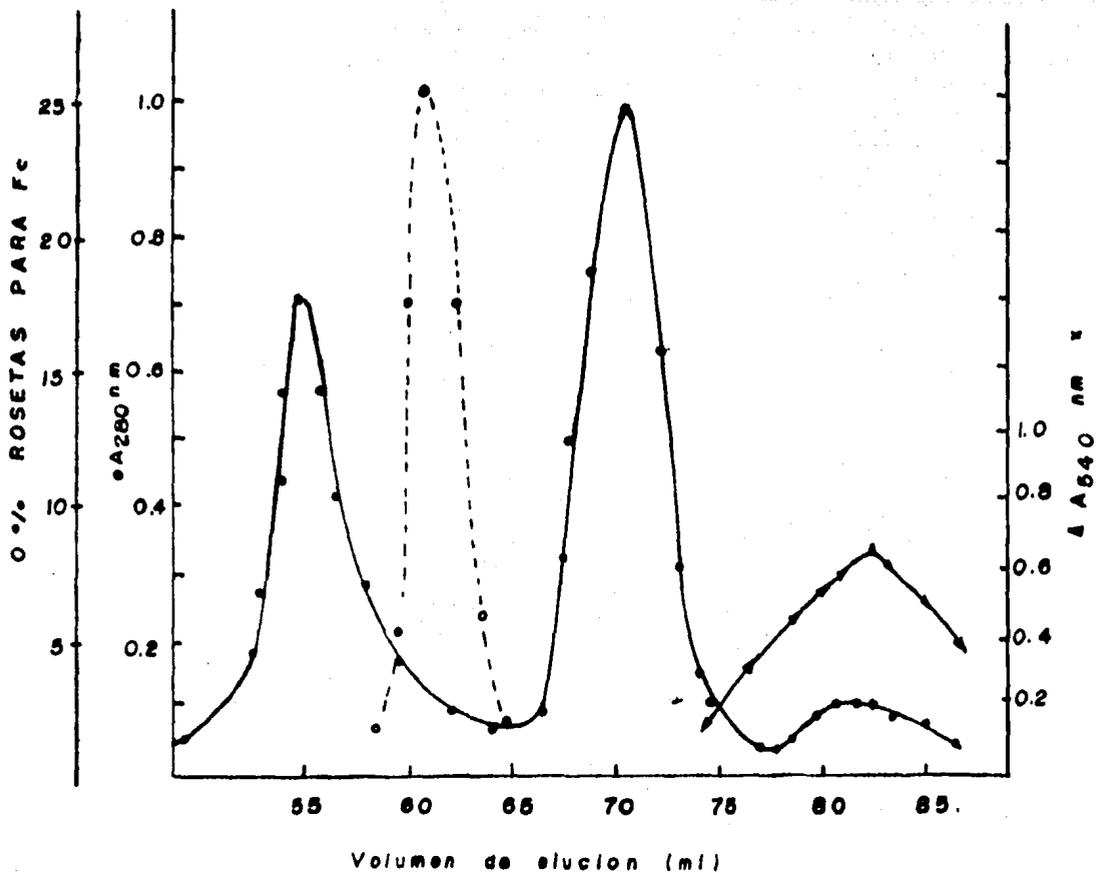


Fig. I CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-50

El material que se pasó por la columna fué 5 ml. de MC-WR19 M.1 en una columna K 15/30 con G-50, eluido con TRIS - HCl 75 mM a pH 7.7 y 4°C. Las fracciones colectadas de 2.5 - ml se leyeron a 280 nm (●). La actividad del FcRI fué determinada mediante la técnica de rosetas (○), y la actividad de la lisozima por ensayo biológico (▲).

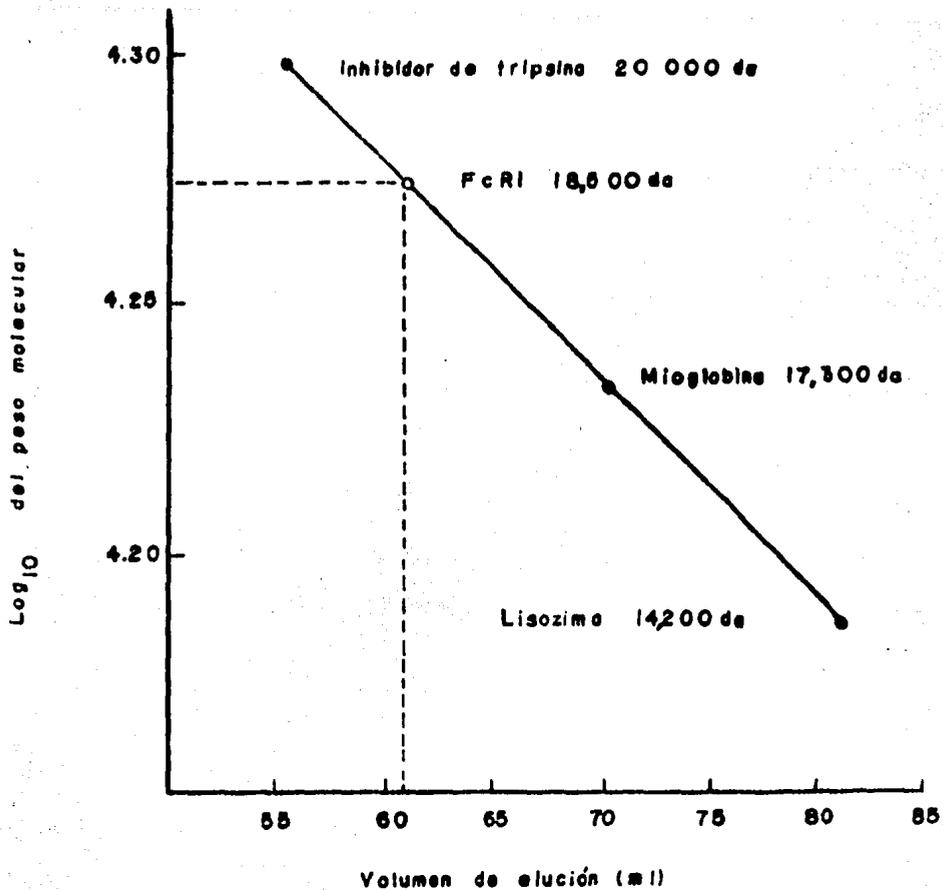


Fig. II CALIBRACION PARA LA DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR

La calibración se realizó empleando proteínas de referencia de peso molecular conocido como: Lisozima (14,200 Da) mioglobina (17,300 Da) e inhibidor de tripsina (20,000 Da )-

El peso molecular del FcRI se determinó interpolándose el pico de mayor actividad biológica de éste en el volumen de elución de la columna con Sephadex G-50.

## DETERMINACION DE PH ISOELECTRICO DEL FcRI DEL M.C.

### ELECTROFOQUE

La figura III muestra en donde se encontró la mayor actividad para la formación de rosetas ( pH de 7.6 ).

Mediante la técnica de bicapa en agar (119), se encontró que el NGI de este M.C. tenía un pH Isoeléctrico de 5.1.

Cabe hacer notar que unicamente se presentó la actividad del FcRI en una sola fracción obteniéndose 14 % de rosetas respecto a un control sin M.C. de 5 %.

