

Universidad Autónoma Metropolitana

U n i d a d I z t a p a l a p a

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

126954

ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE UN
FACTOR MEGACARIOPOYETICO A PARTIR DEL CULTIVO DE BAZO
DE RATON EN UN MEDIO LIBRE DE SUERO.

*Tesis que presenta el Q.B.P. Rodolfo
Velasco Lezama para optar por el grado
de Maestro en Biología Experimental*

MEXICO, D. F.

JUNIO DE 1992

126954

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LA SECCION DE BIOLOGIA
DEL CANCER DEL INSTITUTO MALLINKRODT PERTENECIENTE A LA
UNIVERSIDAD WASHINGTON EN SAN LUIS MISSOURI, CONTANDO CON
LA DIRECCION DEL DR. ALEXANDER NAKEFF.

U. S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE

La Maestría en Biología Experimental de la UAM-Iztapalapa está en el padrón de posgrado de excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y cuenta con el apoyo por medio del convenio de fortalecimiento del posgrado nacional No. 7.

CONTENIDO

CAPITULO	I		
		INTRODUCCION -----	7
CAPITULO	II		
		MATERIAL Y METODOS -----	34
CAPITULO	III		
		RESULTADOS Y DISCUSION -----	51
CAPITULO	IV		
		CONCLUSIONES -----	117
CAPITULO	V		
		BIBLIOGRAFIA -----	120

CAPITULO I

INTRODUCCION

	PAG.
1.1.0. HISTORIA DEL ESTUDIO DE LOS MEGACARIOCITOS Y DE SUS CELULAS PRECURSORAS -----	7
1.1.1. ESTRUCTURA MORFOLOGICA DE LOS MEGACARIOCITOS -----	11
1.1.2. REGULACION HUMORAL DE LA MEGACARIOPOYESIS Y DE LA TROMBOPOYESIS -----	14
1.1.3. ESTUDIOS <i>In vivo</i> e <i>In vitro</i> DE LOS FACTORES O ACTIVIDADES ESTIMULANTES DE LA MEGACARIOPOYESIS -----	17
1.1.4. FUENTES DE OBTENCION <i>In vitro</i> DE LOS FACTORES O ACTIVIDADES ESTIMULANTES DE LA MEGACARIOPOYESIS -----	19
1.2.0. JUSTIFICACION DEL TRABAJO -----	23
1.3.0. OBJETIVO -----	25
1.4.0. DISEÑO EXPERIMENTAL -----	26

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS	PAG.
2.1. MATERIAL Y EQUIPO -----	34
2.2. PREPARACION DE MEDIO CONDICIONADO DE BAZO DE RATON---	36
2.3. CULTIVO DE MEDULA OSEA PARA EL DESARROLLO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE MEGACARIOCITOS (UFC-Meg) --	41
2.4. TINCION DE TIOLINESTERASA-HEMATOXILINA PARA LA IDENTIFICACION DE (UFC-Meg) -----	43
2.5. CUANTIFICACION DE PROTEINAS TOTALES POR EL METODO DE LOWRY -----	45
2.6. PRECIPITACION DE PROTEINAS CON SULFATO DE AMONIO ---	47
2.7. FRACCIONAMIENTO DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (HPLC)--	49
2.8 ANALISIS ESTADISTICO -----	50

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION	PAG.
3.1.0 SELECCION DE LA CEPA DE RATON CON MAYOR CAPACIDAD PARA LA PRODUCCION DEL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE MEGACARIOCITOS PREPARADO CON MEDIO ALFA - 10. ----	51
3.2.0 PREPARACION DE MEDIO CONDICIONADO DE BAZO DE RATON	
3.2.1 CON SUERO DE CABALLO AL 10%.	
3.2.2 CON SUERO DE CABALLO AL 1%.	
3.2.3 EN MEDIO LIBRE DE SUERO, COMPLEMENTADO CON COMPONENTES SERICOS	
3.2.4 EN MEDIO LIBRE DE SUERO Y DE COMPONENTES SERICOS	
3.2.5 DETERMINACION DEL TIEMPO OPTIMO DE COSECHA. -----	55
3.3.0 REPRODUCIBILIDAD DE LA CAPACIDAD ESTIMULANTE DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS CON SUERO Y LIBRE DE SUERO.-----	59
3.4.0 CONCENTRACION DEL MEDIO CONDICIONADO LIBRE DE SUERO POR ULTRAFILTRACION RELACIONADA CON SU CAPACIDAD ESTIMULANTE . -----	62
3.5.0 PRECIPITACION FRACCIONADA DEL MEDIO CONDICIONADO LIBRE DE SUERO . -----	64

3.6.0	IMPORTANCIA DE LA ALBUMINA SERICA EN LA PREPARACION DEL MEDIO CONDICIONADO DE BAZO. -----	69
3.7.0	ADICION DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE INSULINA EN LA PREPARACION DE MEDIO CONDICIONADO LIBRE DE ALBUMINA SERICA Y EN PRESENCIA O AUSENCIA DE TRANSFERRINA HUMANA.	
3.7.1	SIN ALBUMINA Y CON TRANSFERRINA HUMANA 300 ug/ml.	
3.7.2	SIN ALBUMINA Y CON TRANSFERRINA HUMANA 30 ug/ml.	
3.7.3	SIN ALBUMINA, CON TRANSFERRINA HUMANA 300 ug/ml. COMPLEMENTADO CON INSULINA DE BOVINO 5 ug/ml.	
3.7.4	SIN ALBUMINA, CON TRANSFERRINA HUMANA 30 ug/ml. COMPLEMENTADO CON INSULINA DE BOVINO 5 ug/ml.	
3.7.5	LIBRE DE ALBUMINA Y DE TRANSFERRINA HUMANA COMPLEMENTADO CON 50 ug/ml. DE INSULINA DE BOVINO	
3.7.6	LIBRE DE ALBUMINA SERICA , DE TRANSFERRINA HUMANA Y COMPLEMENTADO CON 100 ug/ml, DE INSULINA DE BOVINO -----	76
3.8.0	DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE INSULINA EN LA PREPARACION DEL MEDIO CONDICIONADO LIBRE DE ALBUMINA DE BOVINO Y DE TRANSFERRINA HUMANA. -----	81

3.9.0	ACTIVIDAD ESTIMULANTE DEL MEDIO CONDICIONADO PREPARADO CON INSULINA DE DOS DIFERENTES MARCAS Y CONCENTRADO POR ULTRAFILTRACION. -----	88
3.10.0	SEPARACION CON HPLC DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS PREPARADOS CON INSULINA DE DOS DIFERENTES MARCAS.---	94
3.11.0	DETERMINACION DEL TIEMPO OPTIMO DE COSECHA DEL MEDIO CONDICIONADO Y DE LA CONCENTRACION DEL AMORTIGUADOR DE CORRIMIENTO EN RELACION CON SU CAPACIDAD DE ESTIMULACION.-----	104
3.12.0	PRODUCCION DEL ESTIMULANTE DE COLONIAS DE MEGACARIO- CITOS EN EL MEDIO CONDICIONADO DE DIFERENTES ORGANOS DE RATON EN UN SISTEMA LIBRE DE SUERO. -----	109
3.13.0	DETERMINACION DE LA MASA MOLECULAR DEL FACTOR ESTIMULANTE DE MEGACARIOCITOS . -----	115

CAPITULO IV

CONCLUSIONES	-----	117
--------------	-------	-----

CAPITULO V

BIBLIOGRAFIA	-----	120
--------------	-------	-----

INTRODUCCION

HISTORIA DEL ESTUDIO DE LOS MEGACARIOCITOS Y DE SUS CELULAS PRECURSORAS

Desde los estudios de Bizzozero en 1882 , se conocía que las plaquetas jugaban un papel esencial en la hemostasis, que tenían una capacidad particular para adherirse al endotelio dañado o a superficies extrañas y que tales condiciones podían ocasionar en ellas cambios morfológicos. A pesar de que los megacariocitos fueron también identificados por este autor, no fueron reconocidos como las células precursoras de las plaquetas sino hasta 1906 en los estudios realizados por Wright (1).

Las propiedades de las plaquetas sanguíneas tienen su origen en los megacariocitos, células que presentan un patrón único en la biología de mamíferos, teniendo diferentes niveles de ploidía. Al madurar su citoplasma se segmenta dando origen a pequeñas células anucleadas, las plaquetas.

A pesar de haberse realizado diversos estudios, no se conoce con precisión el nivel de diferenciación de la célula stem pluripotencial de la médula ósea, en el que se originan los precursores megacariocíticos, ya que el mecanismo de control para la proliferación de las células precursoras de esta línea es menos conocido que aquellos que regulan las series eritroide o linfoide (2, 3).

En los animales, las células tallo han sido descritas como células con apariencia linfoide y no parecen participar en el reemplazamiento diario de las células que maduran para formar plaquetas. Esto ha sido observado en condiciones experimentales en las cuales se puede inducir la formación de plaquetas.

Aunque las células tallo pluripotenciales parecen ser células durmientes con respecto al ciclo celular, recientemente se ha reportado que sí proliferan en diversos sistemas de cultivo.

Estudios anteriores han enfatizado que las células tallo o troncales pueden ser clasificadas en pluripotenciales, bipotenciales o unipotenciales, dirigidas hacia las distintas líneas celulares.

Actualmente existen evidencias crecientes de una variedad de células tallo con diferentes grados de diferenciación y de capacidad para repoblar a la médula ósea (4).

De acuerdo con algunos autores, en la médula ósea parece existir un compartimiento heterogéneo, que contiene células que van desde las más primitivas hasta las que se encuentran en fases de diferenciación terminal unipotencial; entre ellas, las precursoras inmediatas de los megacariocitos, las cuales han sido cultivadas exitosamente en medios semisólidos por Metcalf en 1975 (5), Nakeff 1979 (6), Williams 1978 (7), Burstein 1979 (8) y McLeod (9), quienes han demostrado el desarrollo de megacariocitos en agar blando.

Por su parte Mizoguchi (10) ha utilizado geles plasmáticos y Vaincherker, (11) ha utilizado un sistema de cultivo líquido para megacariocitos humanos derivados del cordón umbilical y de la sangre periférica.

Para estimular el desarrollo de colonias de megacariocitos Metcalf (5) utilizó un medio condicionado de linfocitos esplénicos estimulados con un mitógeno del tipo de *Phytolacca*, en tanto que McLeod (9) utilizó una preparación de eritropoyetina parcialmente purificada a partir de la orina de carnero.

Williams (7) utilizó un factor derivado de línea celular mielomonocítica de ratón WEHI-3. Este autor demostró también que un factor producido en cultivo líquido de una suspensión de médula ósea, conteniendo células adherentes es capaz de estimular la formación de colonias de megacariocitos *in vitro*.

Estudios realizados por Fiendenegen en 1962 (12), demostraron que megacariocitos plenamente reconocidos o megacariocitos poliploides no sufren división celular sino que efectúan el proceso de endomitosis . Al ser marcados con timidina tritiada se observa que maduran sin presentar división celular.

Jackson demostró en 1973 (13), que cuando la estimulación para la producción de plaquetas es precedida por trombocitopenia, las primeras células pertenecientes a la serie megacario-

cítica que aumentan su número son células pequeñas de tamaño, comparable a los linfocitos presumiblemente diploides, mientras que la concentración de los megacariocitos poliploides fácilmente reconocibles al microscopio de luz no se modifica.

En roedores estas células pequeñas son identificadas por la presencia de la enzima tiocolinesterasa, las de humanos son reconocidas mediante anticuerpos fluorescentes dirigidos contra las glucoproteínas de plaquetas, ya que estos precursores portan el mismo tipo de antígenos en su membrana.

El análisis del número de células contenidas en una colonia de megacariocitos, conduce a la conclusión de que la progenie diploide sufre una serie de divisiones celulares, antes de madurar su citoplasma y llegar a un punto irreversible en el cual ya no sigue la telofase para la separación de dos células hijas (14).

Poco se conoce respecto al mecanismo de inhibición de la división celular, que permite que la duplicación del DNA continúe. En virtud de que los primeros megacarioblastos reconocibles contienen antígenos y organelos presentes en plaquetas circulantes, parecería que algún fenómeno de diferenciación es responsable al desviar a las células en mitosis hacia la endomitosis.

Un elemento crítico en la diferenciación de estas células, parece ser la internalización y proliferación de la membrana

plasmática hacia el citoplasma de la célula, formando el sistema de demarcación membranal (15).

Las etapas de diferenciación identificadas plenamente en la línea megacariocítica son tres : megacarioblasto, megacariocito basófilo o pro-megacariocito y megacariocito granular o maduro.

ESTRUCTURA MORFOLOGICA DE LOS MEGACARIOCITOS

MEGACARIOBLASTO

Son las primeras células identificables por microscopia de luz. En estas células es común la endomitosis, presentan síntesis activa de proteínas y de gránulos densos. Al microscopio electrónico puede observarse el desarrollo del sistema de demarcación membranal, el cual es característico de la serie megacariocítica (16,17).

El lumen de este sistema de membrana ha mostrado estar en continuidad con el ambiente externo de la célula, lo cual se ha puesto de manifiesto utilizando colorantes como el Nitrato de Lantano y Rojo de Rutenio, los cuales no penetran la membrana megacariocítica (18, 19).

Tavassoli (20) ha sugerido que este proceso de formación de membrana puede involucrar la fusión y fisión de invaginaciones tubulares adyacentes, dando origen a estructuras membranales aplanadas que se observan comúnmente.

También se ha descrito que los megacarioblastos presentan nucleólos prominentes, la cromatina del núcleo tiene un patrón difuso, los polirribosomas se encuentran en número moderado, las mitocondrias son largas y en cantidad abundante.

MEGACARIOBLASTO BASOFILO O PRO-MEGACARIOCITO

Conforme el megacarioblasto madura, la síntesis de RNA llega a ser más intensa y los polirribosomas se esparcen en el citoplasma dando lugar a basofilia con los colorantes de Romanowsky. Estas células son más grandes que las correspondientes a las series eritroide o mieloide. Al microscopio electrónico muestran los mismos gránulos que los megacarioblastos pero en mayor número.

En esta etapa de maduración se sintetizan el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) y otras glicoproteínas y se encuentran también los receptores de superficie incluyendo el de Fc y los antígenos Ia. Al final de esta etapa cesa la endomitosis.

Parecería que la maduración citoplásmica por sí sola es un inhibidor potente de la síntesis de DNA, aunque la naturaleza química del inhibidor específico se desconoce (20).

MEGACARIOCITO GRANULAR O MADURO

La célula continúa creciendo, los polirribosomas disminuyen en número, el sistema de demarcación membranal se abre y se comunica con el exterior libremente. La endomitosis ha cesado, los centriolos persisten en la vecindad del núcleo, la célula adquiere forma ameboide, se observan escasas mitocondrias pequeñas, la zona periférica del citoplasma se encuentra llena de organelos, las células forman pseudópodos que alcanzan las sinusoides de la médula ósea y penetran a través de la pared consistente de dos capas de células adventicias y endoteliales, para llegar al lumen (21,22).

La regulación de este proceso es pobremente entendida , el hecho de que las barras o núcleos desnudos sean vistos comúnmente en la médula ósea, indica que muchas de estas células pierden su citoplasma dentro de las sinusoides, debido a la segmentación de los pseudópodos en el flujo sanguíneo, mientras que el núcleo permanece en la médula ósea. Algunas otras células megacariocíticas pasan completas a la microcirculación de los pulmones y liberan allí su citoplasma (23).

Debe enfatizarse que la célula liberada en el momento de ocurrir la segmentación del citoplasma, no es la plaqueta terminal. Se desconoce el sitio donde ocurre la transformación de este segmento en plaqueta madura, pero se piensa que al ser atrapado el segmento citoplasmático en la microcirculación

pulmonar, un "masaje" regular de la microcirculación provee el elemento mecánico necesario para una segmentación mayor y transformación de los precursores en las formas discoidales que se encuentran en la circulación (24) .

REGULACION HUMORAL DE LA MEGACARIOPOYESIS Y DE LA TROMBOPOYESIS

En condiciones de Estado Estable "Steady State" en el hombre y en algunas especies animales, la concentración de plaquetas en la sangre periférica se mantiene en un nivel constante característico de cada especie.

El recambio de plaquetas es regulado para mantener constante su nivel en la sangre circulante. Puede decirse que la producción de megacariocitos y de plaquetas es dependiente de un proceso regulatorio, el cual se manifiesta claramente cuando ocurren cambios en la concentración de plaquetas circulantes (25, 26) .

Así, cuando la concentración de plaquetas es incrementada o disminuida temporalmente en presencia de una médula ósea normal, existe un reajuste a una concentración normal asociado a un período de compensación; esto indica que el exceso o la deficiencia es causado por una estimulación o supresión transitoria (27, 28) .

Estudios de marcaje con radioisótopos bajo estas condiciones, indican que hay ajustes en la masa total de plaquetas y no sólo en su número (29,30). Las plaquetas que son producidas en respuesta a la estimulación trombopoyética son más grandes que las normales (31,32), aunque las razones de ésto no son totalmente claras.

La población normal de plaquetas no es homogénea con respecto al tamaño, densidad, actividad metabólica o respuesta a los agentes agregantes *in vitro*; la heterogeneidad puede ser debida a la presencia de plaquetas de diferentes edades, siendo las más jóvenes más densas, grandes y activas fisiológicamente para apoyar la coagulación sanguínea. La evidencia sugiere que al envejecer las plaquetas en la circulación, pierden volumen, actividad metabólica y efectividad hemostática *in vivo* (33-36).

TROMBOPOYETINA

En el inicio de los años 60 se informó sobre experimentos en los cuales la transferencia de plasma o suero de animales trombocitopénicos a animales normales producía un incremento en el número de plaquetas en los animales receptores(37,38,39). Sin embargo, este tipo de demostraciones nunca fueron lo suficientemente claras para establecer la presencia en el suero, de una actividad estimulante de la trombopoyesis llamada más tarde trombopoyetina o Factor Estimulante de la Trombopoyesis (TSF).

Reportes subsecuentes demostraron que el efecto estimulatorio del plasma de individuos trombocitopénicos podía ser demostrado mas claramente con la incorporación de material radiactivo del tipo de 75-Seleniometionina o 35-S Sulfato de sodio, en las plaquetas del receptor, aunque la cuenta de plaquetas no se incrementara (40,41). Así el efecto estimulatorio parece producir incremento en el tamaño de plaquetas, debido a la síntesis de proteínas o glucosaminoglucanos, lo cual también produce un incremento en la incorporación de material radiactivo en las plaquetas formadas anteriormente y más acentuadamente en las de reciente formación (42).

Mediante esta técnica Winer (43), reportó actividad trombopoyética leve en el plasma de donadores normales. Sin embargo, no observó actividad estimulante al inocular plasma de animales a los que se les había inducido trombocitosis por transfusión.

Por otra parte , McDonald (44) ha producido un anticuerpo de conejo contra plaquetas de carnero y lo ha utilizado para realizar pruebas de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación. La inyección de este anticuerpo en ratones redujo la concentración de plaquetas, sugiriendo así, que la trombopoyetina es importante para la producción normal de plaquetas en las distintas especies animales y que existe en algún grado especificidad de especie, por el hecho de que los conejos forman anticuerpos contra la trombopoyetina de carnero.

Sin embargo, dichos anticuerpos no logran disminuir drásticamente la concentración de plaquetas en los animales receptores.

El aislamiento de este factor humoral ha sido lento, se ha obtenido y concentrado a partir del plasma de algunas especies animales mediante precipitación fraccionada con sulfato de amonio. También se ha intentado su caracterización mediante cromatografía con resinas de intercambio iónico, filtración molecular en gel y mediante técnicas inmunológicas (45).

Actualmente no está claro si se trata de un solo factor o de factores múltiples involucrados en la producción de plaquetas.

La naturaleza química precisa y los mecanismos de acción permanecen desconocidos. Por otra parte, se ha encontrado que la producción de plaquetas puede persistir a una velocidad reducida en animales a los que se les induce trombocitosis por transfusión sin que se detecte trombopoyetina en el plasma de ellos (46), lo cual hace pensar que la producción de plaquetas no es totalmente dependiente de la trombopoyetina, o bien que la sensibilidad del experimento no permitió medir cantidades pequeñas de la hormona.

ESTUDIOS *in vivo* E *in vitro* DE LOS FACTORES

O ACTIVIDADES ESTIMULANTES DE LA MEGACARIOPOYESIS

La actividad biológica de la trombopoyetina o de factores análogos, se puede estudiar en sistemas *in vivo* e *in vitro*.

Como un acercamiento para la caracterización de las actividades reguladoras y para estudiar el papel de estas moléculas en la proliferación y diferenciación celular se ha empleado como método experimental el cultivo de tejidos.

Se han desarrollado sistemas de cultivo de término largo - tres semanas - que permiten el reclutamiento de las células tallo pluripotenciales hacia un tipo de células reconocidas como precursoras de megacariocitos (47,48,49). La capacidad estimulante de la trombopoyetina o de factores de actividad biológica análoga es medida por el número de plaquetas circulantes; a su vez la de los factores estimulantes de colonias por el número de UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE MEGACARIOCITOS (UFC-Meg), desarrolladas en respuesta a este factor (50, 51, 52).

La UFC-Meg es la primera célula progenitora detectable dirigida hacia el desarrollo de megacariocitos, ya que la célula tallo pluripotencial mieloide, no es reconocible ni citoquímica ni morfológicamente. Sin embargo, puede utilizarse para diversos estudios de clonación por su capacidad para formar colonias de megacariocitos en una gran variedad de sistemas de cultivo.

Las técnicas para la clonación de UFC-Meg fueron establecidas inicialmente para el cultivo de médula ósea de roedores (53), en tanto que la técnica de clonación de UFC-Meg de humanos en geles plasmáticos, fue descrita posteriormente por Vaincherker en 1979 (54).

La identificación inicial de estos elementos fue morfológica. Sin embargo, Rabellino (55, 56) y Mazur (57) desarrollaron por separado, un método inmuno-citoquímico para la identificación de megacariocitos humanos y de sus precursores utilizando un antisuero de conejo contra las glicoproteínas de plaquetas humanas y lo conjugaron con un anticuerpo de raton marcado con fluoresceína dirigido contra gamma globulina de conejo (inmuno-fluorescencia indirecta).

La combinación de ambas técnicas permitió hacer un estudio amplio de los precursores megacariocíticos del hombre, observando la existencia de tres tipos diferentes de colonias. Un primer tipo compuesto exclusivamente de células pequeñas de tamaño semejante al de los polimorfonucleares, identificadas por la presencia de antígenos (glicoproteínas) de plaquetas. Un segundo tipo constituido por megacariocitos de diversos tamaños y un tercer tipo formado por elementos celulares mezclados bien sea eritrocitos/megacariocitos o granulocitos/ megacariocitos.

FUENTES DE PRODUCCION IN VITRO DE FACTORES O ACTIVIDADES ESTIMULANTES DE LA MEGACARIOPOYESIS

A partir del sobrenadante de diversos tipos celulares cultivados en presencia de suero o plasma sanguíneo de diferentes especies animales, ha sido posible obtener un factor o actividad estimulante de la trombopoyesis *in vivo* e *In vitro* (58,59,60),

designado con el nombre de Factor Estimulante de la Trombopoyesis -TSF-. También se ha encontrado en dicho sobrenadante, un Factor Estimulante de Colonias de Megacariocitos, el cual ha sido aislado por McDonald a partir del suero de pacientes con púrpura trombocitopénica (60). Al parecer ambas moléculas son algunos de los factores que podrían regular la megacariopoyesis y la trombopoyesis *in vivo* actuando a diferentes niveles dentro de esta línea celular.

INCORPORACION DEL SUERO O PLASMA SANGUINEO COMO COMPONENTE DEL SISTEMA DE CULTIVO DE TEJIDOS

A través de diversos trabajos (61,62), se ha podido conocer que el suero o plasma sanguíneo son requeridos como complemento para el mantenimiento de las células en cultivo. La importancia del suero radica en su capacidad para proveer hormonas, proteínas enlazantes y no enlazantes, siendo las últimas de gran importancia para reconocer y enlazar vitaminas, iones, así como también agentes tóxicos y pirógenos. Posee además fibronectina, proteína que permite a las células adherirse a la superficie del recipiente y formar matrices celulares específicas, de gran importancia para el estudio *In vitro* de la generación de tejidos (63).

El suero proporciona también factores inhibidores de proteasas (64), permitiendo así proteger la integridad celular, ayuda también a mantener el pH y la tonicidad del medio de cultivo. Sin

embargo, presenta la gran desventaja de que se desconocen los elementos que lo componen, así como la concentración en la cual se encuentran, misma que varía drásticamente de un lote de suero a otro, lo que trae como consecuencia, variaciones en los resultados.

Con el propósito de eliminar o disminuir esta fuente de variación, se están estableciendo con éxito sistemas de cultivo en medios libres de suero (65,66). El trabajar con estos medios químicamente definidos ha permitido conocer la importancia de algunos factores séricos, así como las necesidades nutricionales específicas de los distintos tipos celulares (67).

Uno de los trabajos más importantes para el cultivo de células hematopoyéticas en medios libres de suero, es el realizado por Guilbert e Iscove (68), quienes diseñaron un medio de cultivo libre de suero, que permitía la producción de un factor estimulante del desarrollo de colonias eritroides en cultivos de médula ósea (68). Estos autores establecieron que dicho medio de cultivo debe contener como componentes esenciales, albúmina sérica de bovino, transferrina humana, selenito de sodio y una emulsión de lecitina-colesterol, los cuales deben estar combinados, ya que cada uno de ellos por separado, parece no tener influencia sobre la capacidad estimulante del factor estudiado.

Burstein, (8) utilizando la formulación dada por Guilbert e Iscove (68), encontró que los cultivos de bazo de ratón estimulados con fitohemaglutinina producían un factor o actividad estimulante de la megacariopoyesis.

Metcalf y Nakeff han establecido previamente las condiciones de cultivo para obtener los factores o actividades estimulantes de colonias de megacariocitos, a partir del medio de bazo de ratón, preparado con suero fetal de ternera al 20% o suero de caballo al 10% respectivamente. Nakeff además ha intentado aislar y caracterizar la substancia responsable de la actividad megacariopoyetica a partir de dicho medio de cultivo.

Tomando como referencia los trabajos realizados por Metcalf (5), Nakeff (6) , Wilbert e Iscove (68), se desarrolló el presente trabajo para la obtención de un factor estimulante de colonias de megacariocitos, a partir del medio condicionado de bazo de ratón en un sistema libre de suero.

JUSTIFICACION DEL TRABAJO

Han sido varios los autores (69 - 73) que han demostrado la presencia de un factor o actividad estimulante de la megacariopoyesis *In vitro* en medio condicionado de diversos órganos preparado con suero sanguíneo.

Dicha actividad estimulante parece ser debida a una molécula de naturaleza proteica, producida en cantidades pequeñas y liberada al medio de cultivo, pero resulta difícil su aislamiento y caracterización a partir de la mezcla compleja, de medio condicionado preparado con suero o plasma sanguíneo; frecuentemente, debido a la gran variedad de proteínas presentes en el medio, se requiere emplear métodos de purificación altamente específicos, generalmente drásticos, que pueden originar la pérdida de actividad estimulante del factor purificado.

En el presente trabajo se pretende diseñar un sistema de cultivo libre de suero, que permita la producción, aislamiento y de ser posible , la caracterización del factor estimulante de la megacariopoyesis *in vitro* , que en el futuro sea utilizada como una fuente segura y abundante del factor estimulante , con el propósito de determinar posteriormente su papel en la regulación de esta línea celular.

Debido a la baja concentración en la que puede presentarse el factor estimulante en el medio de cultivo, el método

seleccionado para su detección es la cromatografía de líquidos de alta resolución. En la literatura (74), se reporta que este sistema es capaz de preservar la capacidad estimulante *In vitro* de proteínas con actividad biológica análoga a la del factor objeto de estudio en el presente trabajo.

OBJETIVOS

Establecer las condiciones óptimas de cultivo requeridas por células de bazo de ratón mantenidas en un medio libre de suero, para la producción de un factor o actividad estimulante de la megacariopoyesis **In vitro** .

Detección del factor megacariopoyético mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.

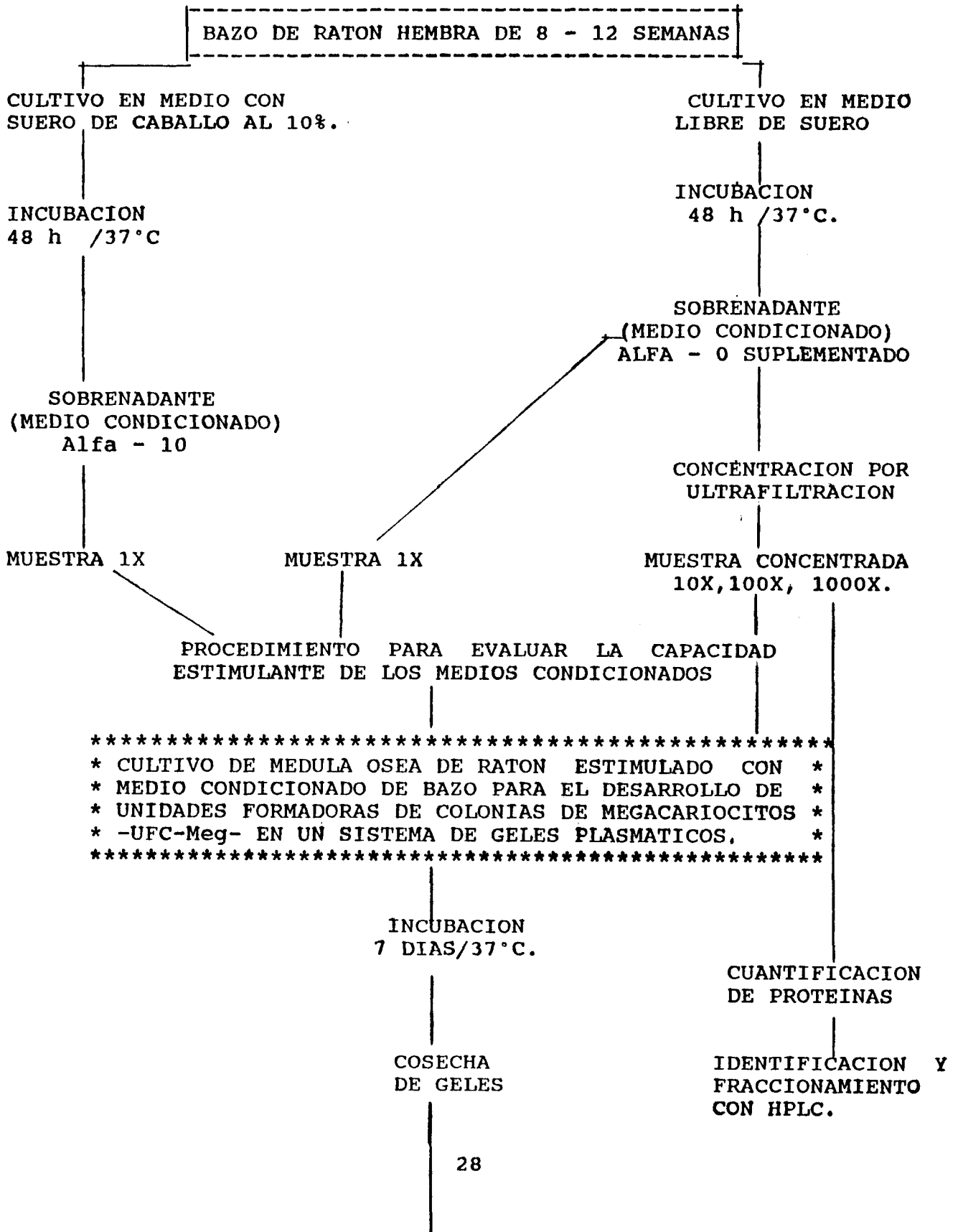
DISEÑO EXPERIMENTAL

La secuencia en la cual se desarrollaron las técnicas utilizadas se encuentra dada por su colocación en las páginas siguientes:

- A).- Se preparó medio condicionado de bazo de ratón de acuerdo con el protocolo incluido en las páginas 32 a 35. En todos los experimentos se preparó medio condicionado de bazo suplementado con suero de caballo al 10%. Este medio se consideró como control y su actividad estimulante, como el 100 % para la comparación de la actividad presentada por los diversos medios de cultivo libres de suero.
- B).- La capacidad estimulante *In vitro* de los medios condicionados fue probada mediante cultivos de médula ósea de ratón, cuantificando el número de unidades formadoras de colonias de megacariocitos - UFC-Meg - desarrolladas en respuesta a la estimulación del medio. El protocolo correspondiente se encuentra dado en las páginas 41 y 42.
- C).- Las colonias desarrolladas en el cultivo se identificaron con la tinción de tiocolinesterasa-hematoxilina, páginas 43 y 44.

- D).- Se cuantificaron las proteínas totales de los medios de cultivo sin suero, mediante el método de Lowry (75,76), páginas 45 y 46
- E).- El medio condicionado, preparado con suero de caballo al 10% (Alfa - 10) se fraccionó por precipitación con solución saturada de sulfato de amonio páginas 47 y 48.
- F).- El fraccionamiento de los medios de cultivo libres de suero, se llevó a cabo por Cromatografía de líquidos de alta resolución -HPLC- de acuerdo con el protocolo dado en la página 49.

DIAGRAMA DE FLUJO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL



 * TINCION DE TIocolINESTERASA-HEMATOXILINA *

OBSERVACION AL MICROSCOPIO OPTICO A 10X Y 25X

IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE
 UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE MEGACARIOCITOS
 - UFC-Meg -

FORMULACION DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS

MEDIO ALFA - 10

Solución de mitógeno de <i>Phytolacca americana</i>	
diluido 1:15 en agua bidestilada	0.15 ml
Suero de caballo	5.00 ml
Medio Alfa-MEM pH 7.2 con 290 mOsm.	44.85 ml

	50.00 ml

MEDIO ALFA - 0 SUPLEMENTADO UTILIZADO COMO BASE
 PARA LA PREPARACION DE OTROS MEDIOS LIBRES DE SUERO

Medio Alfa-MEM pH 7.2 y 290 mOsm.	15.00 ml
Solución de mitógeno de <i>Phytolacca americana</i>	
diluido 1:15 en agua bidestilada	2.50 ml
Albúmina sérica bovina al 10%	5.00 ml
Selenito de sodio (Na SeO ₃) 10 umol/L	0.50 ml
Cloruro férrico (FeCl ₃) 100 umol/L	0.80 ml
Transferrina humana 10 mg/ ml	1.50 ml
Emulsión de Lecitina-colesterol	1.50 ml
Penicilina 10 U/ml-estreptomycin 10 ug/ml	0.50 ml
Medio Alfa - MEM pH 7.2 y 290 mOsm. c.b.p.	50.00 ml

A CONTINUACION SE MUESTRAN LAS ETAPAS DE TRABAJO CON LOS DIFERENTES MEDIOS LIBRES DE SUERO PREPARADOS.

SELECCION DE LA CEPA DE RATON
CON MAYOR CAPACIDAD PARA LA PRODUCCION
DEL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS
DE MEGACARIOCITOS EN MEDIO Alfa- 10

REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS
CON EL MEDIO LIBRE DE SUERO.

MEDIO CONDICIONADO
Alfa - 10 1X.

MEDIO CONDICIONADO
Alfa- 0 SUPLEMENTADO 1X

CONCENTRACION 10X
POR ULTRAFILTRACION

FRACCIONAMIENTO CON
SULFATO DE AMONIO

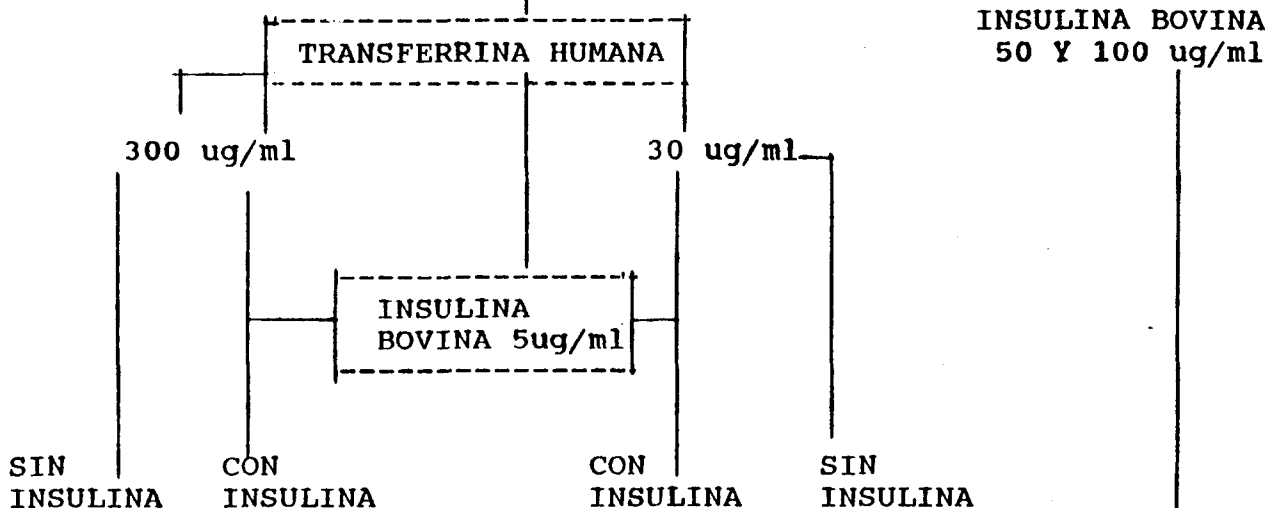
PRUEBA DE ACTIVIDAD ESTIMULANTE
CON LAS FRACCIONES OBTENIDAS

* CULTIVO DE MEDULA OSEA DE RATON PARA EL DESARROLLO *
* DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE MEGACARIOCITOS *
* (UFC-Meg). *

126954

PREPARACION DE MEDIO CONDICIONADO
Alfa - O SUPLEMENTADO LIBRE DE
ALBUMINA SERICA

MEDIO CONDICIONADO Alfa - O SUPLEMENTADO
LIBRE DE ALBUMINA SERICA Y COMPLEMENTADO CON



* MEDIO CONDICIONADO PREPARADO CON CONCENTRACIONES *
* DE 5 - 200 ug/ ml DE INSULINA BOVINA LIBRE DE *
* ALBUMINA SERICA Y DE TRANSFERRINA HUMANA *

CONCENTRACION POR ULTRAFILTRACION CON CARTUCHOS
DE EXCLUSION MOLECULAR PARA 10,000 daltones.

DETERMINACION DEL TIEMPO OPTIMO DE COSECHA
PARA EL MEDIO CONDICIONADO DE BAZO DE RATON
PREPARADO CON 100 ug/ml DE INSULINA .

PREPARACION DE MEDIO CONDICIONADO CON INSULINA
DE DOS DIFERENTES MARCAS.

SOLUCION INYECTABLE
DE INSULINA
(LABORATORIOS Lilly)

INSULINA LIOFILIZADA
(Sigma Chemical Co.)

CONCENTRACION POR ULTRAFILTRACION CON CARTUCHOS
DE EXCLUSION MOLECULAR PARA 30,000 daltones.

FRACCIONAMIENTO DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS
MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA
RESOLUCION.

SEPARACION DEL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS
MEGACARIOCITOS CON HPLC.

PREPARACION DE MEDIO CONDICIONADO DE BAZO
CON INSULINA SIGMA 100 ug/ml. Y CONCENTRACION
A 10X, 100X Y 1000X. POR ULTRAFILTRACION.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DEL
AMORTIGUADOR DE CORRIMIENTO PARA LA PRESERVACION
DEL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS SEPARADO
POR HPLC.

FRACCIONAMIENTO DEL MEDIO CONDICIONADO Alfa - 0
SUPLEMENTADO PREPARADO CON INSULINA Sigma
100 ug/ml. UTILIZANDO AMORTIGUADOR DE FOSFATOS
0.02 mol/L

PRODUCCION DEL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS
DE MEGACARIOCITOS A PARTIR DEL CULTIVO DE BAZO,
MEDULA OSEA, RINON Y PULMON DE RATON EN MEDIO
Alfa - 0 SUPLEMENTADO CON 100 ug/ml DE INSULINA
DE Sigma Chemical Co.

DETERMINACION DE LA MASA MOLECULAR DEL FACTOR
ESTIMULANTE DE COLONIAS PRODUCIDO EN EL MEDIO
CONDICIONADO DE BAZO DE RATON.

MATERIAL

SOLUCIONES, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO.

Medio alfa MEM con glutamina.	(KC Biological Inc.)
Lecitina.	(ICN Pharmaceuticals Inc.)
Colesterol.	(ICN Pharmaceuticals Inc.)
Albúmina sérica bovina	(Sigma Chemical Co.)
Transferrina humana	(Sigma Chemical Co.)
Cloruro férrico	(J.T.Baker)
Fosfato monobásico de sodio	(J.T.Baker)
Fosfato dibásico de potasio	(J.T.Baker)
Selenito de sodio	(Sigma Chemical Co.)
Mitógeno de <i>Phytolacca americana</i> "Pokeweed mitogen"[Grand Island Biological Company (GIBCO)]	
Solución de antibióticos	(GIBCO)
Ac.[3-(N -morfolin)propanosulfónico] (MOPS)	(GIBCO)
Medio de Leibovitz (L-15)	(GIBCO)
Suero de caballo	(GIBCO)
Extracto de embrión de bovino	(GIBCO)
Plasma citratado de bovino	(GIBCO)
Azul tripan al 0.4% en amortiguador de fosfatos con pH 7.4	(GIBCO)
Solución inyectable de insulina de bovino	(Lilly Co.)
Insulina bovina en polvo	(Sigma Chemical Co.)
Yoduro de acetiltiocolina	(Sigma Chemical Co.)