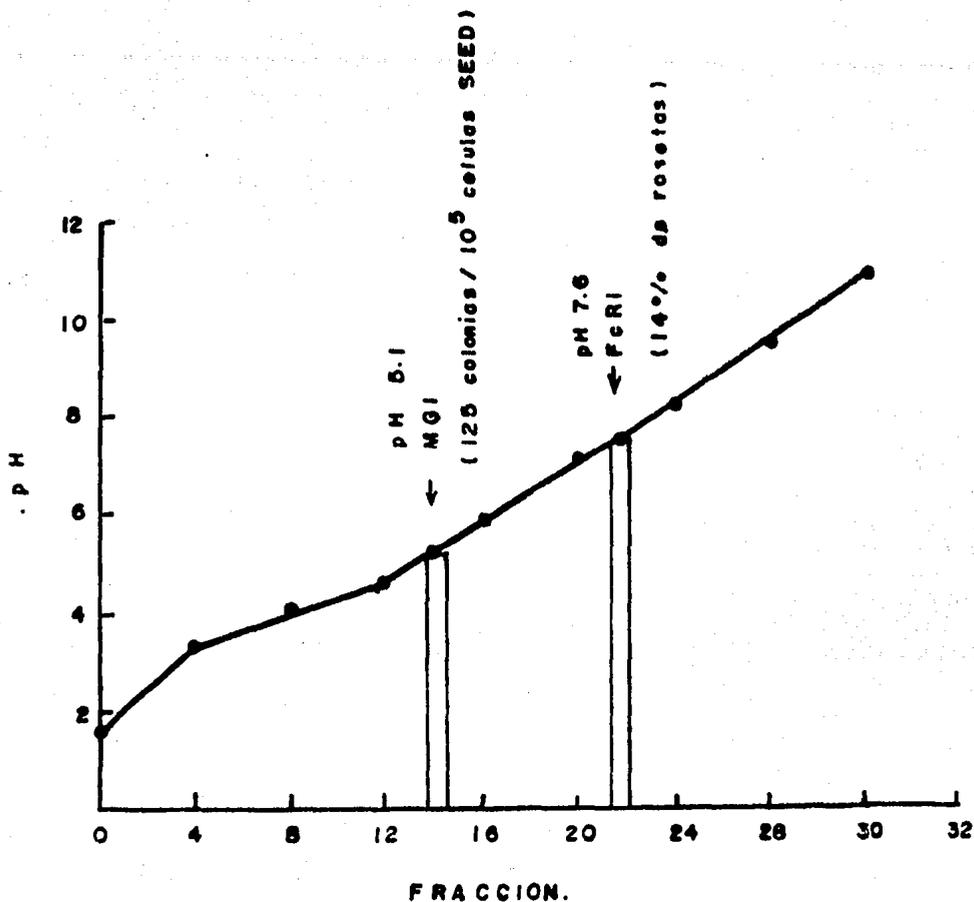


Fig. III DETERMINACION DEL PH ISOELECTRICO DEL FcRI.

Se hizo un electroenfoque preparativo con Sephadex - G-75 superfino empleando 15 ml del concentrado de MC-WR19M.1 Se aplicó una corriente de 20 mA de 40 watts durante 24 ho - ras a una temperatura de 4°C. La actividad del FcRI se de - tectó por la técnica de rosetas, el pH se determinó en la ca - ma del electroenfoque a 4°C. La formación de rosetas se de - tectó por ensayo biológico las colonias por la técnica de - bicapa (ver métodos).

DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DEL FcRI DEL M.C.  
POR ULTRACENTRIFUGACION

En la figura IV se muestran tanto los picos donde aparecen el FcRI, el MGI y las proteínas estandar. A partir de los coeficientes de sedimentación conocidos, lisozima (1.91) mioglobina (1.855), media hemoglobina (2.2) y ovoalbúmina (3.55) se determinó este para el MG y FcRI dando 3.0 y 1.1 respectivamente. Con estos valores se calcularon los pesos moleculares por el método de Martin y Ames en 16,500 daltones para el FcRI y 45,000 daltones para el MGI, empleando la siguiente fórmula:

$$MM_p = \frac{CS_p}{CS_h} MM_h$$

donde

- $MM_p$  es la masa molecular del problema
- $MM_n$  es la masa molecular de la hemoglobina (64,500 Da.)
- $CS_h$  es el coeficiente de sedimentación de la hemoglobina (4.3)
- $CS_p$  es el coeficiente de sedimentación del problema.

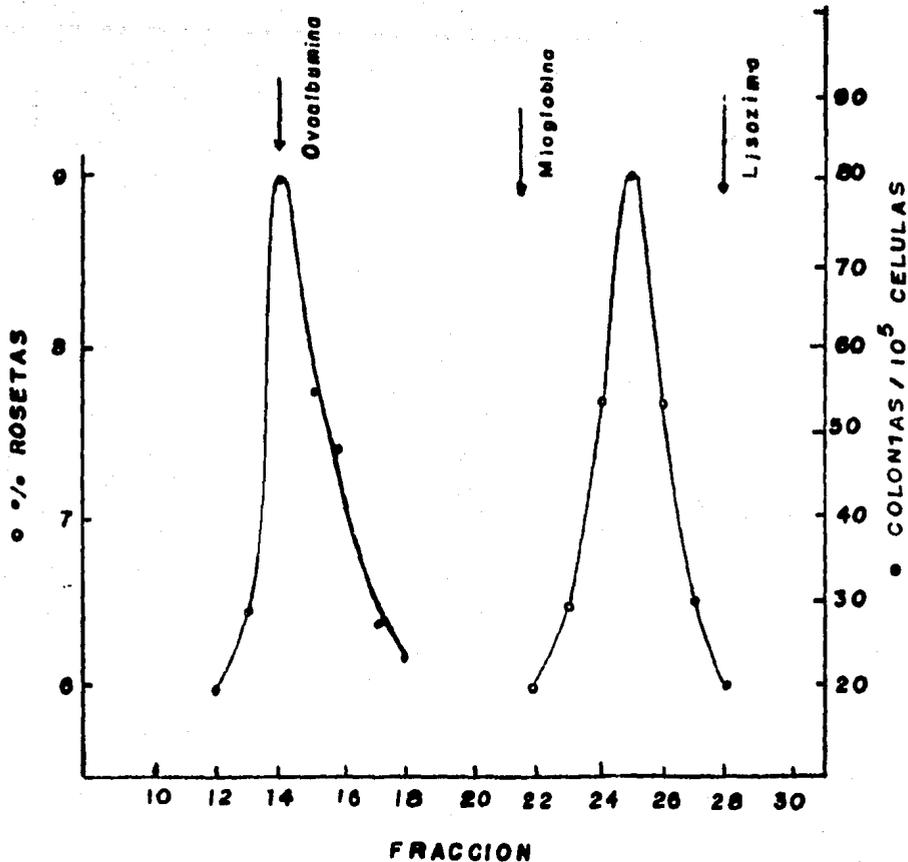


Fig. IV OBTENCION DEL PESO MOLECULAR DEL FcRI POR ULTRACENTRIFUGACION

La ultracentrifugación con gradiente de sacarosa del MC-WR19M.1 nos muestra dos pesos moleculares muy distintos para el FcRI y el MGI. La actividad biológica del FcRI se determinó añadiendo 10 ul de cada fracción del centrifugado al cultivo de  $8 \times 10^6$  células de médula ósea de ratón en medio Eagle y suero desactivado al 10 % de CO<sub>2</sub> durante 48 hrs. y la técnica de rosetas. El MGI se determinó por la formación de colonias en bicapa de agar (122).

## PURIFICACION PARCIAL DEL FcRI A PARTIR DE M.C., WR19.1

### ENSAYO CON CELULOSA FOSFATO

Después de reunir las fracciones de concentrado, para calcular el factor de concentración se hizo la lectura de la absorbancia a 215nm y 225nm (Método Ultravioleta A 215-225 basado en la absorción del enlace peptido en la región 195-225 nm.

(Proteína) ug/ml = 144 (2.229 - 2.34) = 7.2 ug/ml.

Concentración que resulta ser pequeña por lo que se buscó otra fuente.

### EXISTENCIA DE FcRI EN ORINA HUMANA

Los resultados indican primero que si hay actividad de FcRI en la orina ya que se encontraron valores de 10, 11 y 8% respecto a negativos de 3 % y además que hubo un pequeño aumento en esta actividad cuando se utilizó orina dializada ó desalinizada ( tabla II ).

### BUSQUEDA DE UN METODO A PEQUENA ESCALA PARA LA PURIFICACION DEL FcRI A PARTIR DE ORINA HUMANA (O.H.)

En la tabla III los resultados muestran, que el factor se pegó en DEAE-celulosa pH 8.5 y gel de fosfato a pH 8. Para precisar más el pH idoneo para la separación del FcRI, se procedió a determinar el pH isoeléctrico de este para ello se efectuó un electroenfoque con O.H. desalinizada sin ningun otro tratamiento, encontrandose un pH isoeléctrico de 7.4.

MUESTRAS	% DE ROSETAS		
	ORINA NORMAL	ORINA DIALIZADA	ORINA DESALINIZADA POR G-25
DONADOR 1	10 %	15 %	11 %
2	11 %	12 %	12 %
3	5 %	7 %	6 %
MUESTRA NEGATIVA	3 %	4 %	4 %
POSITIVO	23 %	30 %	30 %

TABLA II COMPROBACION DE LA EXISTENCIA DE FcRI EN URINA HUMANA

Por los datos de la orina normal, se comprobó la presencia de FcRI en orina humana. Se agregaron 0.2 ml de orina humana normal, desalinizada y esterilizada por filtros Millipor (poro 22  $\mu$ m), a cultivos de  $8 \times 10^6$  células de médula ósea de ratón con 10 % de suero de bovino desactivado, encubados a punto de rocío a  $37^{\circ}\text{C}$  y 10 % de  $\text{CO}_2$  durante 48 hrs. La actividad biológica se detectó con el ensayo de rosetas.