MATERIAL

Material desechable de uso frecuente en un laboratorio de cultivo de tejidos.

EQUIPO

Incubadora Forma Scientific entrada para CO₂ Modelo Int.X27.

Campana de flujo laminar horizontal Labco. Co.

Potenciómetro Beckman IL

Osmómetro Wescor 5100

Osciloscopio B Particle Data

Centrífuga para microhematocrito International MB

Centrífuga International Clinical CL y PR 6

Centrífuga programable Dupont SNC

Equipo de ultrafiltración molecular Amicon con cámaras 60,210 y 5000 ml con membranas de exclusión tipo PM10, YM10, PM30 y YM30.

Dializador Multiplex B

Cromatógrafo de líquidos de alta presión - HPLC- Varian 5020

Detector de luz ultravioleta Syncro Pak AX-300

Columna Micro Pak tipo TSK 2000 S.W.

Espectrofotómetro visible/ultravioleta HEATH

PREPARACION DE MEDIO CONDICIONADO DE BAZO DE RATON

El método para la preparación de medio condicionado es una modificación de Nakeff al procedimiento señalado por Metcalf (5).

- 1.- Se sacrifica un ratón hembra por dislocación cervical, se aísla el bazo en condiciones de esterilidad y se deposita en medio de transporte.

Medio de Transporte

Suero de caballo	1.0 ml
Solución de antibióticos	0.5 ml
Medio alfa MEM pH 7.2	48.5 ml
	<hr/>
	50.0 ml

- 2.- El bazo se coloca sobre una rejilla metálica, se disgrega con pinzas y tijeras y se lava con un volumen final de 30 ml de medio Alfa -MOPS frío.

Medio alfa MOPS

Alfa - MEM	1.00 g
MOPS	0.40 g
NaOH 5N	0.27 ml
NaCl	0.04 g
Agua c.b.p.	100.00 ml

- 3.- La suspensión celular se centrifuga a 350 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante se elimina y el paquete celular se resuspende en 30 ml de medio Alfa-MOPS frío.
- 4.- La suspensión celular se homogeniza mediante pipeteo cuidadoso y se cuenta el número de células nucleadas, utilizando un contador de células o cámara cuenta glóbulos.
- 5.- La concentración celular se ajusta a 2.0×10^7 células/ml, se toma un volumen de esta suspensión celular y se diluye con nueve volúmenes del medio de cultivo seleccionado para el cultivo. Como medio control del 100% de actividad estimulante, se prepara un medio condicionado con suero de caballo al 10%.
- 6.- Los cultivos son incubados en botellas Falcon de 75 cm² durante 48 h a 37°C. con humedad relativa de 90 - 100% y concentración de CO₂ del 6 al 10 % .
- 7.- El medio se cosecha por centrifugación a 1000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante se filtra a través de membranas Millipore tipo GS de 0.22 um.

Se toman alícuotas para comprobar la esterilidad del medio y se determina su actividad biológica en cultivos de médula ósea de ratón.

8.- A los medios libres de suero se les cuantifican las proteínas por el método de Lowry (75, 76).

MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

MEDIO ALFA -10

MEDIO CONDICIONADO DE BAZO DE RATON PREPARADO CON 10% DE SUERO DE CABALLO UTILIZADO COMO CONTROL DEL 100% DE ACTIVIDAD ESTIMULANTE Y REFERENCIA PARA LOS MEDIOS PREPARADOS EN AUSENCIA O EN PRESENCIA DE BAJAS CONCENTRACIONES DE SUERO.

Solución de mitógeno de <i>Phytolacca americana</i>	
diluida con agua bidestilada	0.15 ml
Suero de caballo	5.00 ml
Medio alfa MEM pH 7.2	44.85 ml

MEDIO ALFA -10	50.00 ml

MEDIO ALFA - 1

MEDIO PREPARADO CON SUERO DE CABALLO AL 1 %

Solución de mitógeno de <i>Phytolacca americana</i> diluida 1:15 con agua bidestilada	0.15 ml
Suero de caballo	0.50 ml
Medio Alfa - MEM pH 7.2	49.35 ml
	50.00 ml

MEDIO ALFA - O SUPLEMENTADO

MEDIO LIBRE DE SUERO COMPLEMENTADO CON COMPONENTES PRESENTES
EN EL SUERO SANGUINEO.

Medio alfa MEM pH 7.2	15.00 ml
Solución de <i>Phytolacca americana</i> diluida 1:15 con agua bidestilada	2.50 ml
Albúmina sérica de bovino al 10%	5.00 ml
Na ₂ SeO ₃ 10 umol/L	0.50 ml
FeCl ₃ . 6 H ₂ O 100 umol/L	0.80 ml
Transferrina humana 10 mg/ml	1.50 ml
Emulsión de Lecitina-colesterol 4:5	1.50 ml
Penicilina 10 U/ml - Estreptomina 10 ug/ml	0.50 ml
Medio Alfa-MEM pH 7.2 290 mOsm. c.b.p.	50.00 ml

**MEDIO ALFA - O SUPLEMENTADO CON INSULINA 100 ug/ml
LIBRE DE ALBUMINA SERICA Y DE TRANSFERRINA HUMANA**

MEDIO LIBRE DE SUERO PREPARADO A PARTIR DE LA FORMULACÓN DADA
POR BURSTEIN (8).

Medio alfa-MEM pH 7.2 290 mOsm	15.00 ml
Solución de mitógeno de <i>Phytolacca americana</i> diluida 1:15 con agua bidestilada	0.150 ml
Insulina bovina 1000 ug/ml	5.00 ml
Na ₂ SeO ₃ 10 umol/L	0.50 ml
FeCl ₃ · 6 H ₂ O 100 umol/L	0.80 ml
Emulsión de Lecitina-colesterol 4:5	1.50 ml
Penicilina ⁴ 10 U/ml-Estreptomicina ⁴ 10 ug/ml	0.50 ml
Medio alfa MEM pH 7.2 290 mOsm. c.b.p.	----- 50.00 ml

MEDIO ALFA O NO SUPLEMENTADO

MEDIO LIBRE DE SUERO Y SIN COMPLEMENTO DE COMPONENTES SERICOS

Solución de mitógeno de <i>Phytolacca americana</i> diluida 1:15 con agua bidestilada	0.15 ml
Medio alfa - MEM pH 7.2	49.85 ml
	----- 50.00 ml

126954

CULTIVO DE MEDULA OSEA DE RATON PARA EL DESARROLLO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE MEGACARIOCITOS.

- 1.- Se sacrifica a un ratón macho por dislocación cervical y se obtienen los fémures , en condiciones de esterilidad.
- 2.- Se elimina el músculo, se le hace pasar a través del canal medular una aguja del número 24", moviéndola hacia adelante y hacia atrás para facilitar el flujo de la solución de perfusión.
- 3.- Se inyecta 1 ml de Medio Alfa-MEM complementado con 2% de suero de caballo. La suspensión celular se recoge en un tubo de centrifuga, las células se dispersan mediante pipeteo lento.
- 4.- Se cuantifican la células y se les determina la viabilidad con solución de azul tripan al 0.4 %.
- 5.- Se ajusta la concentración celular a 2×10^6 células/ml con medio de Leibovitz pH 7.6 . Se toman 0.3 ml de la suspensión celular y se colocan en un tubo que contiene los siguientes componentes, mismos que deben ser adicionados en el orden indicado :

SISTEMA DE CULTIVO PARA EL DESARROLLO DE UFC-Meg

Medio de Leibovitz	1.2 ml
Suero de caballo	0.6 ml
Extracto de embrión de bovino (dil. 1: 4 en Leibovitz)	0.3 ml
Medio condicionado	0.3 ml
Suspensión celular 2×10^6 células/ml	0.3 ml
Plasma citratado de bovino (agente gelificante)	0.3 ml

	3.0 ml

- 6.- De la mezcla anterior se depositan alicuotas de 0.5 ml, por pozo, en placas de cultivo Linbro de 1.67 cm².

- 7.- Los cultivos se incuban durante siete días a 37 °C. con humedad relativa de 90 - 100 % y concentración de CO₂ de 4-10 %.

- 8.- Se cosechan los geles que contienen los cultivos celulares y se depositan en portaobjetos para su tinción con el método de tiocolinesterasa-hematoxilina.

TINCION DE TIOCOLINESTERASA PARA UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE MEGACARIOCITOS DESARROLLADAS EN CULTIVOS DE MEDULA OSEA DE RATON

- 1.- Los geles cosechados se depositan en portaobjetos y se fijan con solución de glutaraldehído al 3% en amortiguador de fosfatos 0.1 mol/L durante 10 minutos.

- 2.- Se enjuagan las laminillas con amortiguador de fosfatos 0.1 mol/L durante un minuto, se transfieren a la solución tintorial de tiocolin-esterasa donde se les deja una hora a 37°C.

SOLUCION TINTORIAL

Yoduro de acetiltiocolina	20 mg
Amortiguador de fosfatos 0.1mol/L pH 5.8 - 6.2	30 ml
Citrato de sodio 0.2 mol/L	2 ml
Sulfato de cobre pentahidratado 0.03 mol/L	4 ml
Ferricianuro de potasio 0.005 mol/L	4 ml

- 3.- Se enjuagan las laminillas con amortiguador de fosfatos 0.1 mol/L durante un minuto y se secan al aire.

- 4.- Las laminillas se introducen en metanol absoluto durante 10 minutos y posteriormente se pasan a solución de metanol al 50% durante 30 segundos.

5.- Se introducen los portaobjetos en hematoxilina de Erlich por 5 minutos y se lavan con la solución de citrato-fosfato durante un minuto .

SOLUCION AMORTIGUADORA DE CITRATO - FOSFATO

Citrato de sodio 1.0 mol/L 31.2 ml

Fosfato dibásico de sodio 0.5 mol/L 161.0 ml

Agua bidestilada suficiente para formar 3.5 L

6.- Se lavan las laminillas con agua corriente durante 2 minutos. Se secan al aire , se cubren con un cubreobjetos y se fijan los bordes del cubreobjetos con una solución selladora para su lectura al microscopio.

7.- Observación y cuantificación al microscopio de luz con objetivos de 10X ó 25X.

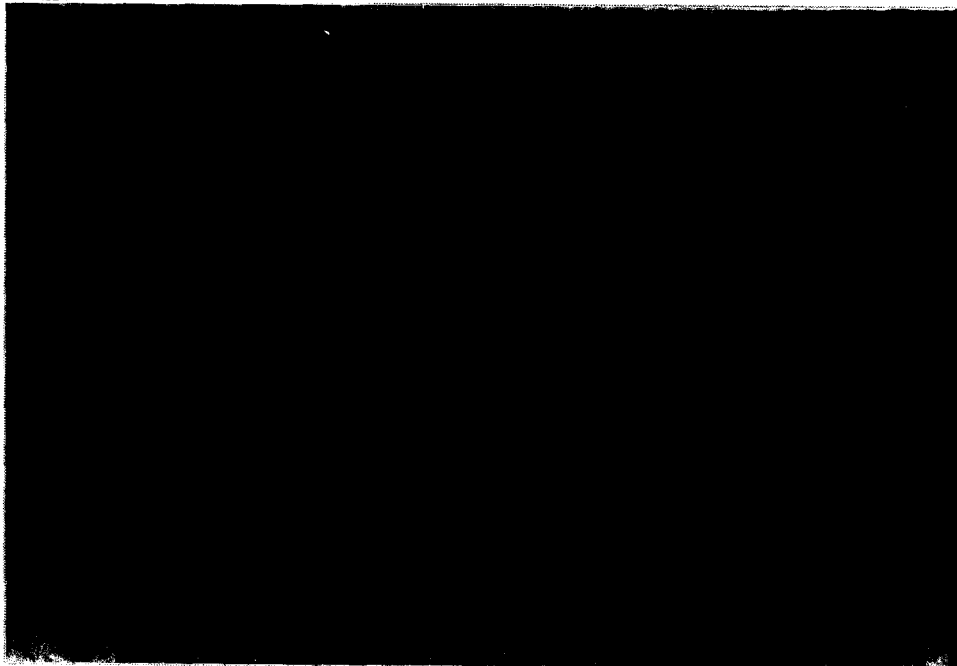


FIGURA 1. Células tiocolinesterasa positivas. Tinción Tiocolinesterasa-hematoxilina. Aumento 150X.

CUANTIFICACION DE PROTEINAS TOTALES POR EL METODO DE LOWRY

- 1.- Se preparan las siguientes soluciones y se adicionan en el orden indicado.

REACTIVO A

Tartrato de sodio dihidratado al 2%	0.50 ml
Sulfato de cobre pentahidratado al 1%	0.50 ml
Carbonato de sodio al 2% en NaOH 0.1N	50.00 ml

	51.00 ml

- 2.- Se agita el reactivo A durante unos minutos, cubriendo con papel aluminio el matraz que lo contiene, desde el momento de preparación hasta la utilización de la mezcla.
- 3.- A partir de una solución de albúmina sérica bovina conteniendo 0.5 mg/ml, se preparan por duplicado diluciones que contengan de 10 a 100 ug/ml de proteína.
- 4.- Se agregan 2 ml del reactivo A a cada tubo, se agitan en un vortex y se les deja en reposo durante 10 minutos.
- 5.- Se adicionan a cada tubo 0.2 ml del reactivo B (reactivo de Folin Ciocalteau diluido volumen a volumen con agua destilada).

6.- Se agitan los tubos y se dejan en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente para permitir el desarrollo del color.

7.- Las lecturas se realizan a 750 nm . (75, 76).

PRECIPITACION FRACCIONADA DE PROTEINAS CON SULFATO DE AMONIO

- 1.- Se prepara una solución saturada de sulfato de amonio a 50°C. , se deja en reposo durante toda la noche y se le ajusta el pH a 7.8 con NaOH 2 mol.
- 2.- La solución saturada se adiciona poco a poco , al material por fraccionar formando un gradiente , hasta obtener la concentración deseada, manteniendo la mezcla en agitación constante durante 2 h a temperatura ambiente.
- 3.- El material precipitado se centrifuga a 2000 g durante 30 minutos a 4°C. y se guarda el sobrenadante para trabajar posteriormente con él.
- 4.- Se disuelve el precipitado con solución amortiguadora de salina- fosfatos 0.01 mol/L de pH 7.2. y se dializa contra esta solución durante 24 horas a 4°C con cambios de solución cada 8 h.
- 5.- El sobrenadante del paso 3 se dializa en las condiciones descritas anteriormente.
- 6.- Se concentran las soluciones por ultrafiltración. Se cuantifican las proteínas y se determina su actividad megacariopoyética en cultivos de médula ósea de ratón (77).

SOLUCION AMORTIGUADORA DE SALINA-FOSFATOS

SOLUCION A

$\text{NaH PO}_2 / \text{H}_2\text{O}$	1.38 g
2 4 2	
NaCl	8.50 g
Agua destilada para	1.0 L

SOLUCION B

Na HPO	1.42 g
2 4	
NaCl	8.50 g
Agua destilada para	1.0 L

Se mezclan 280 ml de A + 720 ml de B.

FRACCIONAMIENTO DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS POR CROMATO- GRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

En todos los experimentos se utiliza una columna Varian Micropack TSK 200,SW. de 30 X 0.8 cm de exclusión molecular, que se mantiene húmeda con metanol al 40% (77).

- 1.- Se lava la columna con agua grado HPLC durante 40 minutos para eliminar los residuos de metanol al 40%.
- 2.- Posteriormente se lava y equilibra con amortiguador de fosfatos 0.2 mol/L ,verificando la limpieza de la misma con el registro a 280 nm .
- 3.- Se establecen las condiciones de temperatura, presión, velocidad de flujo y tiempo de elución del programa No. 9 utilizado en el laboratorio, cuyas condiciones son :

Sensibilidad	A.R = 0.1 (Rango de Absorbencia)
Presión	24 atmósferas
Temperatura	27 C.
disolventes	amortiguador de fosfatos 0.2 mol/L
tiempo de corrimiento	20 minutos
velocidad de flujo	1.0 ml/ min

Inicialmente se trabajó este programa con amortiguador de fosfatos 0.2 mol/L , variando posteriormente la concentración a 0.1 mol/L , 0.05 mol/L y 0.02 mol/L hasta encontrar la concentración del amortiguador que preservara la actividad biológica del factor megacariopoyético fraccionado.

ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados se expresan con la media aritmética de las Unidades Formadoras de Colonias de Megacariocitos (UFC- Meg) desarrolladas en los cultivos de médula ósea de ratón, además de la desviación estándar, error estándar y la prueba de T para pares de datos no agrupados.

$$\text{MEDIA ARITMETICA} \quad \bar{X} = \frac{\sum (X_i)}{n}$$

$$\text{DESVIACION ESTANDAR} \quad S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

$$\text{ERROR ESTANDAR} \quad S_m = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$$\text{PRUEBA DE } t \quad t = \frac{X_1 - X_2}{S / \sqrt{n-1}}$$

RESULTADO 3.1.0:SELECCION DE LA CEPA DE RATON CON MAYOR CAPACIDAD PARA LA PRODUCCION DEL FACTOR ESTIMULANTE DE MEGA CARIOCITOS PREPARADO CON MEDIO ALFA - 10.

La primera etapa del trabajo estuvo orientada a seleccionar la cepa de ratón que proporcionara el medio condicionado con mayor capacidad estimulante. Se prepararon lotes de 50 ml de medio condicionado de bazo en presencia de suero de caballo. Las cepas utilizadas fueron proporcionadas por el Instituto Mallinckrodt de la Universidad Washington de San Luis Missouri.

Los resultados de la actividad megacariopoyética de los medios condicionados se muestran en las tabla I. Se consideró como el 100 % de actividad estimulante a la cepa con mayor número de Unidades Formadoras de Colonias de Megacariocitos, las restantes se compararon contra ella.

TABLA I

CAPACIDAD ESTIMULANTE DEL MEDIO CONDICIONADO DE BAZO DE RATON EN MEDIO ALFA - 10 EN RELACION CON LA CEPA DE RATON UTILIZADA

CEPA	5 UFC-M/10 cels/ml		% DE ACTIVIDAD ESTIMULANTE
	MEDIA ±	E.E.	
B DF	5.8 ±	0.27	100 ± 13
2 1			
C BI/6	2.2 ±	0.22	38 ± 4
57			
DBA/2	3.1 ±	0.25	54 ± 5
AKR	4.1 ±	0.20	72 ± 4
C H/He	2.5 ±	0.20	45 ± 4
3			
C H/Anf	2.8 ±	0.27	48 ± 5
3			
BALB/c	2.5 ±	0.12	45 ± 2

P < 0.001 al comparar cepa BDF1 vs frente a las demás cepas.

No obstante que el objetivo del presente trabajo es la obtención de un medio condicionado libre de suero para la producción de un factor estimulante de colonias de megacariocitos, Nakeff ha encontrado que existen diferencias en la capacidad de estimulación del medio condicionado en donde se produce el factor o actividad estimulante. Tales diferencias son atribuidas entre otras causas a la cepa de ratón y al suero sanguíneo empleados en la preparación del medio condicionado de bazo (24).

Con base en estas experiencias se consideró conveniente realizar la primera serie de experimentos para seleccionar la cepa de trabajo, empleando suero de caballo al 10 % e incubación de 48 horas a 37° C, de acuerdo con lo establecido por Nakeff y su grupo; los mismos han indicado además, que la concentración del medio condicionado por ultrafiltración aumenta la capacidad estimulante del mismo y permite el desarrollo de colonias de megacariocitos con elementos en diferentes grados de maduración.

Por su parte, Metcalf ha encontrado que al concentrar por ultrafiltración el medio condicionado de bazo preparado con suero fetal de ternera, dicho medio estimula el desarrollo de los tres tipos de colonias de megacariocitos a los que se ha hecho referencia en la introducción.

Ambos autores establecen como una Unidad Formadora de Colonias de Megacariocitos (UFC-Meg) , a la agrupación de cuando menos cuatro megacariocitos plenamente reconocibles o tiocolin-

esterasa positivos . Este criterio difiere del de Burstein (8) y otros autores quienes establecen que un mínimo de dos células juntas pueden ser consideradas como Unidades Formadoras de Colonias de Megacariocitos. Este hecho es una de las razones por lo que los reportes de ambos grupos , sean diferentes respecto a la capacidad estimulante de los medios ensayados.

En los resultados presentados en la tabla I se observa que la cepa B_{2DF1}, produjo el medio con mayor capacidad estimulante, por lo que se decidió utilizarla para el desarrollo del trabajo. En la figura 2 se muestran los diferentes tipos de colonias considerados en la cuantificación de unidades formadoras de colonias de megacariocitos, que se desarrollaron en el cultivo de médula ósea de ratón estimulado por el medio condicionado de bazo de ratón.