MATERIAL DE SOPORTE	% DE ROSETAS		
	AMORTIGUADOR DE LAVADO	DESPEGADO DE PROTEINAS	
		BUFFER + NaCl 0.5 M	BUFFER + NaCl 0.25 M
DEAE-celulosa (TRIS pH 6.5)	4 %	7 %	N. E.
GEL celulosa Fosfato (en acetato pH 5)	0 %	Las celulas mueren	N. E.
Gel de fosfato (TRIS pH 7)	6 %	N. E.	2.5 %
Gel de fosfato (TRIS pH 8)	2 %	N. E.	9 %
Gel de fosfato (TRIS pH 9)	0 %	N. E.	3 %
POSITIVO (ORINA)	16 %		
NEGATIVO (PBS)	3 %		

N. E. = No efectuado.

TABLA III PURIFICACION DEL FcRI. SEPARACION POR CARGA

Utilizando 0.2 ml de cada fracción se agregó a un cultivo de  $8 \times 10^6$  células de médula ósea de ratón, el % de rosetas se midió 4 días después. El hecho de haber obtenido, tanto en el bioensayo del eluido de la DEAE-celulosa y de gel de fosfato, a pH 8 (7% y 9% receptores Fc respectivamente), valores más bajos que el obtenido con el crudo de orina desalinizada, es probablemente debido a la gran cantidad de sales presentes en los primeros casos.

## CURVA DE INDUCCION DE ROSETAS A PARTIR DE FcRI DE ORINA HUMANA

Una vez que se determinó que existía actividad de FcRI- en O.H. normal se procedió a efectuar la curva de dosis - respuesta (Fig. V ). Se observó que se detecta una inducción a partir de 0.6 ml o sea el 12 % del valor total, esta actividad aumentó (18 %) al utilizar 0.8 ml e inmediatamente -- comenzó a disminuir al aumentar la cantidad de O.H. Esto último es probablemente debido a toxicidad.

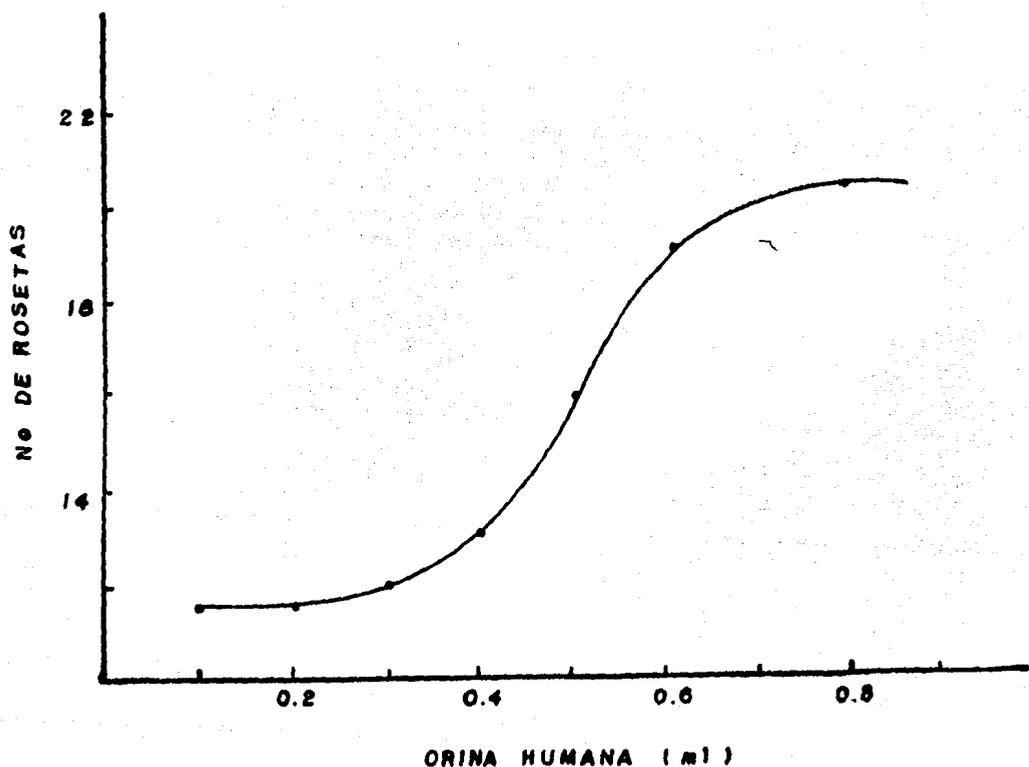


Fig. V INDUCCION A LA FORMACION DE ROSETAS A DIFERENTES  
CONCENTRACIONES DE ORINA HUMANA

Se emplearon  $8 \times 10^6$  células de médula ósea murina, después de 4 días de inducción in vitro, empleando orina humana normal desalinada, donde encontramos anteriormente el factor FcRI.

PURIFICACION PARCIAL DEL FcRI DE ORINA HUMANA  
MEDIANTE UNA COLUMNA DE DEAE-CELULOSA

Al analizar las diferentes fracciones para actividad FcRI se encontró que existían dos picos de actividad. Uno de ellos el de mayor actividad, en las fracciones de la 140 a la 160 y un segundo de mucha menor actividad de la 170 a 180 ( figura VI ).

Es conveniente hacer notar que el pico con mayor actividad coincidió con un pico de proteínas.

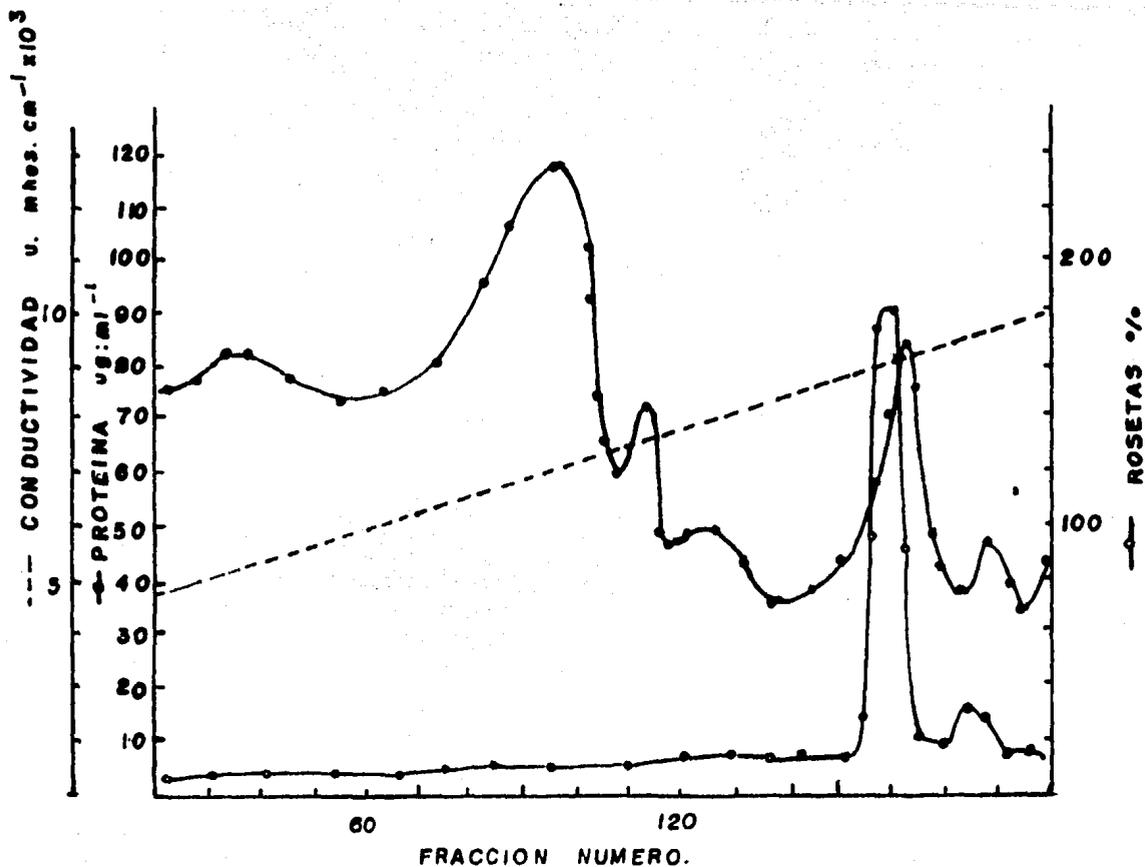


Fig. VI PERFIL DE ELUCION DE O.H. CON UN GRADIENTE DE 0.1- 1M DE NaCl.

(----) gradiente, (•) proteina y (o) actividad FcRI.

El gradiente fue evaluado mediante un electrodo de Na , las proteínas por el método de Bradford y el FcRI mediante la inducción a receptores Fc en  $8 \times 10^6$  células de médula ósea de ratón incubadas con 0.2 ml de fracción durante 3 días.

DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DEL FcRI DE O.H.  
DEL ELUIDO DE LA COLUMNA DE DEAE-CELULOSA.

En la figura VII puede observarse el único pico con actividad biológica. Mediante interpolación de los pesos moleculares de los estandar ( figura VIII) se asigno un valor de 12,500 Da. para el FcRI de O.H.

DETERMINACION DEL pH ISOELECTRICO DEL FcRI DE O.H.  
DEL CONCENTRADO DE DEAE-CELULOSA

La figura IX indica que el FcRI se manifestó en la fracción con pH de 7.4. Este resultado es semejante al obtenido con el crudo.

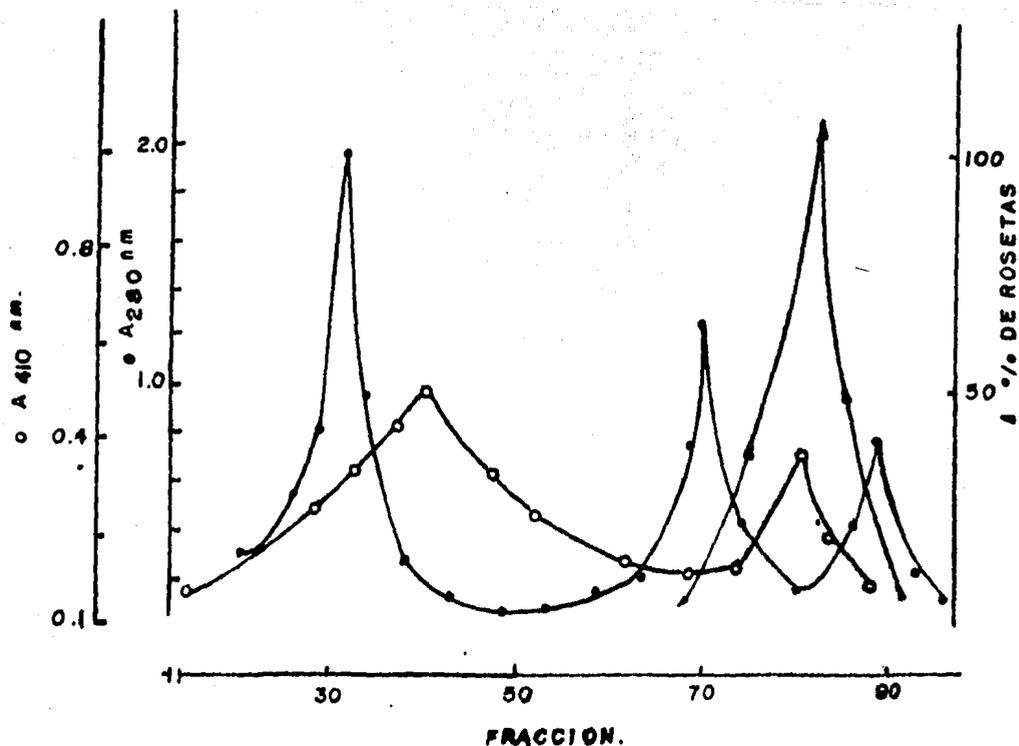


Fig. VII CALIBRACION DE COLUMNA G-50 PARA LA DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DEL FcRI DE O.H.

El material que se pasó por la columna fue 7 ml del tubo de máxima actividad biológica del eluido de la columna de DEAE-celulosa, en una columna K 15/30 con G-50, eluido con TRIS-HCl 75 mM a pH 7.6 y 4°C. Las fracciones colectadas de 2 ml se leyeron a 280 nm (•) y 540 nm (o). La actividad del FcRI fue determinada mediante la técnica de rosetas (▲)

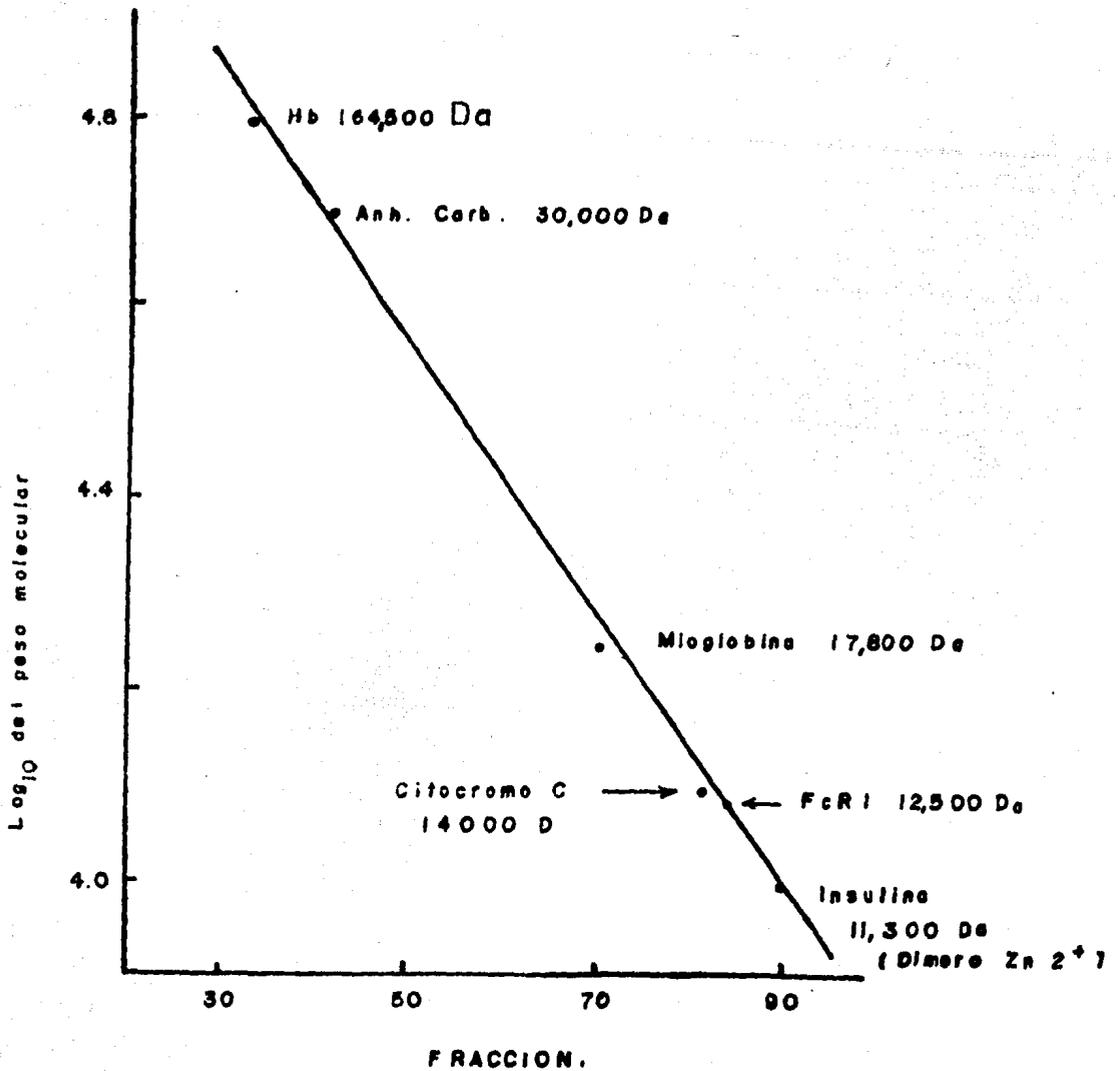


Fig. VIII CALIBRACION PARA LA DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DEL FcRI DE O.H.

La calibración se realizó empleando proteínas de referencia de peso molecular conocido como: hemoglobina 64,500 Da., anhidrasa carbónica 30,000 Da., mioglobina 17,800 Da., citocromo C 14,000 Da., e insulina 11,300 Da. El peso molecular del FcRI de O.H. se determinó interpolándose el pico de mayor actividad biológica de este en el volumen de elución de la columna con Sephadex G-50.