TIPOS DE COLONIAS DE MEGACARIOCITOS DESARROLLADAS EN EL CULTIVO DE MEDULA OSEA DE RATON ESTIMULADO CON MEDIO CONDICIONADO DE BAZO



FIGURA 2. A) COLONIAS CON MEGACARIOCITOS PLENAMENTE DIFERENCIADOS AUMENTO 100X, B) COLONIAS DE MEGACARIOCITOS PEQUEÑOS Y PRIMITIVOS AUMENTO 400X, C) COLONIA MIXTA DE MEGACARIOCITOS Y GRANULOCITOS/MACROFAGOS AUMENTO 100X.

RESULTADO 3.2.0.:PREPARACION DE MEDIO CONDICIONADO DE BAZO DE RATON Y DETERMINACION DEL TIEMPO OPTIMO DE COSECHA.

- a) Medio con suero de caballo al 10%(Medio Alfa 10)
- b) Medio con suero de caballo al 1% (Medio Alfa 1)
- c) Medio libre de suero complementado con componentes séricos (Medio Alfa-0 Suplementado)
- d) Medio libre de suero , sin complementos séricos (Medio Alfa -0 No suplementado)

Seleccionada la cepa de trabajo, se prepararon 50 ml de medio condicionado con suero de caballo al 10%, al 1% y libres de suero. Este experimento se realizó para conocer la capacidad estimulante de un medio condicionado libre de suero, preparado de acuerdo con la formulación de Burstein (8), con respecto al medio control preparado con suero de caballo al 10% y al 1%.

Burstein sugiere como tiempo de cosecha el día 7, sin embargo, con base en la experiencia Nakeff y su grupo de trabajo, quienes han establecido como tiempo óptimo de cosecha el día 2, se prepararon lotes de medio por duplicado; uno de los cultivo de cada par fue cosechado a los 2 días en tanto que el otro a los 7 días.

Al probar la capacidad estimulante de los medios condicionados en cultivos de médula ósea de ratón, se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla II . Los resultados se analizaron de acuerdo con la prueba de t de Student.

Se comparó la actividad estimulante del medio Alfa-10 cosechado a los dos días contra las de los otros medios cosechados a los dos y a los siete días.

TABLA II

PREPARACION DE MEDIO CONDICIONADO CON SUERO DE CABALLO Y LIBRE DE SUERO Y DETERMINACION DEL TIEMPO OPTIMO DE COSECHA

MEDIO CONDICIONADO	DIA DE COSECHA	UFC-M/10 ⁵ cel /ml MEDIA ± E.E.	% DE ACTIVIDAD
ALFA -10	2	9.1 ± 0.32	100 ± 6
ALFA-O SUPLEMENTADO	2	11.2 ± 0.45	122 ± 13
ALFA - 1	2	6.7 ± 0.43	73 ± 7
ALFA - O NO SUPLEMENTADO	2	5.8 ± 0.29	64 ± 4
ALFA - 10	7	4.2 ± 0.53	46 ± 5
ALFA-O SUPLEMENTADO	7	2.2 ± 0.50	24 ± 6
ALFA - 1	7	0.8 ± 0.22	8 ± 3
ALFA - O NO SUPLEMENTADO	7	0.9 ± 0.23	10 ± 3

P > 0.05 NS. ALFA -10 VS ALFA - O SUPLEMENTADO
NS = NO SIGNIFICATIVA

Los resultados de las tabla II muestran que el medio libre de suero puede ser utilizado en sustitución del medio con 10% de suero, ya que la actividad estimulante del primero es ligeramente superior, lo cual no es estadísticamente significativo.

Es importante señalar que el tiempo óptimo de cosecha fue de 2 días, ya que como se observa en la tabla II al cosechar los cultivos el día 7 como lo recomiendan Burstein y otros autores (18,19), la actividad del medio con suero decae al 50%, en tanto que la del medio libre de suero es sólo de 20% con respecto a la del mismo medio cosechado a los dos días.

Esta pérdida de actividad podría deberse a que el factor producido en el medio libre de suero, se encuentra en un medio acuoso que lo hace lábil, mientras que el producido en el medio con suero de caballo, se encuentra en presencia de moléculas enlazantes, que le permitirían preservar su estructura conformacional y actividad biológica, aún siendo cosechado a los siete días.

También es posible que en el día 7 se hayan producido metabolitos tóxicos que dañen a las células en el cultivo, además de cambios de pH en el medio, que en los cultivos con suero serían contrarrestados más eficientemente que en el medio sin suero.

Con base en los resultados anteriores, el siguiente experimento tuvo como objetivo conocer la reproducibilidad de los

resultados, obtenidos con el medio libre de suero, con los logrados con el medio preparado con suero de caballo (Alfa-10).

RESULTADO 3.3.0: REPRODUCIBILIDAD DE LA CAPACIDAD ESTIMULANTE DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS ALFA-10 Y ALFA - 0 SUPLEMENTADO.

Durante cinco días consecutivos se prepararon 100 ml del medio condicionado Alfa-10 y Alfa-0 suplementado. Se sembraron y cosecharon a los dos días, determinando en cada uno la capacidad estimulante en cultivos de médula ósea de ratón. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

TABLA III

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD ESTIMULANTE DEL MEDIO CONDICIONADO ALFA - 0 SUPLEMENTADO VS EL MEDIO CONTROL ALFA 10.

MEDIO CONDICIONADO	No.de Lote/ DIFERENTE DIA	UFC-M/10 ⁵ cel/mL MEDIA ± E.E.	% DE ACTIVIDAD ESTIMULANTE
ALFA - 10	1	6.3 ± 1.53	100 ± 24
ALFA - 0 SUPLEMENTADO	1	7.7 ± 0.85	121 ± 13
ALFA - 10	2	3.8 ± 0.60	100 ± 15
ALFA - 0 SUPLEMENTADO	2	4.8 ± 0.65	127 ± 17
ALFA - 10	3	8.1 ± 1.09	100 ± 13
ALFA - 0 SUPLEMENTADO	3	10.3 ± 0.57	125 ± 7
ALFA - 10	4	7.1 ± 0.85	100 ± 12
ALFA - 0 SUPLEMENTADO	4	9.1 ± 1.10	128 ± 15
ALFA - 10	5	6.3 ± 1.02	100 ± 16
ALFA - 0 SUPLEMENTADO	5	8.1 ± 0.31	130 ± 5

RESULTADO PROMEDIO DE LOS CINCO LOTES

ALFA - 10	6.4 ± 0.40	100 ± 16
ALFA - 0 SUPLEMENTADO	8.2 ± 0.43	127 ± 11

Para comprobar los resultados anteriores se preparó una segunda serie de medios condicionados , un lote cada día y se trabajó en las mismas condiciones. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

TABLA IV

CAPACIDAD ESTIMULANTE DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS
ALFA - 10 Y ALFA 0 SUPLEMENTADO

MEDIO CONDICIONADO	No. de Lote DIFERENTE DIA	5 UFC-M/10 cel /mL MEDIA ± E.E.	% DE ACTIVIDAD ESTIMULANTE
ALFA - 10	1	7.14 ± 0.51	100 ± 7
ALFA - 0 SUPLEMENTADO	1	10.14 ± 1.05	104 ± 10
ALFA - 10	2	7.80 ± 0.32	100 ± 8
ALFA - 0 SUPLEMENTADO	2	10.50 ± 0.30	107 ± 3
ALFA - 10	3	7.20 ± 0.11	100 ± 1
ALFA - 0 SUPLEMENTADO	3	9.87 ± 0.70	101 ± 7
ALFA - 10	4	6.81 ± 0.22	100 ± 3
ALFA - 0 SUPLEMENTADO	4	9.75 ± 0.63	100 ± 4
MEDIO - 10	5	6.90 ± 0.32	100 ± 4
ALFA - 0 SUPLEMENTADO	5	9.79 ± 0.40	99 ± 12

ALFA - 10 promedio	7.17 ± 0.30	100 ± 4
ALFA - 0 SUPLEMENTADO	9.79 ± 1.10	102 ± 7

**RESULTADO 3.4.0: CONCENTRACION POR ULTRAFILTRACION DEL MEDIO
CONDICIONADO LIBRE DE SUERO EN RELACION CON
SU CAPACIDAD ESTIMULANTE.**

Los medios condicionados libres de suero, fueron concentra-
dos por ultrafiltración con membranas de exclusión molecular de
10,000 daltones. Posteriormente se determinó su capacidad estimu-
lante en cultivos de médula ósea. Los resultados se muestran en
la siguiente tabla .

TABLA V

CONCENTRACION DEL MEDIO CONDICIONADO LIBRE DE SUERO
Y DETERMINACION DE SU CAPACIDAD ESTIMULANTE.

MEDIO CONDICIONADO ALFA-0 SUPLEMENTADO	VOLUMEN / L	⁵ UFC-M/10 cel/mL MEDIA ± E.E.	% DE ACTIVIDAD ESTIMULANTE
^{1X} PROMEDIO DE 10 LOTES	1.0	7.5 ± 0.13	105 ± 5
10 X	0.1	10.83 ± 1.13	151 ± 16

La posibilidad de substituir el medio con suero de caballo
por el medio libre de suero, se manifiesta por los resultados
representados en las tablas III y IV, donde se observa que el
medio condicionado libre de suero, muestra actividad estimulante
superior a la del medio control preparado con 10% de suero de
caballo, excepto en uno de los lotes .

El análisis estadístico de estos resultados con la prueba de
t de Student (P > 0.05), indica que no existe diferencia

significativa entre la actividad estimulante del medio Alfa-10 (control) y la del Alfa-0 Suplementado. Sin embargo como puede observarse en la tabla V, la concentración por filtración molecular a 10X incrementa la capacidad estimulante del medio libre de suero .

RESULTADO 3.5.0:PRECIPITACION FRACCIONADA CON SULFATO DE AMONIO DEL MEDIO CONDICIONADO LIBRE DE SUERO .

El medio Alfa - 0 suplementado 10X se fraccionó con solución saturada de sulfato de amonio, de acuerdo con el protocolo de la página 41, obteniendo dos fracciones.

La fracción I precipitada con una concentración menor del 60% de sulfato de amonio y la fracción II precipitada con concentraciones del 60 - 80 % .Ambas fracciones se dializaron durante 24 horas contra solución amortiguadora de fosfatos 0.1 mol/L de pH 7.2 y se les determinó el contenido de proteínas totales. Los resultados se muestran en la tabla VI.

TABLA VI

CONTENIDO DE PROTEINAS TOTALES DEL MEDIO CONDICIONADO FRACCIONADO CON SULFATO DE AMONIO

MUESTRAS	VOLUMEN (ML)	PROTEINAS (NH) mg/ml	SO		
			4	2	4
MEDIO ALFA -O SUPLEMENTADO 1X	500	1.75	-		
MEDIO ALFA -O SUPLEMENTADO 10X	50	9.60	-		
MEDIO ALFA -O SUPLEMENTADO 10X FRACCION I	20	5.20	< 60 %		
MEDIO ALFA -O SUPLEMENTADO 10X FRACCION II	12	1.50	60 - 80 %		

En cultivos de médula ósea se ensayó la capacidad estimulante de medio 1X , 10X y de las fracciones obtenidas. Los resultados se muestran en la tabla VII y en la gráfica 1.

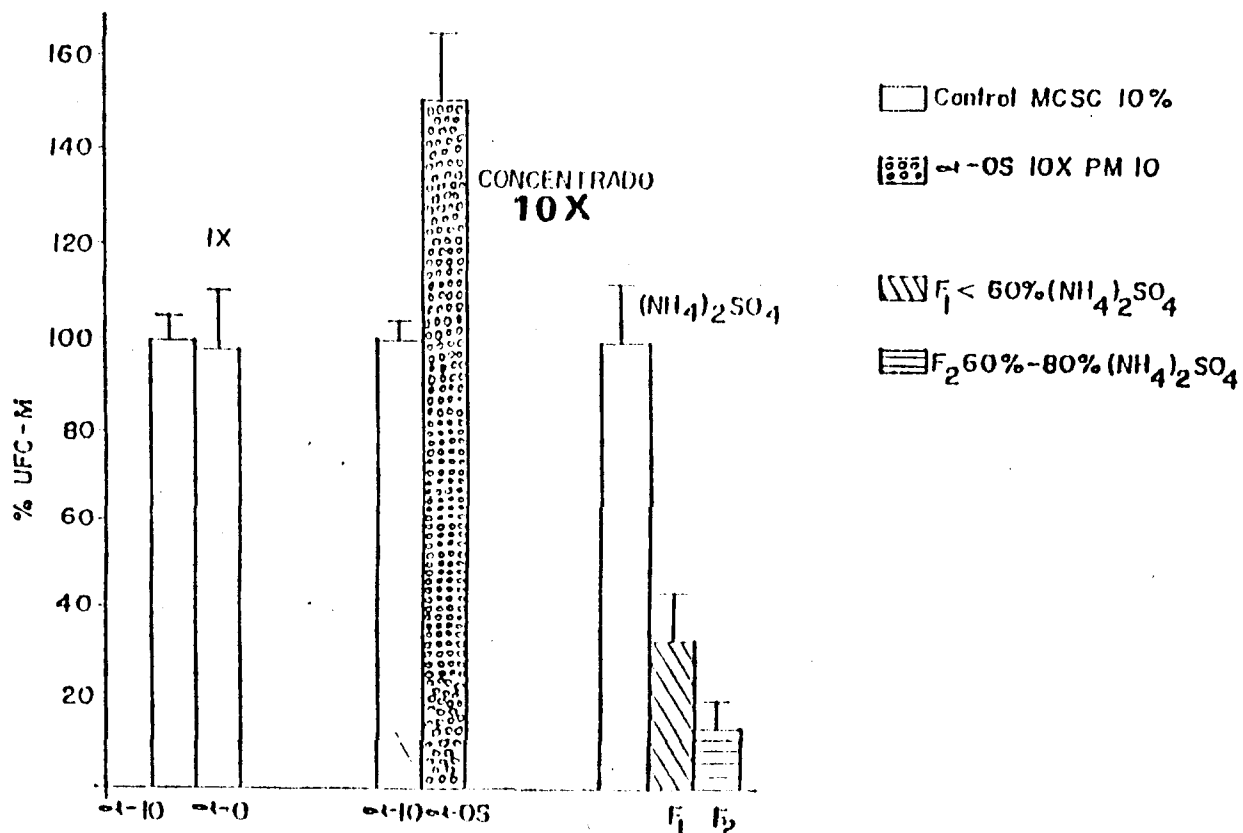
TABLA VII

ACTIVIDAD ESTIMULANTE DEL MEDIO CONDICIONADO FRACCIONADO
 CON SOLUCION SATURADA DE SULFATO DE AMONIO.

MEDIO CONDICIONADO	UFC-M/10 ⁵ Cel/mL
MEDIO ALFA - 10 CONTROL	9.79 ± 0.40
MEDIO ALFA - 0 SUPLEMENTADO 1X	9.75 ± 0.30
MEDIO ALFA - 0 SUPLEMENTADO 10X	12.50 ± 0.80
FRACCION I (NH ₄) ₂ SO ₄ < 60%	1.75 ± 0.64
FRACCION II (NH ₄) ₂ SO ₄ 60-80%	0.83 ± 0.75

GRAFICA 1

ACTIVIDAD MEGACARIOPOYETICA DEL MEDIO CONDICIONADO
 Y DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS CON SULFATO DE AMONIO



De acuerdo con la literatura, en la fracción I obtenida con concentraciones de sulfato de amonio menores al 60%, se encuentra la mayor cantidad de albúmina sérica, la cual presentó actividad estimulante del 32 % con respecto al medio Alfa 10 considerado como el control (100% de actividad estimulante). En la fracción II obtenida con concentraciones de 60 - 80 % de sulfato de amonio, se encontró que la actividad estimulante es sólo del 15 % con respecto a la del control Alfa -10.

Es en esta segunda fracción en donde MacDonald (29) y otros autores (78) han descrito un factor megacariopoyetico al fraccionar mediante el mismo procedimiento, plasma de ratas trombocitopénicas.

Los resultados anteriores muestran varios aspectos interesantes: Primero, que la albúmina presente en la fracción I, no obstante que pudiera llevar enlazadas algunas hormonas ú otro tipo de moléculas con actividad mimetizante a la del factor, no parece ser la responsable de la actividad biológica del medio condicionado libre de suero; ya que de otra manera, dicha fracción habría tenido mayor actividad.

Segundo, el fraccionamiento con sulfato de amonio, utilizado en la purificación de proteínas provenientes de gran variedad de materiales (79) parece ser un método drástico para materiales pobres en contenido de proteínas.

La diferencia entre el resultado obtenido en el presente trabajo y los reportados en la literatura (80), podría explicarse en virtud de que algunos autores han reportado el aislamiento del factor megacariopoyético a partir del suero o del plasma de animales con trombocitopenia inducida por anticuerpos antiplaquetarios; ésto es, un material inicial con mayor contenido y variedad de proteínas, por lo que la purificación con sulfato de amonio es adecuada, sin embargo, para los medios condicionados libres de suero, parece ser drástica e inadecuada .

Las fracciones obtenidas no mostraron actividad biológica por separado, ni al ser mezclas, lo que indica que el fraccionamiento escalonado con sulfato de amonio, aparentemente parece producir cambios irreversibles en las proteínas constituyentes de las fracciones, que les impiden mantener su actividad estimulante después del tratamiento.

Esto puede indicar también que al separar a la albúmina (fracción I) del factor megacariopoyético (fracción II), al no tener otra proteína o molécula que absorba el agua o que lo estabilice se podría desnaturalizar.

De lo anterior surgieron como alternativas : Utilizar albúmina sérica en concentraciones menores o bien eliminarla como constituyente del medio de cultivo, de tal forma que no fuese necesario utilizar la precipitación fraccionada con sulfato de amonio.

De acuerdo con los resultados anteriores en los cuales se observa la pérdida de actividad del factor megacariopoyético al ser separado y recuperado, se consideró pertinente disminuir la concentración de proteínas en el medio de cultivo para facilitar su separación, utilizando para ello cromatografía de líquidos de alta resolución.

Se prepararon lotes de medio condicionado Alfa-0 suplementado libres de albúmina sérica, se les determinó la concentración de proteínas totales y la actividad estimulante *In vitro*.

RESULTADO 3.6.0. IMPORTANCIA DE LA ALBUMINA DE SUERO EN LA PREPARACION DE MEDIO CONDICIONADO LIBRE DE SUERO

Se cuantificaron las proteínas totales de los medios condicionados libres de suero antes y después de ser preparados. Los resultados se muestran en la tabla VIII.

TABLA VIII

CONTENIDO DE PROTEINAS TOTALES DE LOS MEDIOS CONDICIONALES LIBRES DE SUERO.

MEDIO DE CULTIVO	CONTENIDO DE PROTEINAS TOTALES mg/mL.	
	Antes del cultivo	Después del cultivo
Alfa-O SUPLEMENTADO CON ALBUMINA SERICA Y CON TRANSFERRINA HUMANA	1.50	1.75
Alfa-O SUPLEMENTADO LIBRE DE ALBUMINA	0.11	0.18
Alfa-O SUPLEMENTADO LIBRE DE ALBUMINA Y DE TRANSFERRINA	0.02	0.11

La actividad megacariopoyética de los medios condicionados en cultivo de médula ósea de ratón se indica en la tabla IX.

En la tabla VIII se observa un incremento en la concentración de proteínas después del cultivo en los tres tipos de medios preparados. Sin embargo, para el medio Alfa-0 Suplementado con albúmina y transferrina este incremento es sólo del 16%, para el medio libre de albúmina es de 63.3%, en tanto que para el medio libre de albúmina y transferrina el incremento en la concentración de proteínas es 550 %. Estos resultados podrían indicar que en todos los medios se sintetizaron proteínas, entre ellas, el factor estimulante de colonias de megacariocitos.

Se observa una relación inversa entre el contenido inicial de proteínas y la capacidad de producirlas en el cultivo correspondiente de bazo.

El incremento del 550% obtenido en el medio condicionado libre de albúmina y de transferrina puede atribuirse posiblemente a:

A) Producción del factor estimulante de colonias de megacariocitos en el cultivo de bazo.

B) Lisis celular y liberación de proteínas celulares al medio, debido a que este medio no contiene suero, albúmina u otros componentes que conserven la tonicidad del medio de cultivo y con ello la viabilidad de las células.

C) Que el incremento realmente fuese menor, ya que la concentración inicial proteínas (0.020 mg/ml) en el medio libre de

albúmina y transferrina , cae en el intervalo de concentración en el que la técnica es menos precisa.

Al ensayar la capacidad estimulante de los medios condicionados, se encontró que el medio con mayor producción de proteínas, presentó la menor actividad megacariopoyética , lo cual puede observarse en la tabla IX.

TABLA IX

DETERMINACION DE LA CAPACIDAD MEGACARIOPOYETICA DEL MEDIO
CONDICIONADO ALFA -0 SUPLEMENTADO LIBRE DE ALBUMINA SERICA.

MEDIO CONDICIONADO	UFC-M X 10 ⁵ MEDIA ± E.E.	% DE ACTIVIDAD ESTIMULANTE
ALFA - 10	6.3 ± 0.45	100 ± 7
ALFA - 0 SUPLEMENTADO	5.7 ± 0.49	90 ± 8
ALFA - 0 SUPLEMENTADO SIN ALBUMINA SERICA	2.6 ± 0.22	42 ± 4
ALFA - 0 SUPLEMENTADO SIN ASB NI TRANSFERRINA	1.4 ± 0.23	22 ± 4

P NO SIGNIFICATIVA AL COMPARAR LOS MEDIOS ALFA - 10 VS
ALFA - 0 SUPLEMENTADO CON ALBUMINA Y CON TRANSFERRINA.

En la tabla anterior se observa que el medio condicionado Alfa - 0 Suplementado libre de albúmina y de transferrina (el de mayor producción de proteína), presentó actividad estimulante del 24.4% con respecto al medio Alfa - 0 Suplementado con albúmina y con transferrina. Esta actividad estimulante menor que la de los otros medios, puede deberse a que al no estar presente el suero, albúmina ú otras moléculas estabilizadoras del factor megacariopoyetico, se pierda o reduzca su capacidad estimulante; o bien como se mencionó anteriormente, que el incremento en la concentración de proteínas del medio libre de albúmina y de transferrina, no sea por la producción del factor megacariopoyetico sino por la presencia de proteínas de células muertas por lisis

Los resultados mostrados en la tabla IX indican que al excluir a la albúmina en la preparación del medio condicionado, su actividad estimulante disminuye hasta 42% con respecto al medio control de máxima estimulación (Alfa - 10).

Como es sabido, entre las funciones de la albúmina se encuentran el mantenimiento del pH y tonicidad del medio, la capacidad enlazante de iones, hormonas, prostaglandinas, ácidos grasos y proteínas. Esta unión que sirve para estabilizar moléculas, o bien retirar de la circulación o del medio sustancias que pudieran dañar la integridad celular (80).

Entre las moléculas del medio condicionado que podrían enlazarse a la albúmina se encuentra el factor megacariopoyetico,

protegiéndolo así del medio acuoso, que pudiera causarle cambios estructurales al modificar sus puentes de hidrógeno y posiblemente la pérdida o disminución de su capacidad estimulante.

Dicho enlazamiento podría proteger al factor megacariopoyetico de la acción de proteasas o de otros productos del metabolismo celular liberados al medio de cultivo, así como de compuestos contaminantes (2 - 5 %) de la albúmina fracción V, obtenida por el método de Cohn (81). Sin embargo, esto último se descarta cuando la albúmina es purificada con carbón activado o por diálisis como lo sugiere Iscove (82).

Los resultados de la tabla IX, demuestran que la albúmina es importante en la producción y estabilización del factor estimulante de colonias de megacariocitos, a pesar de que dificulta su aislamiento.

Por otra parte, es importante señalar que la transferrina empleada en la preparación del medio condicionado, según la formulación original de Wilbert e Iscove para la producción de un factor eritropoyetico, en nuestro sistema de cultivo no parece ser un componente esencial, como lo demostraron estos autores en su sistema de cultivo, posiblemente debido a que la línea megacariopoyetica no es tan dependiente del transporte de hierro para su desarrollo.

La transferrina es una glicoproteína con dos sitios de unión específica para iones Fe^{3+} , al estar ante iones bicarbonato o carbonato lleva a cabo en condiciones óptimas el transporte de hierro (83). También se ha informado que la transferrina incrementa la capacidad mitogénica de linfocitos estimulados con mitógenos del tipo de *Phytolacca americana*, originando que ambas sustancias potencien su actividad biológica.

Nuestro sistema de cultivo contiene iones bicarbonato y las células productoras del factor megacariopoyético son estimuladas con *Phytolacca americana*, esto significa que se tienen condiciones óptimas de cultivo y se esperaría la producción de mayor cantidad del factor estimulante debido a un incremento en la concentración de las células productoras del mismo (84).

Sin embargo, a pesar de que esto pudiera ocurrir en el sistema de cultivo y aunque la concentración del factor megacariopoyético fuera mayor, al no estar presente una proteína estabilizadora y protectora en el medio acuoso, se pierde su actividad estimulante.

Es posible pensar que en el cultivo de células de bazo de ratón, aunque la transferrina esté presente en concentraciones altas como son 300 ug/ml, no tiene la capacidad enlazante de la albúmina y no es efectiva para enlazar y estabilizar al factor megacariopoyético en ausencia de albúmina, por lo que éste pierde su capacidad estimulante. Por ello podría ser

sustituída por otra proteína con capacidad enlazante similar a la de la albúmina, pero libre de contaminantes que puedan enmascarar o modificar la actividad estimulante del factor megacariopoyetico.

**RESULTADO 3.7.0: PREPARACION DE MEDIO CONDICIONADO CON DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE TRANSFERRINA E INSULINA.**

Considerando que el medio condicionado libre de albúmina de suero complementado con transferrina humana 300 ug/ml, presentó poca capacidad estimulante de la megacariopoyesis *in vitro*, en el siguiente experimento se adicionó insulina como componente del medio, con el propósito de mejorar la capacidad estimulante del medio condicionado; Como es sabido, la insulina incrementa el almacenaje de energía en la forma de glucógeno o grasa, utilizada posteriormente en procesos metabólicos, además de estimular la síntesis de proteínas, de ácidos nucleicos y de energía (ATP) mediante la estimulación de la glucólisis y de la fosforilación oxidativa (85).

Con base en las propiedades de la insulina, se esperaba que su adición al medio de cultivo, estimulara a las células productoras del factor megacariopoyetico a una mayor producción, obteniéndose mayor concentración de él en el medio y con ello mejor capacidad estimulante del medio condicionado, además poder servir como proteína enlazante y estabilizadora del factor megacariopoyetico.

Inicialmente, se adicionaron 5 ug/ml que es la concentración de insulina recomendada en la literatura, para el cultivo de diversas líneas celulares (86).

Con el fin de conocer el efecto de concentraciones mayores sobre la producción del factor estimulante de colonias de megacariocitos, también se prepararon 250 ml de medios de cultivo con 50 y 100 ug/ml de insulina, sin albúmina ni transferrina: Se prepararon 250 ml de cada uno de los siguientes medios de cultivo:

MEDIO DE CULTIVO	TRANSFERRINA ug/ml	INSULINA ug/ml
I	300	-
II	300	5
III	30	-
IV	30	5
V	-	50
VI	-	100

Se determinó la capacidad estimulante de los medios condicionados en cultivo de médula ósea de ratón. Los resultados se muestran en la tabla X y en la gráfica 2 donde se expresan como porcentaje de actividad estimulante comparada contra la del medio control de estimulación máxima Alfa - 10.

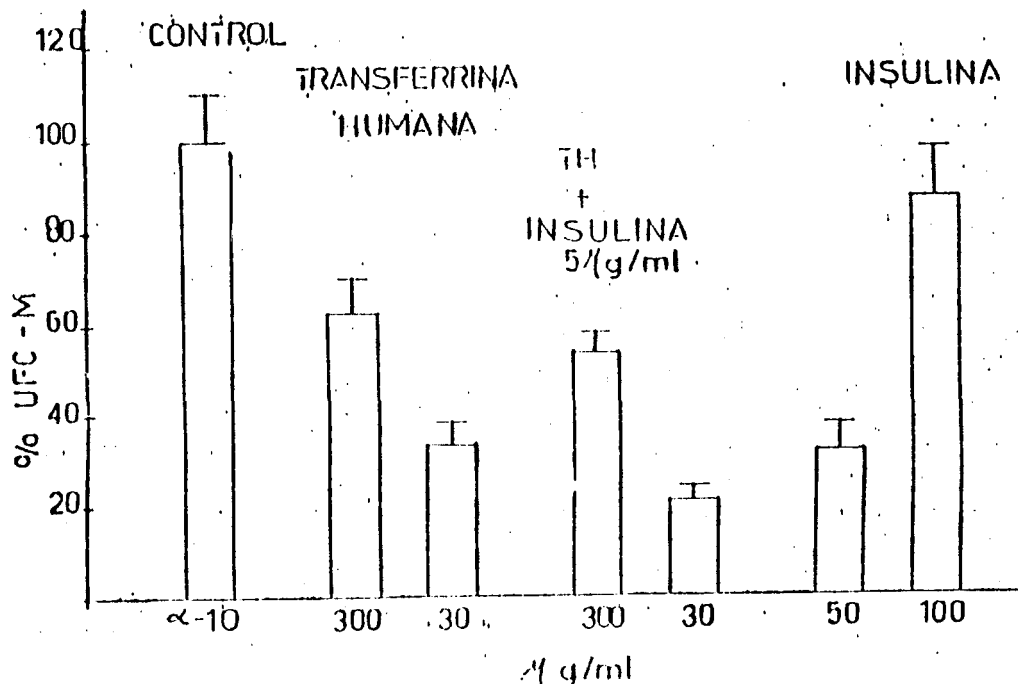
TABLA X

EFEECTO DE LA ADICION DE INSULINA AL MEDIO ALFA - O SUPLEMENTADO LIBRE DE ALBUMINA SERICA.

MEDIO CONDICIONADO	UFC-M X 10 ⁵ cel/mL MEDIA ± E.E.
ALFA-0 SUPLEMENTADO CON TRANSFERRINA 300 ug/ml	2.71 ± 0.29
ALFA-0 SUPLEMENTADO CON TRANSFERRINA 300 ug/ml ± INSULINA 5 ug/ml	2.56 ± 0.22
ALFA-0 SUPLEMENTADO CON TRANSFERRINA 30 ug/ml	1.60 ± 0.23
ALFA-0 SUPLEMENTADO CON TRANSFERRINA 30 ug/ml ± INSULINA 5 ug/ml	1.00 ± 0.14
ALFA-0 SUPLEMENTADO CON INSULINA 50 ug/ml	1.50 ± 0.26
ALFA-0 SUPLEMENTADO CON INSULINA 100 ug/ml	4.25 ± 0.50
ALFA -10 (CONTROL DE MAXIMA ESTIMULACION)	4.73 ± 0.45

GRAFICA 2

ACTIVIDAD ESTIMULANTE PORCENTUAL DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS LIBRES DE ALBUMINA SERIA EN RELACION CON LA CONCENTRACION DE TRANSFERRINA HUMANA Y DE INSULINA.



Se observa que la actividad estimulante de la transferrina parece depender de su concentración, independientemente de la adición de insulina (5 ug/ml).

La actividad estimulante del medio complementado con 30 ug/ ml de transferrina fue solamente 53% de la presentada con 300 ug/ml.

Por otra parte, la adición de 5 ug/ml de insulina parece interaccionar con la transferrina reduciendo todavía mas su capacidad estimulante, siendo aún mayor esta interacción cuando la concentración de transferrina es solamente de 30 ug/ml.

Curiosamente, la adición en exclusivo de insulina a concentraciones mayores, presentó un efecto positivo sobre la actividad estimulante del factor megacariopoyetico; Con 50 ug/ml obtiene un medio con 31.7% con respecto a la del medio condicionado control Alfa - 10, en tanto que la actividad el medio preparado con 100 ug/ml de insulina fue de 89.7%.

Al realizar la prueba estadística de t de Student con los resultados mostrados en la tabla X, se encontró que la diferencia en la capacidad estimulante de los medios con 300 ug/ml y 30 ug/ml de transferrina es estadísticamente significativa, esto es, que tal diferencia es verdadera y no producto del azar, lo que confirma que la concentración de transferrina (300 ug/ml) en la preparación del medio libre de albúmina, sí es determinate, pues confiere mayor capacidad estimulante al medio condicionado.

Con esta misma prueba estadística, se encontró que no existe diferencia real entre la capacidad estimulante de los medios preparados con transferrina en ausencia o presencia de insulina.

Lo que indica que bajo las condiciones de experimentación, la insulina en presencia de transferrina, no mejora la capacidad estimulante del medio condicionado, esto pudiera deberse a que la insulina se enlazara con la transferrina y la incapacitara para unirse al factor megacariopoyético y estabilizarlo, quedando ella misma imposibilitada de enlazarse al factor estimulante y que éste pierda su capacidad estimulante.

Al analizar mediante la prueba de Student los resultados de la actividad estimulante del medio condicionado preparado con 50 ug/ml de insulina, contra los del medio con 100 ug/ml, se encontró que la mayor actividad estimulante de este último es estadísticamente significativa. Sin embargo al compararla con la del medio control (Alfa - 10), no se encontró una diferencia significativa estadísticamente, lo que indica que la capacidad estimulante de ambos medios es similar y que por tanto, el medio preparado con 100 ug/ml de insulina podría ser utilizado como fuente de producción del factor megacariopoyético en sustitución del medio Alfa - 10.

En el siguiente experimento, se determinó la concentración óptima de insulina que permite la producción del factor megacariopoyético en el cultivo de bazo de ratón.

RESULTADO 3.8.0 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE INSULINA EN LA PREPARACION DE MEDIO CONDICIONADO CONDICIONADO LIBRE DE ALBUMINA Y DE TRANSFERRINA

Se procedió a determinar la concentración óptima de insulina en la preparación del medio condicionado libre tanto de albúmina como de transferrina, variando la concentración de 5 - 200 ug/ml de insulina.

Se probó la actividad estimulante de los medios condicionados, se incluyó un control que en lugar de medio condicionado, tenía únicamente 100 ug/ml de insulina, para determinar si esta proteína estimulaba per se la megacariopoyesis. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

TABLA XI

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE INSULINA SOBRE LA ACTIVIDAD ESTIMULANTE DEL MEDIO CONDICIONADO ALFA-0 SUPLEMENTADO LIBRE DE ALBUMINA Y DE TRANSFERRINA.

MEDIO ALFA-0 SUPLEMENTADO SIN ALBUMINA NI TRANSFERRINA	5 UFC-M X 10 cel/mL MEDIA ± E.E.	% DE ACTIVIDAD ESTIMULANTE
INSULINA 5 ug/ml	4.4 ± 0.52	44 ± 5
INSULINA 50 ug/ml	6.4 ± 0.48	63 ± 5
INSULINA 100 ug/ml	8.8 ± 0.40	84 ± 6
INSULINA 150 ug/ml	4.6 ± 0.48	47 ± 5
INSULINA 200 ug/ml	3.8 ± 0.46	37 ± 5
INSULINA 100 ug/ml SIN MEDIO CONDICIONADO	1.4 ± 0.24	14 ± 4
ALFA - 10 CONTROL DE MAXIMA ESTIMULACION	10.0 ± 0.66	100 ± 8

De los resultados anteriores puede deducirse que el medio preparado con 100 ug/ml de insulina, es el que presenta la actividad estimulante más cercana a la del medio control, obteniéndose una curva típica dosis-respuesta, para las concentraciones de 5 a 100 ug/ml de insulina. Con las concentraciones mayores a 100 ug/ml, se observa sin embargo un efecto inhibitorio, señalando el comportamiento bifásico descrito para algunas hormonas (87).

Barnes y Sato (63) encontraron que todas las líneas celulares estudiadas por ellos requerían insulina como componente de los medios libres de suero.

Estos autores reportan un estímulo de la proliferación celular, además de la síntesis incrementada de ácidos grasos y de glucosa, lo cual se vió en células de las líneas GH-3, HeLa y M2R en medios libres de suero. La concentración de insulina requerida para este estímulo de crecimiento celular, en casi todos los casos es extraordinariamente alta. Sato ha sugerido que las concentraciones altas son requeridas, debido a que la insulina es inactivada rápidamente a 37°C en medios de cultivo como el F - 12 que contiene cisteína (62).

Mather (87) encontró que si la concentración de insulina es rastreada por radioinmunoensayo, se encuentra que más del 90% es desnaturizada en menos de una hora en medio F - 12 a 37° C.

Hayashi (86) indica que los requerimientos de insulina de la línea GH3 pueden disminuirse a una concentración diez veces menor, si la cisteína (que reduce el puente disulfuro de la insulina y la inactiva) es reemplazada por la cistina usando medio F - 12 libre de suero.

Sin embargo aún en esta zona de la curva dosis-respuesta, las concentraciones efectivas de insulina, están muy alejadas de su nivel fisiológico que es de 0 a 25 uU/ml . El hecho de que algunas líneas celulares como las MCF-7 y ZR-75 sean capaces de responder a la insulina en concentraciones fisiológicas en medios libres de suero, dificulta el estudio del papel específico de la misma en estos sistemas de cultivo.

Como es sabido, entre las células blanco de la insulina se encuentran los linfocitos, adipocitos, hepatocitos y fibroblastos. Estos tipos celulares comúnmente poseen receptores celulares, cuya unión con la insulina se caracteriza por ser del tipo cooperativa. Esto es, que el número de receptores desaparece conforme se van ocupando (88, 89).

Sarre (90) y Terris (91) han señalado que la unión insulina-receptor, es dependiente del tiempo y de la temperatura. En las células hepáticas se ha demostrado que estos receptores, tienen una masa celular cercana a los 30,000 daltones y que frecuentemente están asociados a lípidos. De tal forma que cuando las células se exponen a lipasa se modifica la unión de la insulina con su receptor (92).

Se ha descrito también que la región de unión insulina-receptor incluye muchos residuos hidrofóbicos y se cree que dicha unión está mediada por interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno específicos (93).

Con la unión de insulina a sus receptores celulares se incrementa la velocidad de síntesis y almacenamiento de proteínas y de las reservas de energía (94).

Se sabe también del papel de la insulina sobre la síntesis de ácidos nucleicos, regulación de la salida del RNAm del núcleo, de tal forma que se puede pensar que en este sistema de cultivo, la insulina además de estimular la utilización de glucosa podría estimular la síntesis de DNA y RNA en los linfocitos (células de bazo) del cultivo, incrementando el número de células productoras del factor megacariopoyético. De tal modo que su concentración en el medio condicionado también aumentaría. Más que la capacidad para la producción del factor, se ha aumentado el número de células productoras incrementándose aumentando su concentración (95).

A pesar de la propiedades fisiológicas mencionadas de la insulina, per se no parece ser la responsable directa de la proliferación celular megacariocítica en los cultivos de médula ósea.

Cuando se adicionan 100 ug/ml de insulina en sustitución del medio condicionado preparado con esa concentración, su capacidad estimulante es sólo 15.8% de la presentada por el medio condicionado que lo contiene, lo cual puede observarse en la tabla XI.

Lo anterior comprueba que el factor megacariopoyetico del medio condicionado es esencial para estimular el desarrollo de UFC-Meg en este sistema de cultivo.

Nuestros resultados difieren marcadamente de los obtenidos por Watanabe y su grupo, quienes reportan actividad megacariopoyetica de la insulina al ser adicionada a un cultivo líquido de médula ósea de ratón, estimulado con medio condicionado de bazo preparado con suero fetal de ternera al 15% (96).

Posiblemente la diferencia en los resultados es que Watanabe y su grupo, adicionan insulina ademas del medio condicionado de bazo al cultivo de médula ósea de ratón, para el desarrollo de UFC-Meg, mientras que nuestro grupo utiliza a la insulina en la preparación del medio condicionado y no directamente sobre el cultivo de médula ósea.

Consideramos que la insulina estimula la producción del factor megacariopoyetico en el cultivo de bazo (medio condicionado) y que es éste el que presenta la actividad estimulante y no como lo reportan Watanabe y su grupo, ya que cuando

se adicionan 100 ug/ml sin medio condicionado, la actividad megacariopoyetica disminuye, lo cual se observa en la tabla XI.

Consideramos además, que mas que ser la responsable de la megacariopoyesis en el sistema de cultivo de Watanabe, la insulina mejora la capacidad estimulante del medio condicionado empleado, ya que como se reporta en la literatura (97), un medio condicionado como el preparado por ellos, posee actividad megacariopoyetica por sí mismo.

Los resultados mostrados en la tabla XI representan el promedio de 20 datos, obtenidos en cinco experimentos, en los cuales se utilizaron tres frascos de difentes lotes de solución inyectable de insulina de los laboratorios Lilly. Aunque los resultados obtenidos mostraron la misma dirección, se encontró que cada lote de insulina producía medios condicionados con diferente capacidad estimulante, aún utilizando el bazo de un mismo ratón.

Es posible que la variación de la insulina se deba principalmente a que cada lote se haya preparado con grupos de animales (bovinos), con condiciones de salud diferentes.

También se calculó el costo de la preparación del medio condicionado en caso de seguir utilizando insulina en solución inyectable de Laboratorios Lilly y se determinó que su costo era ocho veces mayor, que si se utilizaba insulina liofilizada de

Sigma Chemical Co. presentando esta última la ventaja de que un solo frasco podría servir para preparar grandes volúmenes de medio condicionado, evitándose con ello las variaciones en los resultados al cambiar de lote de reactivo.

El siguiente experimento se realizó para conocer si el medio condicionado preparado con la insulina de Sigma Chemical Co., tenía actividad estimulante similar a la del medio preparado con insulina de laboratorios Lilly y por tanto si era posible utilizar insulina de Sigma en lugar de la de Lilly en la preparación del medio condicionado.