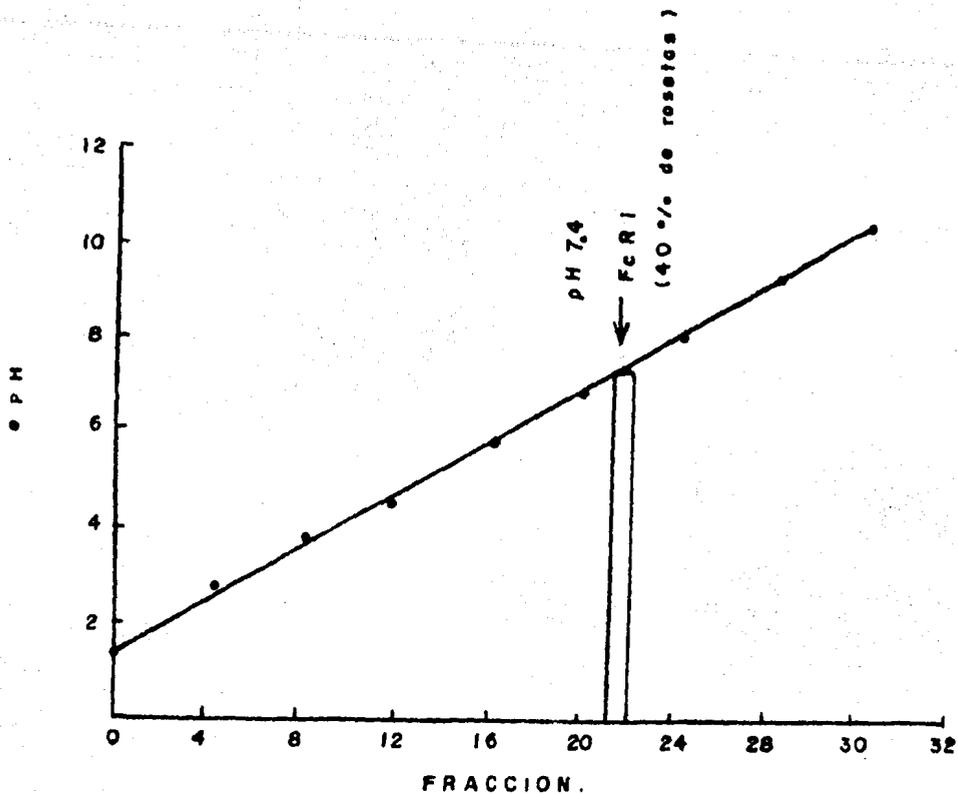


Fig. IX DETERMINACION PH ISOELECTRICO DEL FcRI DE O.H.

Se hizo un electroenfoque preparativo con ultrodex em -  
pleando el concentrado de protefna que pasó por la DEAE-celu  
losa. Se dió voltaje de 40 W con un tiempo de 12 hrs. a 4°C.

La técnica de rosetas se usó para determinar la fra --  
cción con mayor actividad biológica y el pI se determinó a -  
4°C.

DISCUSION, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La formación de células sanguíneas llamada hematopoyesis, es un mecanismo importante para el funcionamiento normal de un organismo y muchos estudios se han hecho para conocer su funcionamiento. Aunque existen todavía muchas incógnitas a este respecto, se sabe que hay un mecanismo de regulación de éstas mediada por proteínas producidas in vivo, cuya finalidad es diferenciar a la célula para realizar funciones específicas.

Durante el proceso de diferenciación las células van adquiriendo características especiales como son: las inmunológicas (la presencia de sitios receptores para Fc, la presencia de receptores 1, 2 para el complemento), las bioquímicas (la secreción de lisozima), las funcionales (la fagocitosis, quimiotaxis) y las morfológicas (aumento de tamaño entre otros, cambios nucleares y aparición y desaparición de estructuras).

En el estudio de la hematopoyesis se ha encontrado, que es indispensable para la diferenciación in vitro una sustancia inductora llamada MGI la cual induce a la proliferación y diferenciación de granulocitos y macrófagos, y se cree que juega también el papel de regulador fisiológico in vivo.

Es innegable la importancia que tienen los receptores para Fc en la defensa del organismo contra cuerpos extraños, sin embargo poco se sabe sobre el proceso de su inducción.

Aunque en un principio se pensaba que el MGI inducía la maduración completa de los macrófagos y los granulocitos,

se encontraron recientemente evidencias de que el MGI no -- inducía la aparición de receptores para Fc y que existía -- otro factor causante de esto al cual llamaron FcRI (112).

Para proseguir a estudiar en forma más detallada el mecanismo de inducción de receptores para Fc, así como el estudio de sus aplicaciones diagnósticas y terapéuticas se hizo necesario, buscar fuentes ricas de dicho factor de donde purificarlo.

En el presente trabajo nos pusimos como meta el diseñar un método de obtención y purificación suficiente de FcRI -- para corroborar la independencia entre MGI y FcRI y abrir la posibilidad de un estudio más detallado de su estructura molecular y comportamiento biológico.

En este trabajo encontramos, que las propiedades moleculares obtenidas para el MGI, variaban de acuerdo a la fuente de su obtención y a la técnica empleada y que diferían en todos los casos del FcRI, en cuanto a su peso molecular y pH isoeléctrico.

Lo anterior indica que son dos moléculas diferentes, y que sus propiedades biológicas pueden ser evaluadas independientemente.

El peso molecular que encontramos para el FcRI y MGI -- del medio condicionado por la línea leucémica fué de 18,500- y 45,000 daltones respectivamente, el peso molecular obtenido para el MGI es similar a otros reportados (34). En cuanto a los valores de pH isoeléctricos encontrados resultaron ser

de 5.1 para el MGI y 7.6 para el FcRI utilizando el mismo medio condicionado.

La determinación del peso molecular del FcRI del medio-condicionado, se efectuó tanto por cromatografía como por ultracentrifugación obteniéndose en el segundo caso un valor de 16,000 daltones el cual nos indica una vez más que es una molécula mucho más pequeña que el MGI.

El FcRI proveniente de la línea WR19M.1 se pegó a celulosa fosfato, pero la cantidad de FcRI concentrada de esta manera que fué de 7.5 ug/ml nos indicó, que las cantidades de medio condicionado que se necesitaría, para obtener una fracción suficiente para continuar los estudios planteados, sería enorme, por el tiempo y costo que se necesita para producir una cantidad útil de medio condicionado. Por lo cual decidimos buscar otras fuentes ricas en FcRI.

El detectar que este factor existía en la orina humana nos abrió la posibilidad de contar con una fuente rica y barata con dicho factor. Se encontró que al utilizar DEAE-celulosa, o gel de fosfato se podía separar este factor de otras proteínas entre ellas el MGI. Sin embargo la columna de DEAE-celulosa resultó ser un soporte bastante bueno, con el que se logra una óptima separación de proteínas, ya que encontramos que la actividad biológica aumentaba aproximadamente 200 % más que la actividad presentada por la orina humana no fraccionada.

Creemos que este aumento se debe también a la elimina -

ción de factores tóxicos de pequeño peso molecular.

Podemos concluir a partir de nuestros resultados que el FcRI es un factor que existe en el ser humano, que se puede utilizar médula ósea murina para su bioensayo, lo cual evita emplear médula ósea humana la cual es mucho más difícil de obtener, que tiene un peso molecular de 12,500 daltones un poco mayor menor a la murina y un pH isoeléctrico de 7.4 muy superior a la encontrada en ratón.

Creemos que este trabajo abre el camino para la posterior purificación del FcRI humano, utilizando las técnicas bioquímicas estandar. Esperamos de esta forma se pueda obtener un factor en forma homogénea que nos permita no únicamente entender su estructura, sino su posible aplicación terapéutica en padecimientos en donde un aumento del receptor para Fc pueda ser de utilidad, como lo son obviamente en padecimientos infecciosos (activación del macrófago) y probablemente en leucemias (sobre todo de tipo mieloide).

## APENDICE

MEDIO DE EAGLE:

### CONCENTRACIONES

	Miligramos por 1000 ml de agua	Equivalentes aprox. en mM
ARGININA	105	0.6
CISTEINA	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
TRIPTOFANO	10	0.05
TIROSINA	36	0.2
VALINA	46	0.4
GLUTAMINA	292	2.0
COLINA	1	
AC. NICOTINICO	1	
AC. PANTOTENICO	1	
PIRIDOXAL	1	
RIBOFLAVINA	0.1	
TIAMINA	1	

MEDIO DE EAGLE:

CONCENTRACIONES

	Miligramos por 1000 ml de agua	Equivalentes aprox. en mM
INOSITOL	2	
AC. FOLICO	1	
GLUCOSA	2000	
NaCl	8000	
KCl	400	
CaCl	140	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	100	
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	100	
NaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	60	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60	
NaHCO <sub>3</sub>	350	
ROJO FENOL	20	
PENICILINA	0.5	

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (SAF): Con el objeto de contar con una solución para el mantenimiento de la célula, se utilizó la solución amortiguadora de fosfatos (SAF), la cual esta constituida de los siguientes elementos en 1 000 ml de agua destilada.