RESULTADO 3.9.0: ACTIVIDAD ESTIMULANTE DEL MEDIO CONDICIONADO PREPARADO CON INSULINA DE DOS DIFERENTES MARCAS Y CONCENTRADO POR ULTRAFILTRACION.

Tomando en cuenta los resultados del experimento anterior y considerando los costos en la preparación del medio condicionado utilizando insulina de laboratoiros Lilly. Se decidió emplear otra marca de insulina y comparar la actividad estimulante de sus medios condicionados.

Se prepararon dos lotes de cinco litros de medio de cultivo, con 100 ug/ml de insulina. uno de ellos con solución inyectable de insulina de marca Lilly y el otro con insulina liofilizada de Sigma Chemical Co.

Los medios fueron concentrados por ultrafiltracion a 10X y 100X, la concentración a 10X se efectuó para mejorar la capacidad estimulante del medio condicionado para lograr que fuera semejante a la del medio control Alfa - 10, justificando así la sustitución de este último por el medio libre de suero, en la obtención del factor estimulante de colonias de megacariocitos.

La concentración 100X se empleó para obtener mayor cantidad del factor estimulante y facilitar su detección y separación mediante HPLC.

Los medios concentrados 10X y 100X se diluyeron 1:10 con medio Alfa MEM y 1: 100 únicamente el segundo. Al determinar la actividad estimulante de los medios y de sus diluciones en cultivos de médula ósea de ratón, se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla XII y en la gráfica 3.

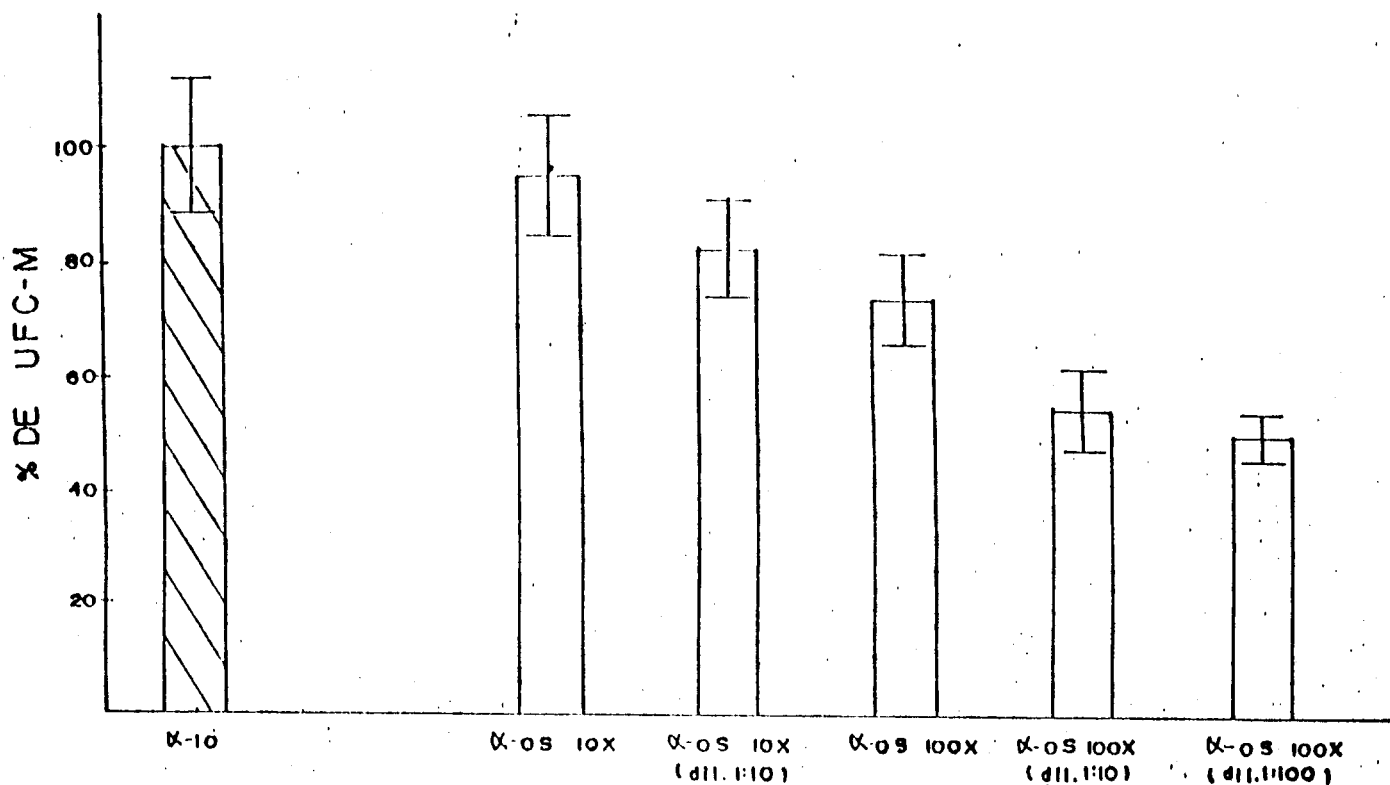
TABLA XII

EFEECTO DE LA CONCENTRACION DEL MEDIO CONDICIONADO PREPARADO CON DOS DIFERENTES MARCAS DE INSULINA SOBRE SU CAPACIDAD ESTIMULANTE.

MEDIO ALFA-0 SUPLEMENTADO	UFC - Meg MEDIA \pm E.E.	ACTIVIDAD ESTIMULANTE %	UFC -Meg MEDIA \pm E.E.	ACTIVIDAD ESTIMULANTE %
10X	8.0 \pm 0.86	95 \pm 10	12.4 \pm 1.20	144 \pm 14
10X DIL.1:10	7.2 \pm 0.66	83 \pm 8	4.8 \pm 0.28	56 \pm 3
100X	6.6 \pm 0.66	74 \pm 7	7.0 \pm 1.40	81 \pm 17
100X DIL.1:10	5.0 \pm 0.72	59 \pm 8	5.0 \pm 0.64	59 \pm 7
100X DIL.1:100	4.6 \pm 0.36	55 \pm 4	5.6 \pm 1.66	65 \pm 5
ALFA - 10 CONTROL DE MAXIMA ESTIMULACION			8.6 \pm 0.98	100 \pm 11

GRAFICA 3

EFEECTO DE LA CONCENTRACION SOBRE LA CAPACIDAD ESTIMULANTE DEL MEDIO CONDICIONADO SUPLEMENTADO CON 100 ug/ml DE INSULINA LILLY



Los resultados anteriores muestran que el medio condicionado concentrado 10X, tiene una actividad estimulante similar a la del medio control Alfa 10, lo que justifica su preparación para la obtención del factor estimulante de colonias de megacariocitos.

Se observa que el medio condicionado preparado con insulina de Sigma Chemical Co., presenta 49% más actividad megacariopoyética que el medio preparado con insulina de los laboratorios Lilly y sólo 44% con respecto a la del control, lo que confirma la necesidad de concentrarlo a 10X para mejorar su capacidad estimulante y que también se observó con el medio preparado con albúmina y transferrina.

Se pone de manifiesto que es posible sustituir a la insulina Lilly por la de Sigma en la preparación del medio condicionado, sin que se afecte la capacidad estimulante de este medio y que por tanto pueda ser utilizado como fuente de obtención del factor megacariopoyético bajando los costos de producción.

Por otra parte, en la tabla XII se observa que los medios concentrados 100X, tienen menor actividad estimulante que su correspondiente 10X. Para el medio preparado con insulina Lilly dicha actividad representa 82.5% de la presentada por el mismo medio 10X y 76% con respecto al control Alfa -10.

Para el medio preparado con insulina de Sigma Chemical Co. la pérdida de actividad representa 56% de la presentada por el medio 10X y 81.3% respecto al control Alfa - 10.

La disminución en la capacidad estimulante al pasar de la concentración 10X a 100X, puede atribuirse entre otras a las siguientes causas:

- a) Que al concentrar al factor estimulante también se concentren moléculas que lo inhiban o lo neutralicen y que al no estar en suficiente concentración en el medio 10X, no manifiestan su acción.
- b) Que al concentrar el medio condicionado éste pierda iones, modificándose la fuerza iónica y tonicidad del medio de cultivo, alterando la viabilidad de las células e impidiendo que se desarrollen colonias de megacariocitos, aún estando presente el factor megacariopoyético.
- c) Que al perderse moléculas de masa molecular pequeña como la insulina, e interleucina 1 (esta última presente posiblemente en el cultivo de bazo), dejan de estimular a los linfocitos para la producción de más factor estimulante de colonias de megacariocitos (97). Estas moléculas podrían además estabilizar al factor megacariopoyético y al no estar presentes provocar la disminución de su capacidad estimulante.

Debido a que el medio concentrado 100X presentó menor actividad estimulante que el medio 10X, se diluyó 1:10 y 1:100 para conocer si el medio diluido recuperaba su capacidad

estimulante. Esto es importante, ya que simularía la dilución del medio después de salir de la columna de separación. Se esperaba que el medio 100X diluido 1:10 tuviera al factor megacariopoyetico en una concentración semejante a la del medio 10X y por lo tanto actividad estimulante similar.

Sin embargo no fue así, ya que como se observa en la tabla XII, la actividad megacariopoyetica del medio 100X diluido 1:10 es del 59% para ambos tipos de insulina, lo que demuestra que al pasar de la concentración 10X a 100X, se pierden moléculas como la insulina y otras de masa molecular pequeña, que podrían estabilizar al factor estimulante y que el medio Alfa MEM empleado como diluyente, por ser acuoso no es capaz de restituirle dicha capacidad.

La pérdida de actividad estimulante del medio 100X diluido, pudo evitarse con el empleo de albúmina sérica u otra proteína como diluyente, que al estabilizar al factor le permitiera mantener su actividad megacariopoyética. Sin embargo, esto no se realizó ya que los medios iban a ser analizados por HPLC y la presencia de dichas proteínas, podría enmascarar al factor en el medio condicionado.

En la gráfica 3 se observa que cuando se emplea insulina Lilly en la preparación de medio condicionado, la actividad estimulante del medio concentrado 100X y de sus diluciones disminuye proporcionalmente. Esto puede atribuirse a la presencia

de un compuesto de masa molecular pequeña en el medio, adicionado como estabilizante de la solución de insulina. El medio preparado con insulina de Sigma Chemical Co. no presenta este patrón de comportamiento.

RESULTADO 3.10.0 SEPARACION CON HPLC DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS PREPARADOS CON INSULINA DE DOS DIFERENTES MARCAS.

Los medios condicionados, el medio basal Alfa-MEM y soluciones de insulina fueron separados mediante HPLC, para detectar la presencia del factor megacariopoyetico en el medio condicionado y para correlacionar su concentración con la actividad estimulante del medio condicionado. Para el corrimiento de las muestras se utilizó amortiguador de fosfatos con pH de 7.0, con una velocidad de corrimiento de 1 ml/min.

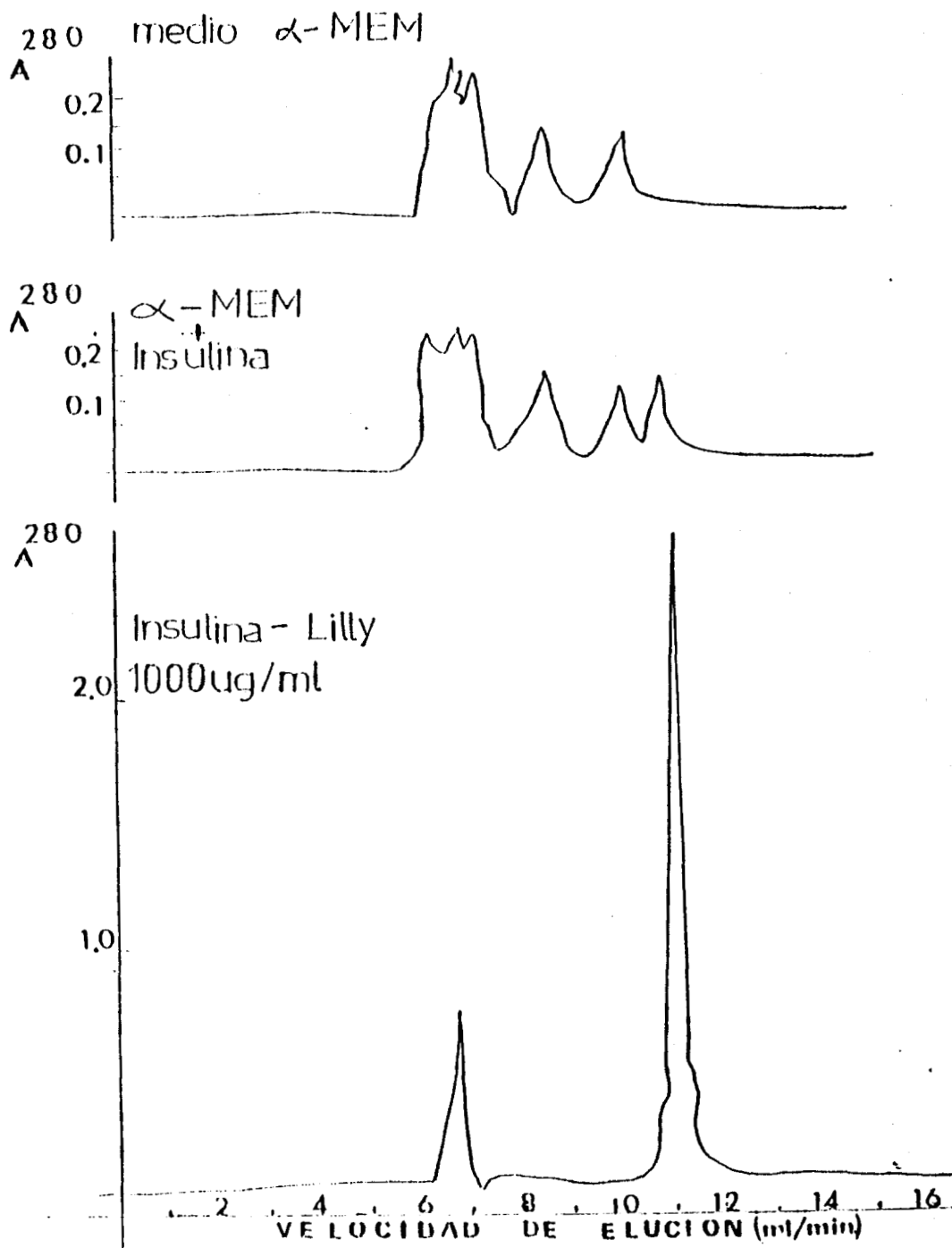
La insulina se disolvió en la solución amortiguadora mencionada anteriormente y en medio Alfa MEM, utilizando ambas mezclas como indicadoras de la composición del medio de cultivo antes de la preparación del medio condicionado y de la presencia del factor megacariopoyetico en él. Los volúmenes aplicados a la columna de separación se muestran en el siguiente cuadro y sus perfiles de elución en las gráficas 4 a 7.

CUADRO 1

MATERIAL SEPARADO POR HPLC

INSULINA DE LABORATORIOS LILLY	VOLUMEN APLICADO (ul)	INSULINA DE SIGMA CHEMICAL Co.	VOLUMEN APLICADO (ul)
SOLUCION 1000 ug/ml EN MEDIO ALFA-MEM	10	SOLUCION 1000 ug/ml EN MEDIO ALFA-MEM	25
MEDIO ALFA-MEM SIN INSULINA	10	MEDIO ALFA-MEM SIN INSULINA	10
SOLUCION 1000 ug/ml EN AMORTIGUADOR DE FOSFATOS 0.2 mol/L	50	SOLUCION 1000 ug/ml EN AMORTIGUADOR DE FOSFATOS 0.2 mol/L	50
MEDIO CONDICIONADO		MEDIO CONDICIONADO	
1X	10	1X	10
10X	10	10X	10
100X	10	100X	10

GRAFICA 4
SEPARACION POR EXCLUSION MOLECULAR EN HPLC DE INSULINA
"LILLY" Y DEL MEDIO ALFA-MEM EMPLEADOS EN LA PREPARACION
DEL MEDIO CONDICIONADO DEL BAZO DE RATON.



GRAFICA 5

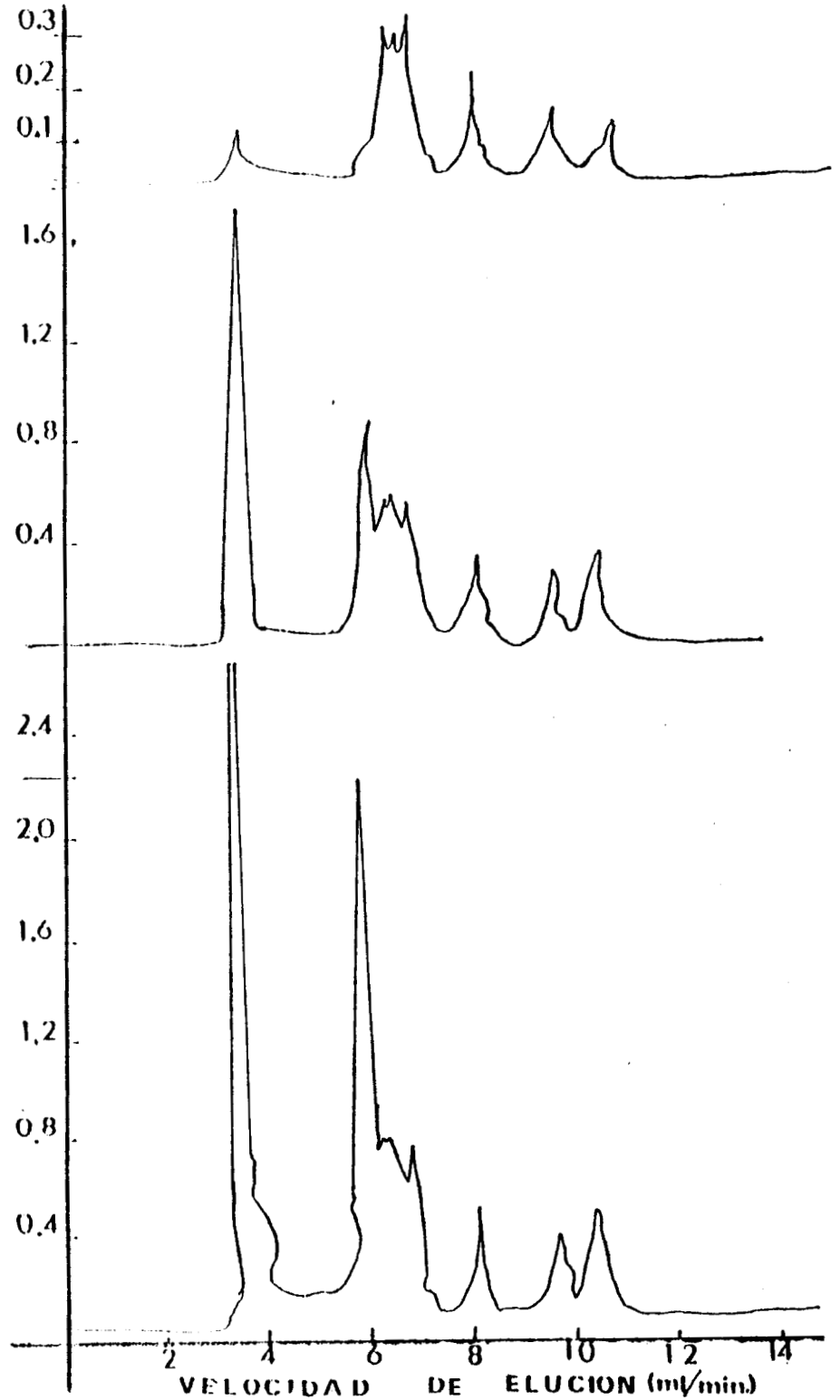
SEPARACION POR EXCLUSION MOLECULAR EN HPLC DEL MEDIO CONDICIONADO PREPARADO CON INSULINA "LILLY" Y CONCENTRADO A 10X Y 100X POR ULTRAFILTRACION.

MEDIO CONDICIONADO 1X

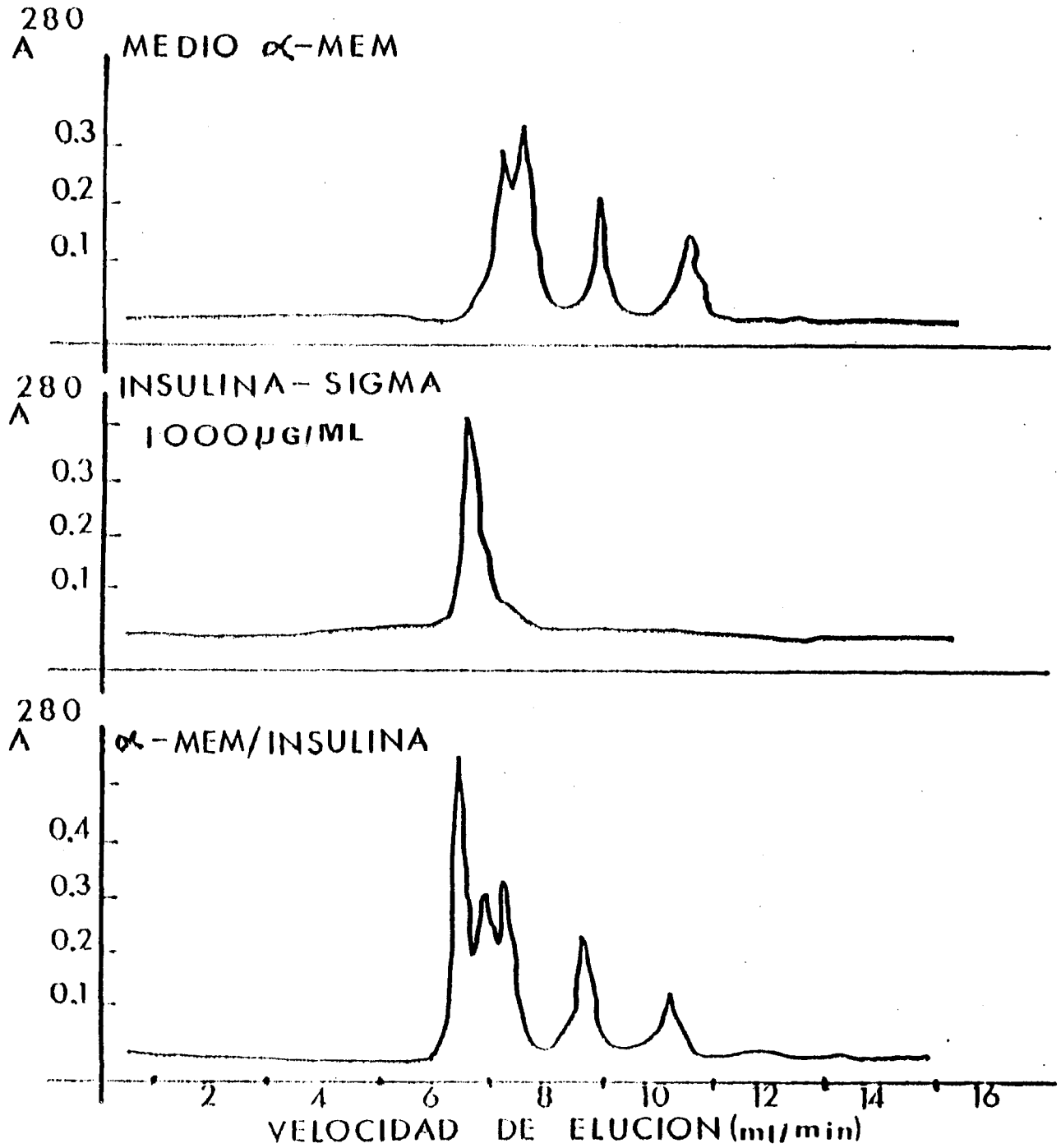
280
A

MEDIO CONDICIONADO 10X

MEDIO CONDICIONADO 100X



GRAFICA 6
SEPARACION POR EXCLUSION MOLECULAR EN HPLC DE INSULINA
"SIGMA" Y DEL MEDIO ALFA-MEM EMPLEADOS EN LA PREPARACION
DEL MEDIO CONDIONADO DE BAZO DE RATON.



GRAFICA 7

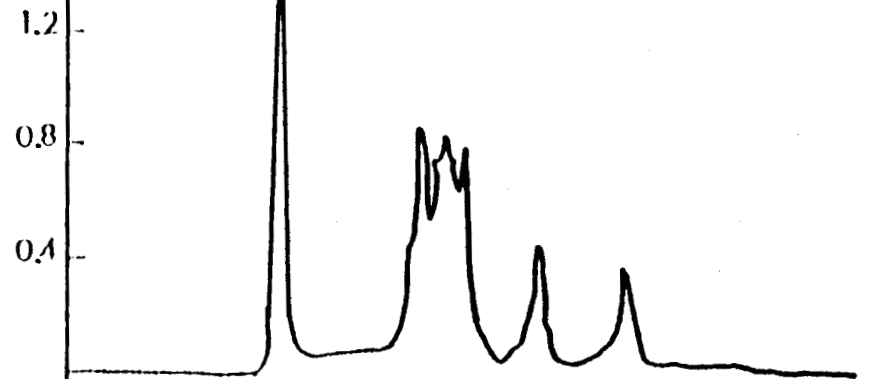
SEPARACION POR EXCLUSION MOLECULAR EN HPLC DEL MEDIO CONDICIONADO PREPARADO CON INSULINA "SIGMA" Y CONCENTRADO A 10X Y 100X POR ULTRAFILTRACION.

MEDIO CONDICIONADO 1X

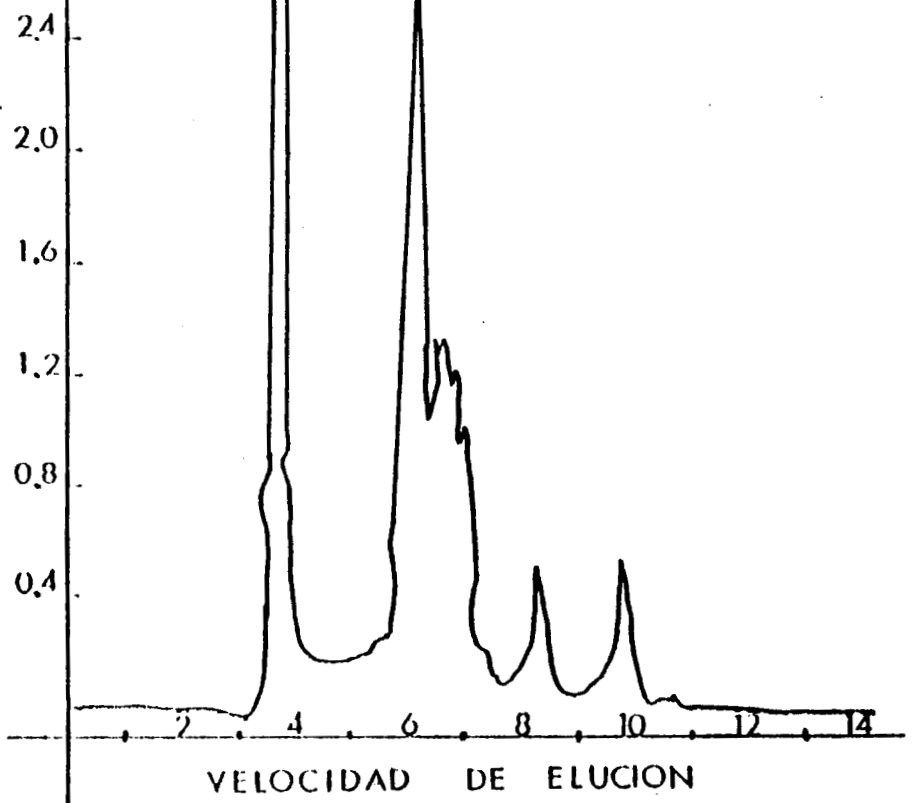
280
A



MEDIO CONDICIONADO 10X



MEDIO CONDICIONADO 100X



La solución de insulina Lilly disuelta en amortiguador de fosfatos 0.2 mol/L presentó dos picos, el primero de ellos se eluyó entre los 6 y 7 minutos y corresponde a la insulina, lo cual también se observó con la solución de insulina de Sigma Chemical Co., mientras que el segundo se eluyó entre los 10 y 12 minutos. Este último posiblemente corresponda a un compuesto de masa molecular pequeña como el fenol, adicionado para estabilizar a la solución inyectable y preservarla de contaminación microbiana.

Este segundo pico también se registra cuando la insulina es disuelta en medio Alfa-MEM. Al comparar las gráficas 4 y 6 se observa es dicho pico es la única diferencia entre las soluciones de insulina Lilly y Sigma.

En las gráficas 4 y 6 se observa que la altura (absorbencia) del pico de insulina Lilly es menor que la de insulina Sigma respectivamente, ya que a pesar de haberse empleado ambas soluciones en la misma concentración, se aplicó un volumen mayor de la segunda lo que produjo una señal mas alta.

En las gráficas 5 y 7 se muestran los perfiles de elución de los medios condicionados 1X, 10X y 100X preparados con insulina Lilly y Sigma respectivamente. En ambas gráficas se puede ver un pico de registro creciente, relacionado directamente con la concentración del medio condicionado. Este material eluido entre los 3 y 4 minutos con un máximo de absorbencia en 3.8 minutos,

sólo está presente en el medio condicionado; ésto es, después del cultivo de bazo de ratón, por lo que dicho registro parece corresponder al factor estimulante de colonias de megacariocitos.

Con base en los resultados mostrados en la tabla XII, donde se observa que el medio condicionado 10X y 100X preparado con insulina de Sigma Chemical Co. presentó mayor actividad estimulante que el medio preparado con insulina de Lilly, se decidió concentrar al primero hasta llegar a 1000X para separarlo con HPLC.

Se colectaron cuatro fracciones el volumen de cada una de ellas y su contenido de proteínas totales se muestran en la tabla XIII. En la gráfica 8 se muestra el perfil de corrimiento de las fracciones obtenidas.

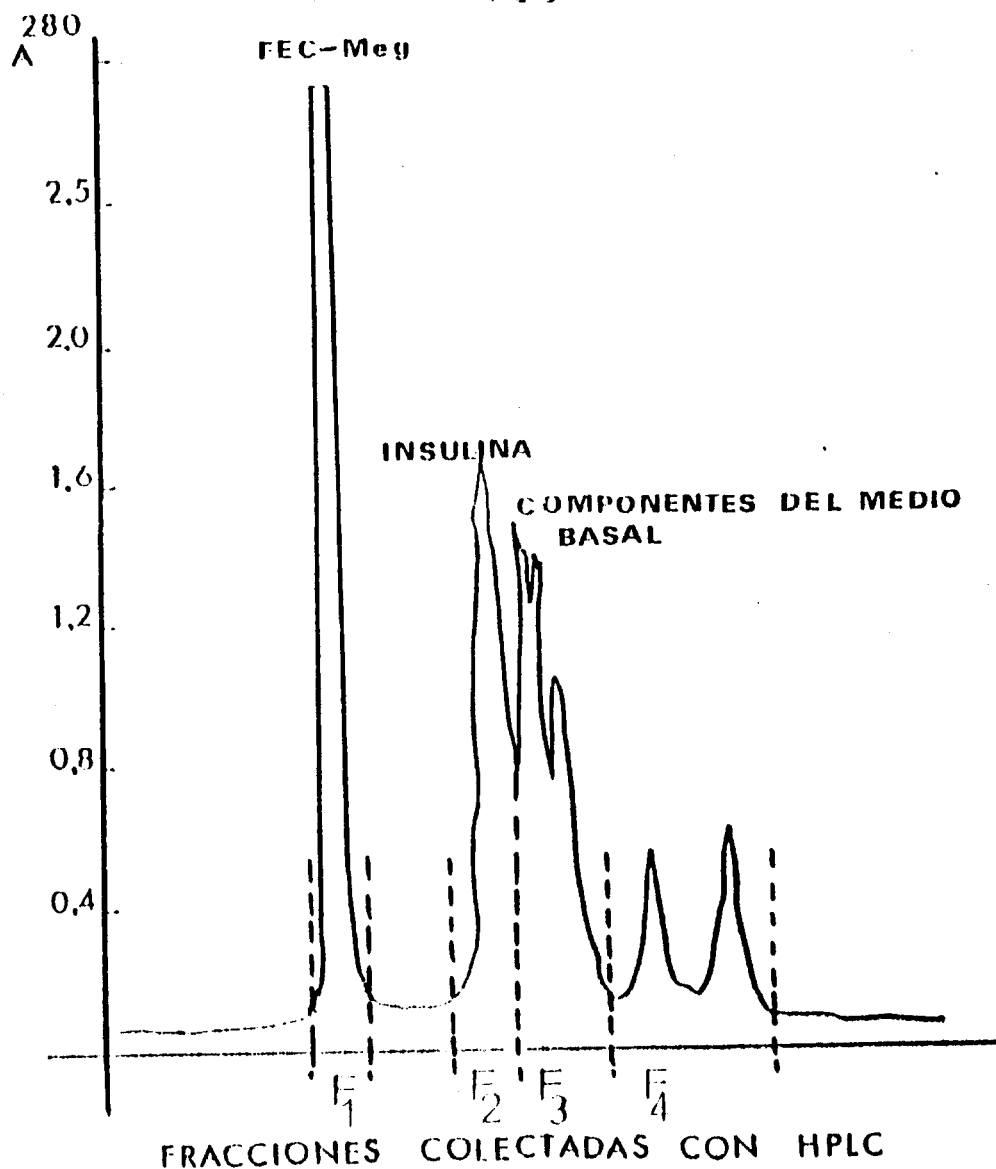
TABLA XIII

CONTENIDO DE PROTEINAS TOTALES DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DEL MEDIO CONDICIONADO 100X SEPARADO CON HPLC

FRACCION No.	TIEMPO DE ELUCION (min)	VOLUMEN (ml)	PROTEINAS (ug/ml)	MOLECULAS DE REGISTRO
1	3.8 - 4.8	2.0	76	FACTOR MEGA-CARIOPOYETICO
2	6.2 - 7.4	3.0	48	INSULINA
3	7.5 - 9.0	2.5	44	COMPONENTES DEL MEDIO ALFA-MEM
4	9.1 -12.0	4.0	10	COMPONENTES DEL MEDIO ALFA-MEM

GRAFICA 8

SEPARACION CON HPLC DEL MEDIO CONDICIONADO 1000X
PREPARADO CON 100 ug/ml DE INSULINA DE SIGMA CHEMICAL Co.



Las fracciones obtenidas se concentraron con membranas de exclusión para moléculas de masa molecular menor a 10 kd.

En la gráfica anterior se puede observar que las fracciones 3 y 4 presentan más de un pico, sin embargo no se consideró necesario manejarlos por separado, ya que como se observa en las gráficas 5 y 7 son componentes del medio basal Alfa-MEM.

La fracción 2 que corresponde a la insulina, fue ensayada por separado, ya que se deseaba conocer si esta proteína estimulaba directamente la megacariopoyesis o reforzaba la actividad estimulante del factor megacariopoyetico, además de promover su producción.

Inicialmente se determinó la capacidad estimulante de cada una de las fracciones colectadas. Sin embargo, no se observó desarrollo de colonias de megacariocitos con ninguna de las fracciones ensayadas, por lo que se prepararon las mezclas posibles de ellas y se probó su capacidad estimulante, sin poder demostrarla. Esto indica de alguna manera que el método o las condiciones de separación HPLC, posiblemente provocan cambios en la estructura física del factor megacariopoyetico, causando la pérdida de su capacidad estimulante.

En el siguiente experimento se determinó el tiempo óptimo de cosecha del medio condicionado , preparado con insulina de Sigma Chemical Co. para la producción del factor megacariopoyetico.

RESULTADO 3.11.0: DETERMINACION DEL TIEMPO OPTIMO DE COSECHA DEL MEDIO CONDICIONADO Y DE LA CONCENTRACION DEL AMORTIGUADOR DE CORRIMIENTO EN RELACION CON SU CAPACIDAD ESTIMULANTE.

Se prepararon lotes de medio condicionado de bazo de ratón, se cosecharon a los 2,3,5,7 y 9 días y concentraron 10X con membranas PM 30. Los resultados de la capacidad estimulante de estos medios se muestran en la tabla siguiente.

TABLA XIV

DETERMINACION DEL TIEMPO OPTIMO DE COSECHA DEL MEDIO CONDICIONADO DE BAZO SUPLEMENTADO CON 100 ug/ml DE INSULINA.

MEDIO CONDICIONADO ALFA-SUPLEMENTADO CON INSULINA			

CONCENTRACION DEL MEDIO	DIA DE COSECHA	UFC-Meg X 10 ⁵ cel/mL MEDIA ± E.E.	% DE ACTIVIDAD ESTIMULANTE
1 X	2	4.54 ± 0.70	53 ± 8
10 X	2	7.55 ± 0.94	91 ± 11
1 X	3	3.66 ± 0.28	42 ± 3
10 X	3	2.03 ± 0.57	23 ± 7
1 X	5	3.66 ± 0.20	42 ± 2
10 X	5	5.66 ± 0.64	66 ± 7
1 X	7	3.53 ± 0.20	38 ± 2
10 X	7	1.25 ± 0.25	14 ± 3
1 X	9	5.00 ± 0.57	58 ± 7
10 X	9	3.33 ± 0.66	39 ± 8
ALFA-10			
1 X	2	8.54 ± 0.68	100 ± 8

En la tabla anterior se observa que los medios cosechados después del día dos pierden capacidad estimulante, lo cual podría deberse entre otras causas a las siguientes:

- A) Que al ser ligada la insulina a su receptor, éste se internalice junto con la hormona y desaparezca de la superficie celular, por lo que debe pasar tiempo para que el cultivo sea estimulado nuevamente por la insulina y produzca más factor megacariopoyético.
- B) Que se produzcan en el cultivo metabolitos que dañen a las células, inactiven o neutralicen la actividad de la insulina.

Se observa que el medio condicionado 1X cosechado el día 9, incrementa su capacidad estimulante con respecto a la de los cosechados los días 3,5 y 7, indicando con posiblemente un segundo ciclo en la estimulación de la insulina sobre las células del bazo de ratón, para la producción del factor estimulante de colonias de megacariocitos.

Considerando al día 2 como el óptimo para la cosecha del medio condicionado y que la separación con HPLC y amortiguador de fosfatos 0.2 mol/L le causa la pérdida de su capacidad estimulante. El siguiente experimento se realizó para conocer si la concentración del amortiguador de corrimiento, hace que el factor megacariopoyético pierda de actividad estimulante después de su separación con HPLC.

Se prepararon 5 litros de medio condicionado, se concentraron 100X y diluyeron 1:10 con amortiguador de fosfatos de diferentes concentraciones y decidir cual podría ser usada en la separación del medio condicionado y le ayudara a preservar su actividad estimulante. A continuación se muestran sus características.

DILUENTE		pH	OSMOLARIDAD
AMORTIGUADOR DE FOSFATOS	0.2 mol/L	7.0	399
AMORTIGUADOR DE FOSFATOS	0.1 mol/L	7.1	200
AMORTIGUADOR DE FOSFATOS	0.05 mol/L	7.1	115
AMORTIGUADOR DE FOSFATOS	0.02 mol/L	7.1	51
MEDIO ALFA-MEM		7.2	290
MEDIO ALFA-MEM SUPLEMENTADO		7.2	290

En la siguiente tabla se muestra la actividad estimulante en el cultivo de los medios diluidos antes de la separación cromatográfica.

TABLA XV

ACTIVIDAD ESTIMULANTE DEL MEDIO CONDICIONADO CONCENTRADO
 EN RELACION CON LA CONCENTRACION DEL AMORTIGUADOR DE
 CORRIMIENTO UTILIZADO EN LA SEPARACION CON HPLC.

MEDIO ALFA-0 SUPLEMENTADO	AMORTIGUADOR mol/ L	UFC-M X 10 ⁵ cel/mL MEDIA ± E.E.	% DE ACTIVIDAD ESTIMULANTE
100X	0.20	7.00 ± 0.36	55 ± 2
100 X DIL.1: 10	0.20	3.24 ± 0.36	25 ± 3
100 X DIL.1: 10	0.10	6.28 ± 0.52	49 ± 4
100 X DIL.1: 10	0.05	7.74 ± 0.58	65 ± 1
100 X DIL.1: 10	0.02	11.00 ± 0.64	83 ± 5
100 X DIL.1:10	ALFA MEM	8.06 ± 0.52	63 ± 4
ALFA -10	CONTROL POSITIVO	12.74 ± 0.92	100 ± 7
ALFA MEM	CONTROL NEGATIVO	1.00 ± 0.36	8 ± 3

Los perfiles de separación del medio diluido con cada una de las concentraciones utilizadas del amortiguador, fueron semejantes a los mostrados en las gráficas 5 y 7. Los resultados indican que la concentración 0.02 mol/L, permite mantener la actividad estimulante del medio 100X diluido 1:10.

La concentración 0.2 mol/L utilizada en los corrimientos anteriores, disminuye la actividad estimulante del medio condicionado, posiblemente por daño directo a las células, debido

a su alta osmolaridad. Como es sabido, las células de la médula ósea de ratón mantienen su viabilidad en un rango de osmolaridad de 290-320 mOsm. (98), lo que se consigue al mezclar el amortiguador 0.02M mol / L con el medio condicionado concentrado 100X.

Hasta aquí puede pensarse que la concentración 0.2 mol/L del amortiguador, podría haber causado la pérdida de actividad estimulante del medio condicionado separado por HPLC, en el experimento anterior. Sin embargo, al fraccionar posteriormente el medio por HPLC utilizando amortiguador 0.02 mol/L, no se observó actividad estimulante del factor purificado.

Bajo las condiciones mantenidas en nuestro trabajo, la cromatografía de líquidos de alta resolución, fue útil para conocer la presencia del factor estimulante en el medio condicionado, aún a bajas concentraciones del material crudo.