NaCl	8.0 g.
KCl	0.2 "
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 "

CaCl	0.1 g.
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.1 "
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.1 "

El CaCl y MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O se diluyen por separado en 100 ml. de agua destilada, los compuestos restantes se diluyen en po co menos de 800 ml. de agua destilada, agregando al final, - poco a poco hasta completar los 1000 mililitros y se esteriliza por medio de un filtro de membrana (Millipore USA) con un poro de 22 micras de diámetro. Se realizan pruebas de esterilidad en caldo soya. Se conserva en refrigeración hasta su uso.

SOLUCION ALSEVER: Solución amortiguadora para mantener los eritrocitos de carnero en condiciones normales in vitro durante 5 semanas. Se prepara como sigue:

C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	20.50 g.
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> .2H <sub>2</sub> O	8.00 "
H <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O	0.55 "
NaCl	4.20 "

Se disuelven en un litro de agua y se esteriliza en autoclave, ajustando el pH a 6.1. Se efectuan pruebas de esterilidad en caldo de soya.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Wintrobe, M.M., R. E Lee. D. R. Boogs T. Bithell, J.M. Athenas y J. Foerster. Clinical Hematology, 7th ed. - Lea-Febiger. Philadelphia, U.S.A. Capítulos 2,6,8, 42- (1974).
- 2.- Melcaef, D. (1973) Regulation of Grow and Differentiation in Hematopoietic colonies Growing in agar. J. - Natl. Cancer, Insti. 50:591.
- 3.- Lieberman, M, Maligt, G (1978) Progresos Recientes en oncología I.M.S.S. México.
- 4.- Fibach, E, Landau T; Sachs, L (1972) Normal Differentiation of Myeloid Leukaemic Cell Induced By a Differentiation inducing Protein. Nat, New Biol. Sc. M. S - 70:343.
- 5.- Eaves, A; Druce, W. (1973) In Vitro Production of Colony Stimulating Activity: I. Exposure of Mouse, Peritoneal Cells to Endotoxin. Cell Tissue Kinet, 7:19.
- 6.- Parker, J, Metcalf, D. (1973) Production of Colony Stimulating Activity in Mitogen-Stimulated Lymphocyte Cultures. Jour Immunol. 1112:502.
- 7.- Cline, M, Rothaman, B; Golde, D. (1974) Effect of Endotoxin on the Production of Colony-Stimulating Factor - By Human Monocytes and Macrophages J. Cell Physiol - 84:197.
- 8.- Pastan, I, Cell Transformation En Methods in Enzimology Vol. LVIII. Academic Press Nueva York. (1979).
- 9.- Defendi, V. Macrophage Cell Lines and their Uses in Immunobiology. En Immunobiology of the Macrophage. - Academic Press. Nueva York P. 275 (1976).
- 10.- Gmeiner, J; Luderita, O; Westphal, O. (1969) Biochemical Studies on Lipopolisaccharides of Salmonella R. - Mutants. 7:370.

- 11.- Ham, R. H. y W. L. Mc. Keelan. En: Methods in Enzimology. Academic Press. N.Y., U.S.A. 58:44 (1979).
- 12.- Dyson, R. Cell Biology, A molecular approach Allyn and Bacon, Inc. U. S. A. pp: 500 (1974).
- 13.- Abbas, A. And Unanue, E. (1975) Interrelationships of Surface immunoglobulins and Fc Receptors on Mouse B Lymphocytes. J. Immunol. 115:1665.
- 14.- Paul, J. Cell and Tissue Culture. 4th, ed. Churchill Livingstone, G. B. Capítulos: 2,4,5 y 8. (1973).
- 15.- Abbas, A. y E. Unanue. (1975). J. Immunol. 115:1 665.
- 16.- Ginsburg, H. y L. Sachs (1968). J. Nat. Cancer Inst. 31:1.
- 17.- Lehninger, A. Biochemistry 2ed. Worth Nueva York. (1975).
- 18.- Lieberman, M; Mouligt, G. Progresos Recientes en Oncología I.N.S.S. México. (1978).
- 19.- Macclimans, W; Mass Culture of Mammalian Cell. En Methods in Enzimology Vol. LVII. Academic Press. Nueva York. (1979).
- 20.- Sachs, L. New Perspectives in Biology Elsevier Amsterdam P. 246. (1964).
- 21.- Bradley, T; Metcalf, D; Robinson, W. (1967) Stimulation by Leukaemic Sera of Colony Formation in Solid Agar Cultures by Proliferation of Mouse Bone Marrow Cells - Nature 213:926.
- 22.- Shiridan, J; Metcalf, D; Stanley, E; (1974) Further Studies on the Factor in Lug-conditioned Modium Stri - mulating Granulocyte and Monocyte Colony Formation In-Vitro L. Cell Physiol. 84:147.
- 23.- Stewart, C; Lin, H. (1978) Macrophage Growth Factor -- and its Relationship to colony Stimulating Factor J. Reticuloendothel. Soc. 4:269.
- 24.- Price, G; Krogsrud, R; Stewart, S; Senn, J. Heterogeneity of Colony Stimulating activities. En Hematopoietic Cell Differentiation. Academic. Press. Nueva York- (1978).

- 25.- Ralph, P; Broxmeyer, H; Moore, N; Nakoinz, I (1978) --  
Induction of Myeloid Colony Stimulating Activity in Mu-  
rine Monocyte tumor Cell Lines by Macrophage Activator  
and in at-Cell Line by Concanalin A. Cancer Research -  
38:1 414.
- 26.- Sachs, L. Control of Normal Cell Differentiation in -  
Leukaemic Cells. Comparative Leukaemia Research Bibl.-  
Hemat. 43. (1976).
- 27.- Lotem, J; Sachs, L. (1977) Genetic Dissection of the -  
Control of Normal B: Differentiation in Myeloid Leukae-  
mic Cells. Cell Biology 19:5 554.
- 28.- Maeda, S; Sachs, L (1978) control of Normal Differen-  
tiation of Myeloid Leukaemic Cells: AIII. Inducibility  
for some stages of Differentiation by Dimethylsulfoxide  
and its Dissociation from Inductibility by M.G.I. J.  
Cell Physiol 94:181.
- 29.- Bradley, T, Stanley, E; Summer, M. (1971) Factors From  
Mouse tissues Stimulating Colony Growth of Mouse Bone -  
Marrow Cells in Vitro, Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. -  
49:595.
- 30.- Bull, F; Rosedal, M. (1978) Macrophage Colony Develo-  
pment: Properties of Colony Stimulating Factors From-  
Murine Embryo and Pregnant Uterus Immunology 34:479.
- 31.- Stanley, E; Robinson, W; Ada, G. (1968) Properties of-  
Colony Stimulating Factors in Leukaemic and Normal Mou-  
se Serum. Exp. Biol. Med. Sci. 46:715.
- 32.- Mintz, Sachs, L. (1974) Differences in Inducing Activi-  
ty for human Bone Marrow Colonies in Normal Granulocy-  
tic colonies by Mouse Bone Marrow Cells In Vitro J. -  
Cell Physiol. 84:275.
- 33.- Sheridan, J; Metcalf, D. (1973) the Bone Marrow CSF re-  
lation of Serum CSF to Urine CSF Proc. Soc. Exp. Biol.  
Med. 144:785.
- 34.- Motoyoshi, K; Takaku, F; Mizoguchi, H; Miura, Y. (1978)  
Purification and Some Properties of Colony-Stimulating  
Factor from normal Human Urine. Blood. 5:1 012.

- 35.- Moore, M. Regulation of Granulopoiesis In Vitro. En - Hematopoietic Cell Differentiation. Academic Press - Nueva York. (1978).
- 36.- Dipersio, J; Brennan, J; Litchman, M. Granulocyte - Growth Modulators Elaborated by Human Cell lines. En - Hematopoietic Cell Differentiation Academic Press Nueva York. (1978).
- 37.- Williams, N; Pluznik, D. (1970) Differences in the - Density Characteristics in Murine Granulocyte-Progenitor Cells Cloned in the Presence of Serum and or Hemolysate Exp. Hemat. 6:383.
- 38.- Metcalf, d. (1971) Acute Antigen-Induced Elevation of Serum CSA levels. Immunol. 21:247.
- 39.- Metcalf, D; Wilson, J. (1976) Endotoxin-induced Size - Change in Bone Marrow Progenitors of Granulocytes and Macrophages. J. Cell Physiol. 89:381.
- 40.- Gmeiner, J; Luderitz, O; Westphal, O. (1969) Biochemical Studies en Lipopolisaccherides of Salmonella R. - Mutants. 7:370.
- 41.- Luderitz, O; Galanos, G; Lehmann, V, Nurminen, M; Ritschel, E; Rosefelder, G, Simon, M; Westphal, O (1973)- Lipid A Chemical Structure and Biological Activity, - Jour. of Inections Diseases. 128:517.
- 42.- Weiss, B; Sachs, L. (1978) Differences in Surface Membrane Ecto-ATpasa and Ecto-AMpse in Normal and Malignant Cells and the Independent Regulation of Ecto-ATpase and ECTO AMpse, J. Cell Physiol. 93:183.
- 43.- Williams, N; Eger, R. Purification and Characterization of Clonable Murine Granulocyte-macrophage precursor - Cell Populations. En Hematopoietic Cell Differentia - tion. Academic Press. Nueva York. (1978).
- 44.- Burgess, A; Metcalf, D; Nicola, N; Russell, S; Purification and Characterization of Cell Specific Colony-Stimulating Factors. En Hematopoietic Cell Differentia - tion, Academic Press. Nueva York. (1978).

- 45.- Burgess, A; Camarkario, J; Metcalf, D. (1977), Puri--  
fication and Properties of CSF from Mouse Lung Condi -  
tioned Medium.
- 46.- Price, G; McCulloch, E; Till, J. (1973) A New Low Mole  
cular Weight for Colony Stimulating Activities. Blood-  
42:341.
- 47.- Fojo, S; Wu, N; Gross, N; Yunis, A. (1977) the Isola -  
tion and Characterization of a Colony Stimulating Fac -  
tor from Human Lung. Biochem. Biophys. Acta. 494:92.
- 48.- Landau, T; Sachs, L. (1971) Characterization of the -  
Inducer Required for the Development of Macrophage and  
Granulocyte Colonies. Proc. Nat. Acad. Sci. 68:234.
- 49.- Watson, J; Prichard, J. (1972) Characterization of a -  
Factor Required for the Differentiation of Myeloid and  
Lymphoid Cells in Vitro. J. Immunol 108:1 209.
- 50.- Mackeever, E.P. and Spicer, S.S. (1982) Surface recep -  
tors of mononuclear Phagocytes. The reticuloendo the -  
lial system a comprehensive treatise.
- 51.- Edelson, P. J. Zwiebel, R. and Cohn, Z. A. (1975). The  
pinocytic rate of activated macrophages. J. Exp. Med. -  
142:1 150.
- 52.- Ratzan, K.R. Musher, D. N. Keusch, G. T. and Weinstein  
L. (1972). Correlation of increased metabolic activity  
resistance to infection, enhanced phagocytosis, and in  
hibition of bacterial growth by macrophages from Lis -  
teria and BCG infected mice. Infect. Immunol. 5:449.
- 53.- Edelson, P. J. Zwiebel, R. and Cohn, Z. A. (1975). The  
pinocytic rate of activated macrophages. J. Exp. Med.-  
142:1 150.
- 54.- Edelson, P.J. and ERbs, C. (1978). Biochemical and fun  
ctional Characteristics of the plasma membrane of ma -  
crophages from BCG-infected mice. J. Immunol 120:1 532
- 55.- Bianco, C. Griffin, F.M. and Silvestein, S. C. (1975)-  
Studies of the macrophage complement receptor. Altera -  
tion of receptor function upon macrophages activation-  
J. Exp. Med. 141:1 278.

- 56.- Carr, K. and Carr, I. (1970). How cell settle and glass: A study by light and scanning electrom microscopy of some properties of normal and stimulated macrophages. *Z. Zellforsch Mikrosk. Anat.* 105:234.
- 57.- Bianco, C. Eden, A. and Cohn, Z. A. (1976). The induction of macrophage spreading: role of coagulation factor and the complement system, *J. Exp. Med.* 144:1 531
- 58.- Burgeleta, C. Territe, M. C. Quan, S. G. and Golde, D. W. (1978) Glucan activated macrophages: functional-Characteristics and Surface morphology. *J. Reticuloendothelial. Soc.* 23:195.
- 59.- Edelson, P.J. and Cohn, Z. A. (1976). 5'Nucleotidase activity of mouse peritoneal macrophages. I. Synthesis and degradation in resident and inflammatory population *J. Exp. Med.* 144:1 581.
- 60.- Nelson, H. and Seljelid, R. (1973) the cytotoxic effect of mouse macrophages on syngenic and allogenic erythrocytes. *J. Exp. Med.* 131:807.
- 61.- Hibbs, Jr. J. B. (1976). The macrophage as a tumoricidal effector cell: a review of in vivo and in vitro studies on the mechanism of the activated macrophage nonspecific cytotoxic reaction, in: the macrophage in neoplasia (M.A. Fink, Ed) pag. 83-111 Aca. Press. New York.
- 62.- Hanna, Jr M. G. Bucana, C. Hobbs, B. and Fidler, I.J.- (1976). Morphologic aspect of tumor cell cytotoxicity by effector cell of the macrophage histiocyte compartment: In vivo and in vitro studies in BCG mediated tumor regression, in: the macrophage in neoplasia (M. A. Fink, T, Ed) pag. 113-133 Aca. Press. New York.
- 63.- Dannenberg, Jr A. M. (1968) Cellular hypersensitivity and cellular immunity in the pathogenesis of tuberculosis: specificity, systemic and local nature, and associated macrophage enzymes *Bact. Rev.* 32:85.

- 64.- Vander Zrijts, B.A.M. Stewart, C.C. and Schlesingers - S. (1978). Proliferative capacity of mouse peritoneal-macrophages in vitro. J. Exp. Med. 147:1 253.
- 65.- Dannenberg, Jr A. M. (1968) Cellular hypersensitivity- and cellular immunity in the pathogenesis of tubercu - losis: specificity, systemic and local nature and asso - ciated macrophage enzymes Bact. Rev. 32:85.
- 66.- Mckeever, P.E. Garvin, A.J. Hardin, D.H. and Spicer, - S.S. (1976). Immune complex receptor on cell surfaces. II. Cytochemical evaluation of their abundance on di - fferent immune cells: Distribution, uptake, and regene - ration. Am. J. Pathol 84:437.
- 67.- Territo, M. C. Golde, D.W. and Cline, M.S. (1976). Ma - crophage activation and function, in: Manual of Clinical immunology (N.R. Rose and H. Friedman, Ed) Pag. - 142-158 Am. Soc. for Microbiol. Washington, D. C.
- 68.- Poplack, D. C. Sher, N.A. Chaparas, S. D. and Blaese - R.M. (1976). The effect of mycobacterium bovis (Baci - llius Calmette Guerin) on macrophage random migration - chemotaxis and pinocytosis. Cancer. Rev. 36:1 233.
- 69.- Ratzan, K.R. Nusher. D. M. Keusch. G.T. and Weinstein, L. (1972). Correlation on increased metabolic activity resistance to infection, enhanced phagocytosis, and in - hibition of bacterial growth by macrophages from Lis - teria and BCG infected mice. Infect. Immunol. 5:499.
- 70.- Stubbs, M. Kühner, A. C. Glass, E.A. David, J.R. and - Karnovsky, M.L. (1973). Metabolic and functional stu - dies on activated mouse macrophages. J. Exp. Med. 137 537.
- 71.- Haranaka, K. Matsuo, M. and Mashino, K. (1977). The - enhancement of phagocytosis and intracellular killing - of Pseudomonas aeruginosa and its common antigen - (OEP) coated latex particles by mouse spleen macropha - ges to which anti-OEP-IgG and gentamicin have been - added. Jpn. J. Exp. Med. 47:35.

- 72.- Reynolds, H.Y. and Thompon, R.E. (1973). Pulmonary host defenses. II. Interaction of respiratory antibodies - with Pseudo monas aeruginosa and alveolar macrophages. J. Immunol. III:369.
- 73.- Reynold, H.Y. (1974). Pulmonary host defenses in ra - bbits after immunization with Pseudomonas antigens: - The interaction of bacterial, antibodies, macrophages- and lymphocytes. J. Infect. Dis. 130:5.
- 74.- Diamond, B. Birshtein, B.K. and Scharff, M.D. (1979) - Site of binding of mause IgG to the Fc receptor on mau - se macrophages. J. Exp. Med. 150:721.
- 75.- Dorrington, K.J. (1976). Properties of the Fc receptor on macrophages and monocytes. Immunol. Commun. 5:263-
- 76.- Shear, H.L. Nussenzweig, R.S. and Bianco, C. (1979) - Immune phagocytosis in murine malaria. J. Exp. Med. - 149:1 288.
- 77.- Kassis, A.L. Aikawa, M. and Mahmoud, A.F. (1979). Mau - se antibody-dependent eosinophil and macrophage adhe - rence and damage to schistosomula of Schistosoma man - soni. J. Immunol 122:398.
- 78.- Knyszynski, A. Lebovich, S.J. and Danon, D. (1977). - Phagocytosis of "old" red blood cell by macrophages - from syngenic mice in vitro. Exp. Hematol. 5:480.
- 79.- Kay, M.M.B. (1975). Mechanism of removal of senescent- cell by human macrophages in situ. Proc. Nat. Aca. Sci 72:3 521.
- 80.- Jancik, J.M. and Schaver, R. (1978). Sequestration of neuraminidase treated erythrocyte. Studies on it is - topografic, morphologic and immunologic aspects. Cell. Tissue Res. 186:209.
- 81.- Nicolson, G.L. (1973). Neuraminidase "unmasking" and - failure of tripsin to "unmask" B-D-galactose-like si - - tes on erythrocyte, lymphoma and normal and virus -- transformed fibroblast cell membranes, J.Natl. Cancer Inst. 50:1 443.

- 82.- Bianco, C. Methods for study of macrophage Fc and C<sub>3</sub> - receptors, in: In vitro methods in cell-mediated and - tumor immunity (B.R. Bloom, and J.R. Davis, Ed) pag - 407-415 Aca. Press. New York. (1976).
- 83.- Thrasher, S.G. Bigazzi, P.E. Yoshida, T. and Cohen, S. (1975b). Distribution of cytophilic and anti-macrophage antibody on the macrophage surface. Immunol Commun- 4:219.
- 84.- Kuhn, R.R. and Cassida, G.W. (1978). An indirect quantifiable assay for cytophilic antibody. J. Immunol Methods. 19:387.
- 85.- Unkeless, J.C. and Eisen, H. N. (1975). Binding of monomeric immunoglobulins to Fc receptors of mouse macrophages. J. Exp. Med. 142:1 520.
- 86.- Segal, D.H. and Murvits, E. (1977). Binding of affinity cross-linked oligomers of IgG to cell bearing Fc - receptors. J. Immunol. 118:1 338.
- 87.- Phillips-Quagliata, J.M. Levine, B.B. Quagliata, F. - and Uhr, J.W. (1971). Mechanism underlying binding of immune complexes to macrophages. J. Exp. Med. 133:589
- 88.- Segal, D.M. titus, J.A. (1978). The subclass specificity for the binding of murine myeloma proteins to macrophage and lymphocyte cell lines and to normal spleen cell. J. Immunol 120:1 395.
- 89.- Benacerraf, B. (1968). Cytophilic immunoglobulins and delayed hypersensitivity. Fed. Proc. 27:46.
- 90.- Shinomiya, T. and Koyama, J. (1976). In vitro uptake - and digestion of immune complexes containing guinea - pig IgG1 and IgG2 antibodies by macrophages. Immunology 30:267.
- 91.- Thrasher, S. G. and Cohen, S. (1971). Studies of the mechanism of binding of chemical modified cytophilic - antibodies to macrophages. J. Immunol 107:672
- 92.- Munthe-Kass, A.C. (1976). Phagocytosis in rat Kupfer - cell in vitro. Exp. Cell. Res. 99:319.

- 93.- Gigli, I. and Nelson, Jr R. A. (1968). Complement dependent immune phagocytosis. I. Requirements for C<sub>1</sub>, - C<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>. Exp. Cell. Res. 51:45
- 94.- Alper, C.A. Abramson, N. Johnston Jr R.B. Jandl, J.H.- and Rosen, F.S. (1970). Studies in vivo and in vitro - on an abnormality in the metabolism of C<sub>3</sub> in a patient with increased susceptibility to infection. J. Clin. - Invest. 49:1 975.
- 95.- Alper, C.A. Colten, H.R. Rosen, F.S. Rabson, A.A. Macnab, G.M. and Gear, J.S.S. (1972). Homozygous deficiency of C<sub>3</sub> in a patient with repeated infection. Lancet- 2:1 179.
- 96.- Ward, H.K. and Enders, J.F. (1933). An analysis of the opsonic and tropic action of normal and immune sera based on experimental work with the Pneumococcus. J. Exp. Med. 57:527.
- 97.- Li, L.W. Mudd, S. and Kapral, F.A. (1963). Dissociation of phagocytosis and intracellular killing of Staphylococcus aureus by human blood leukocytes. J. Immunol. 90:804.
- 98.- Young, L.S. (1974). The host: humoral and cellular factors. Role of antibody in infection due to Pseudomonas aeruginosa J. Infect. Dis. 130:S111.
- 99.- Heilman, D.H. (1977). Regulation of endotoxin-induced-inhibition of macrophage migration by fresh serum. Infect. Immu. 17:371.
- 100.- Griffin, Jr F.M. Bianco, C. and Silverstein, S. C. - (1975a). Characterization of the macrophage receptor - for complement and demonstration of its functional independence from the receptor for the Fc portion of immunoglobulin G. J. Exp. Med. 141:1 269.
- 101.- Montovani, B. Rabinovitch, M. and Nussenzweig, V. - (1972). Phagocytosis of immune complexes by macrophages. Different roles of the macrophage receptor sites for complement (C<sub>3</sub>) and for immunoglobulin (IgG). J. - Exp. Med. 135:780.

- 102.- Theofilopoulos, A.N. Bokish, V.A. and Dixon, F.J. -- (1974). Receptor for soluble C3 and C3b on human lymphoblastoid (Raji) cell. Properties and biological significance. J. Exp. Med. 139:696.
- 103.- Ehlenberger, A.G. and Nussenzweig, V. (1977). The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis. J. Exp. Med. 145:357.
- 104.- Wellek, B. Hahn, H. and Opferkuch, W. (1976b). Quantitative contributions of IgG, IgM and C3 to erythrophagocytosis and rosette formation by peritoneal macrophages and anti-opsonin activity of dextran sulfate 500. Eur. J. Immunol. 5:378.
- 105.- Nichl, J. Piecznonko, M.M. Unkeless, J.C. and Silverstein, S.C. (1979). Effect of immobilized immune complexes on Fc and complement-receptor function in resident and thioglycollate elicited mouse peritoneal macrophages. J. Exp. Med. 150:607.
- 106.- Rabellino, E.M. Gordon, D.F. Williams, N. and Metcalf, D. (1978). Sequential expression of membrane receptors and phagocytic capacity during leukocyte differentiation. J. Exp. Med. 147:434.
- 107.- Cline, M. The white cell. Harvard university press. - Cambridge pag 345:348. (1975).
- 108.- Hammerling, N. Chin, A. and Abbot, J. (1976). Ontogeny of murine B lymphocytes: Sequence of B cell differentiation from surface immunoglobulin negative precursors to plasma cell. Proc. Natl. Aca. Sci. 73: - 2003.
- 109.- Czop, K. and Austen, B. (1980). Functional Discrimination by human monocytes between their C3 receptors. J. Immunol. 125:124.
- 110.- Lotem, J. and Sachs, L. (1974). Different Blocks in the differentiation of myeloid leukemic cell. Proc. Nat Aca. Sci. 71: 3 507.
- 111.- Rabellino, E.M. and Metcalf, D. (1975). Receptors for C3 and IgG on macrophage, neutrophil and eosinophil colony cells grown in vitro. J. Immunol. 115:668.

- 112.- Calcagno, M: (1982). Existence of a factor that Induces Fe Receptors on Bone Marrow Cells. *Blood* 59:4.
- 113.- Williams, S. *Fisiología Molecular*, 1 Ed. Publicaciones Culturales. (1977).
- 114.- Harrison, L: (1976). The Glycoprotein Inner Layer of Glomerular Capillary Basement Membrane as a Filtration Barrier. *Journal of Ultrastructure Research* 57:65-67.
- 115.- Bradford, M: (1976). *Anal Biochem* 72:248.
- 116.- Martín R.G, Ames BN: (1961) A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes: application to protein mixtures. *J. Biol. Chem.* 236:1 372.
- 117.- Radola B J: (1973). analytical and preparative isoelectric focusing in gel stabilized layers. *Ann New York Acad. Sci.* 20:127.
- 118.- Radola B J: (1974). Isoelectric focusing in layers of granulated gel. II. Preparative isoelectric focusing. *Biochim Biophys Acta* 386:181.
- 119.- Bradley T R, Metcalf D: (1966) The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 44:287.
- 120.- Fluznik D H, Sachs L: (1966) The induction of clones of normal mast cells by a substance from conditioned medium *Exp. Cell. Res.* 43:553
- 121.- *Sephadex: Theory and Experimental Technique* (pamphlet) Pharmacia Fine Chemicals, Inc. Uppsala, Sweden.
- 122.- *DEAE-CELLULOSE: Theory and Experimental Technique* (Pamphlet) Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Uppsala, Sweden.
- 123.- *Experimental Biochemistry Laboratory Manual*. Department of Biochemistry, University of Wisconsin, (1967)
- 124.- O.H. Lowry y Col., (1951) *J. Biol. Chem.* 193-265
- 125.- W. Kies (1960) *Biochem. Biophys* 45-382.