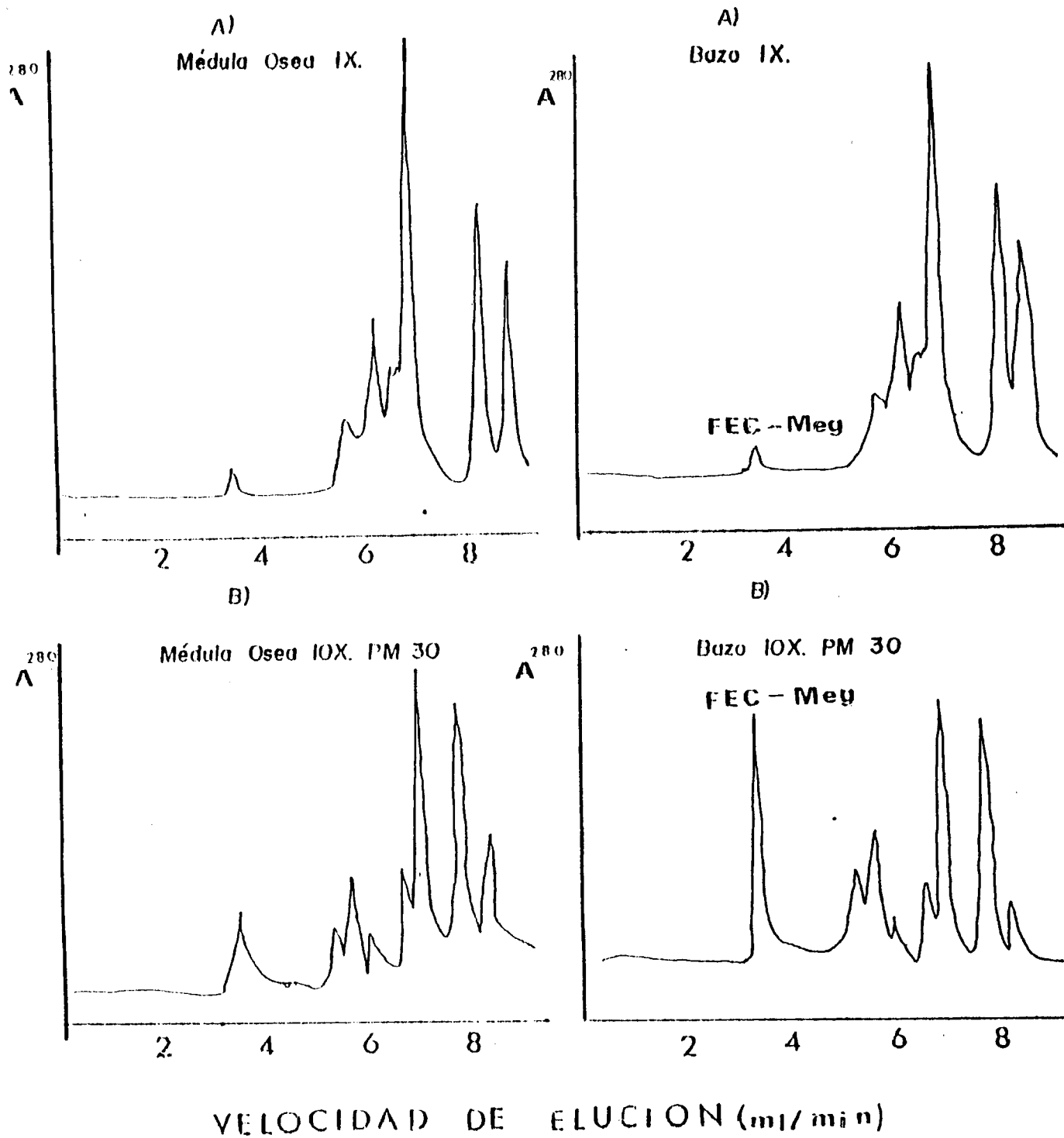
Este procedimiento fue inadecuado para preservar la actividad biológica del medio condicionado, después de haberlo pasado por la columna de cromatografía. El factor megacariopoyético no estimuló el desarrollo de UFC-Meg bien sea solo o en las diferentes combinaciones posibles.

RESULTADO 3.12.0 : PRODUCCION DEL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS
DE MEGACARIOCITOS EN EL MEDIO CONDICIONADO
DE DIFERENTES ORGANOS DE RATON EN UN SISTEMA
LIBRE DE SUERO .

Con el propósito de conocer si además del bazo, existe otro órgano capaz de producir al factor megacariopoyetico In vitro en un sistema libre de suero, se prepararon medios condicionados del bazo, riñón, pulmón y de la médula ósea de un mismo grupo de ratones. Se cosecharon a las 48 horas y concentraron 10X con membranas PM 30. Se fraccionaron con HPLC utilizando amortiguador de fosfatos 0.02 mol/L, cuyos perfiles de corrimiento se muestran en las gráficas 9 a 12. También se les determinó actividad biológica en cultivo antes y después de concentrarlos. Los resultados se muestran en la tabla XVI.

GRAFICAS 9 Y 10

PERFIL DE CORRIMIENTO DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS DE MEDULA OSEA Y BAZO 1X Y 10X SEPARADOS MEDIANTE HPLC.



GRAFICAS 11 Y 12

PERFIL DE CORRIMIENTO DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS DE PULMON Y RIÑON 1X Y 10X SEPARADOS MEDIANTE HPLC.

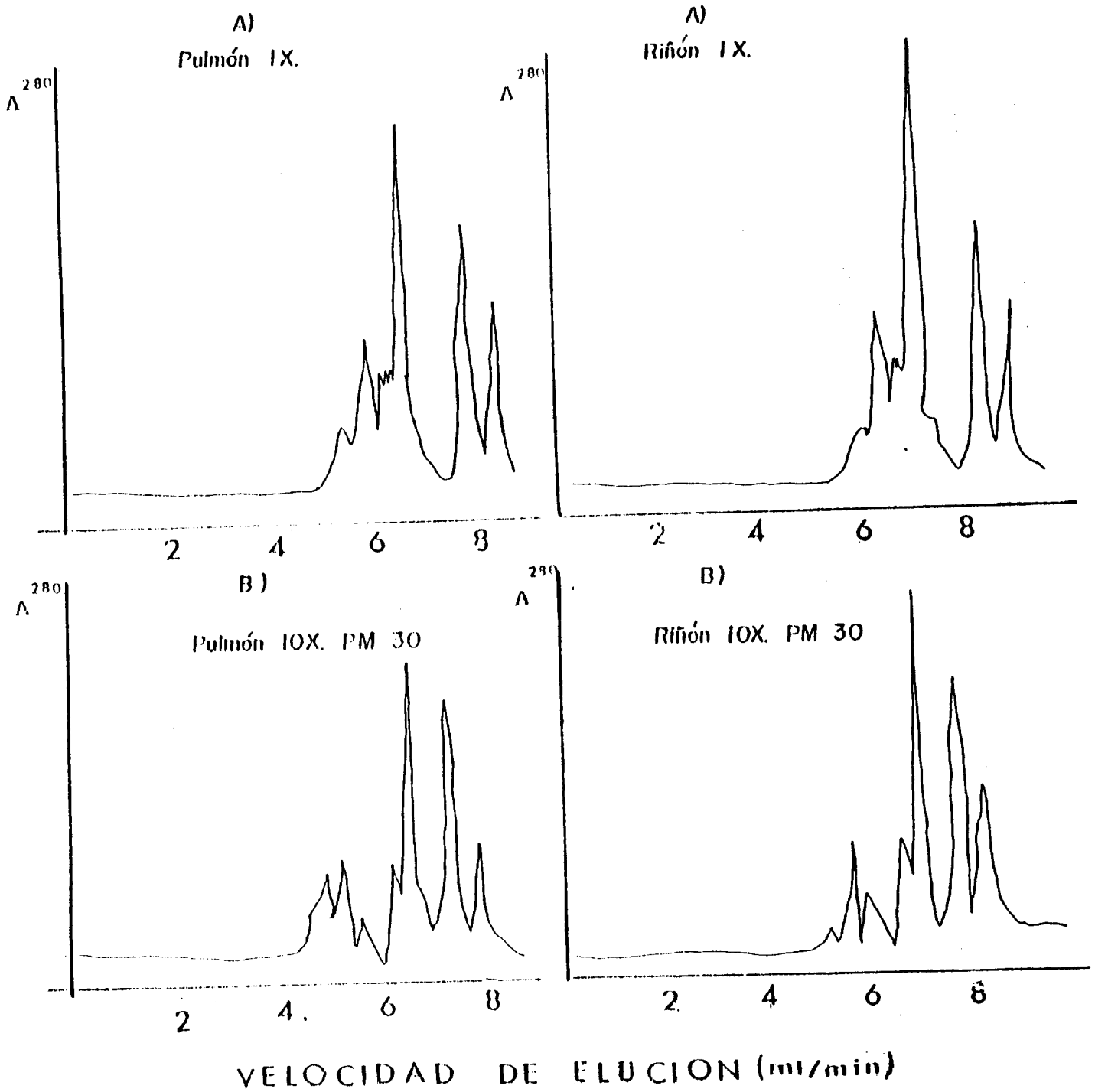


TABLA XVI

PRODUCCION DEL FACTOR ESTIMULANTE DE LA MEGACARIOPOYESIS A PARTIR DEL MEDIO CONDICIONADO DE DIVERSOS ORGANOS DE RATON EN MEDIO ALFA - O SUPLEMENTADO CON INSULINA 100 ug/ml.

MEDIO CONDICIONADO ALFA - O SUPLEMENTADO ORGANO / CONCENTRACION	5 UFC-Megs.X 10 cels./ml MEDIA ± E.E.	% DE ACTIVIDAD ESTIMULANTE
BAZO 1 X	7 .32 ± 0.64	76 ± 7
BAZO 10 X	8.00 ± 1.00	84 ± 11
MEDULA OSEA 1 X	1.22 ± 0.64	13 ± 7
MEDULA OSEA 10 X	2.84 ± 0.58	30 ± 6
RIÑON 1 X	1.42 ± 0.56	15 ± 6
RINON 10 X	1.00 ± 0.64	10 ± 4
PULMON 1 X	1.00 ± 0.52	10 ± 3
PULMON 10 X	0.00 ± 0.00	0 ± 0
ALFA - 10 1 X	9.50 ± 0.44	100 ± 13

Los resultados anteriores confirman que bajo las condiciones de cultivo establecidas, el bazo es realmente el órgano productor del factor megacariopoyético.

El medio condicionado de riñón no presentó actividad estimulante, lo cual es importante, ya que éste es el órgano productor In vivo de la eritropoyetina y se ha reportado que dicha hormona estimula la trombopoyesis en condiciones de hipoxia tisular (99,100), lo que demuestra que la interacción de las líneas eritroide y megacariocítica a través de la eritropoyetina, parece

encontrarse en los niveles terminales de ambas líneas celulares. De esta manera, la acción de la eritropoyetina se relaciona más con la de la trombopoyetina o moléculas trombopoyéticas como la interleucina 6 -IL-6- que con la actividad del factor estimulante de colonias de megacariocitos (101, 102).

Esto es, el riñón produce trombopoyetina como lo reportó Mc Donald (29) y no factor estimulante de colonias de megacariocitos.

Es importante señalar que además del medio condicionado de bazo, el medio condicionado de médula ósea 10X presentó actividad estimulante baja. Esto sugiere que In vivo pudiera tratarse de un factor local de la médula ósea capaz de estimular a la célula precursora troncal mieloide, para comprometerla hacia la línea de los megacariocitos, todo ello regulado, por el microambiente de la misma, descrito por algunos autores como cooperatividad celular (103, 104).

También es posible que las colonias desarrolladas en cultivos estimulados con medio condicionado de médula ósea, sean debidas a estimulación de la interleucina 3 (producida en la médula ósea) sobre la células pluripotenciales mieloides (105).

Así el factor estimulante de colonias de megacariocitos parece estar relacionado con la interleucina 3, que tiene efecto estimulante multipotencial sobre la médula ósea y produce

elementos con diferentes estados de diferenciación en todas las líneas celulares mieloides (106).

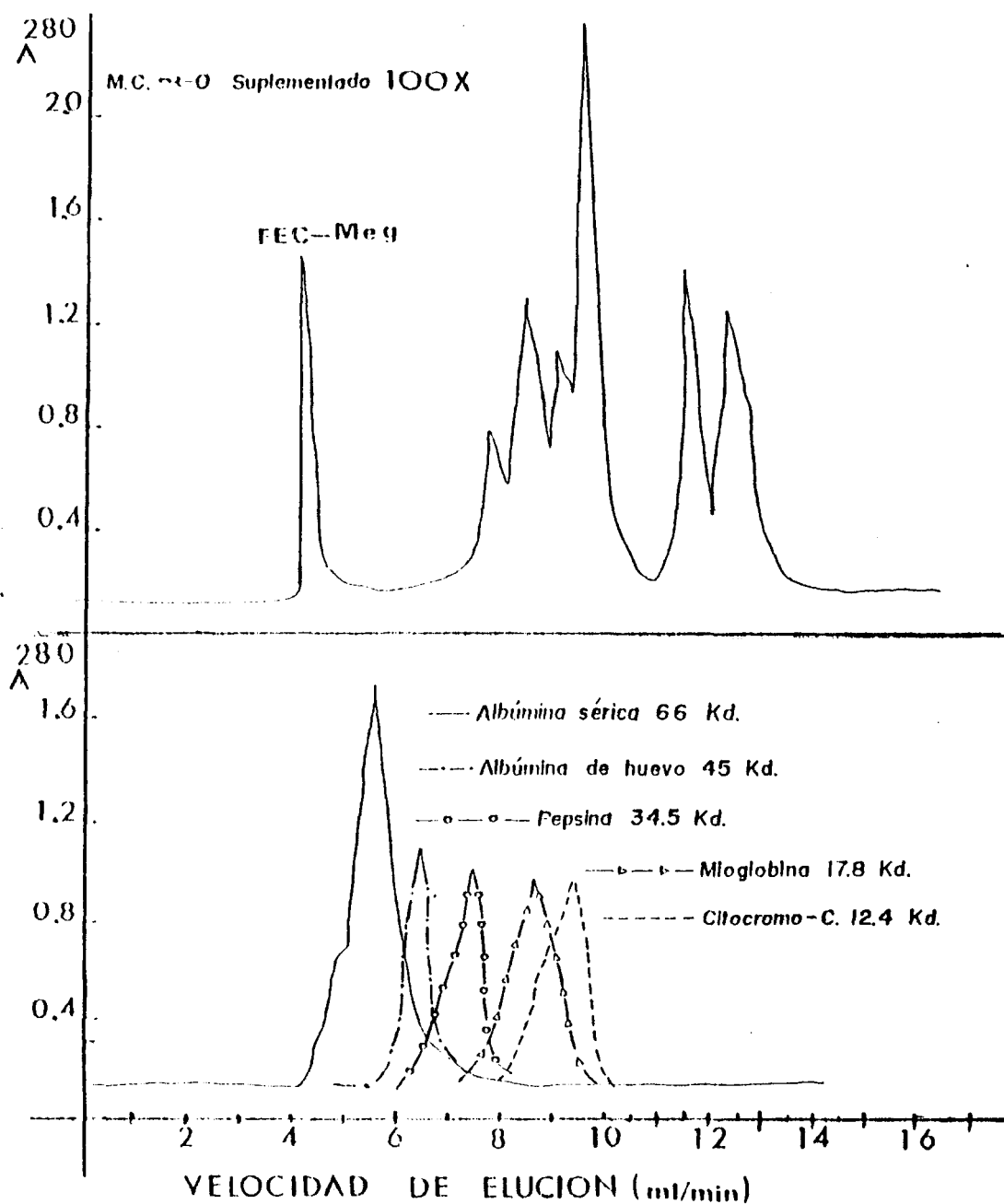
La falta de actividad estimulante del medio condicionado de pulmón, puede atribuirse a que dicho órgano requiere de mayor tiempo de incubación para la producción de factores hematopoyéticos además de la presencia de suero o plasma sanguíneo (107).

RESULTADO 3.13.0 : DETERMINACION DE LA MASA MOLECULAR DEL FACTOR MEGACARIOPOYETICO MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

Con el propósito de determinar la masa molecular del factor megacariopoyetico, se separó el medio condicionado de bazo por HPLC, también se corrieron algunos marcadores de masa molecular. Los resultados se muestran en siguiente gráfica.

GRAFICA 13.

DETERMINACION DE LA MASA MOLECULAR DEL FACTOR MEGACARIOPOYETICO POR CROMATOGRAFIA DE ALTA RESOLUCION - HPLC -



Con base en la velocidad de corrimiento y tiempo de elución de 3.8 minutos, puede decirse que el factor megacariopoyetico presenta mayor masa molecular que los marcadores empleados. En la gráfica anterior se observa que la albúmina de suero es eluída entre los 4 y 6 minutos de corrimiento sale después del factor estimulante, por lo que puede afirmarse que esta molécula tiene una masa molecular mayor a los 66 kd.

CONCLUSIONES

- Queda claramente demostrada la producción de un factor o actividad estimulante de colonias de megacariocitos en el medio condicionado de bazo preparado con diferentes formulaciones en ausencia de suero sanguíneo.
- El medio condicionado de bazo preparado con albúmina de suero y con transferrina humana, mostró capacidad estimulante superior y mayor reproducibilidad que el medio control preparado con suero de caballo al 10%.
- En forma análoga a lo demostrado por Wilbert e Iscove (62) para un factor eritropoyético, en el presente trabajo se demuestra que la albúmina de suero desempeña un papel importante como molécula estabilizadora del factor estimulante de colonias de megacariocitos protegiendo su actividad biológica.
- La insulina y la transferrina humana son componentes importantes del sistema de cultivo, más que por su capacidad enlazante y estabilizante del factor megacariopoyético por su efecto mitogénico sobre las células productoras de dicho factor.

- La actividad estimulante del medio condicionado libre de suero y complementado con 100 ug/ml de insulina, es menor que la del medio control. Al concentrarlo por ultrafiltración 10X su capacidad estimulante es similar a la del medio control.

- Debido a que el medio con insulina es un medio químicamente definido, facilita la detección del factor megacariopoyético producido en el cultivo y posibilita estandarizar su preparación.

- La presencia del factor megacariopoyético en el medio condicionado, los órganos productores y el tiempo óptimo de cosecha, pudieron ser demostrados mediante HPLC. Sin embargo bajo las condiciones experimentales, mediante esta técnica no se logró obtener fracciones con actividad estimulante.

- El tiempo óptimo de cosecha del medio condicionado para la producción del factor estimulante fue el día dos, siendo mayor la actividad que la de los medios de cultivo cosechados a los 3,5, 7 y 9 días, en este último se observa un repunte de la actividad megacariopoyética, indicando posiblemente un segundo ciclo de producción.

- En el sistema de cultivo establecido en este trabajo, el bazo fue el órgano productor in vitro del factor megacariopoyetico. El medio condicionado de médula ósea presentó menor actividad estimulante que el bazo, sólo después de concentrarlo 10X.

- Será necesario realizar los experimentos que conduzcan a conocer con claridad el papel desempeñado por la insulina en este sistema de cultivo.

- Tomando como base la formulación establecida para el medio condicionado preparado con 100 ug/ ml de insulina, se podrán desarrollar otras formulaciones que permitan la producción del factor estimulante y que le confieran alta capacidad estimulante sin que sea necesaria la concentración posterior.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Kanz, I., Lohr, G.W., and Fauser, A.A.: Human Megakaryocytic Progenitor Cells. *Klin Wochenschr* 65:297-307. 1987.
- 2.- Ihle, N.J., and Weinstein, Y. Immunological Regulation of Hematopoietic/ Lymphoid Stem Cell Differentiation by IL- 3. *Adv Immunol* 39: 1-47. 1986.
- 3.- Naughton, B.A., Naughton, K.G.: Hematopoiesis on Nylon Mesh Templates. Comparative Long-Term Bone Marrow Culture and the Influence of Stromal Support Cells. *Ann N.Y. Acad Sci.* 54: 125-140. 1989.
- 4.- Udomsakdi, C., Eaves, J.C., Sutherland, J.H., and Lansdorp.: Separation of Functionally Distinct Subpopulations of Primitive Human Hematopoietic Cells using Rhodamine - 123. *Exp Hematol* 19:338-342. 1991.
- 5.- Metcalf, D., McDonald, H.R., Odatchenko, N., and Sordat, B.: Growth of Mouse Megakaryocyte Colonies In vitro. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 72: 1744 - 1748. 1975.
- 6.- Nakeff, A., and Daniels-McQueen.: In vitro Colony Assay for a New Class of Megakaryocyte Precursor; Colony Forming Unit Megakaryocyte (CFU-M). *Proc Soc Exp Biol Med* 151: 587 - 592. 1976.

- 7.- Williams,N. and Jackson,H.: Regulation of the Proliferation of Murine Megakaryocyte Progenitor Cell by Cell Cycle. Blood 52: 163- 173 . 1978.
- 8.- Burstein. S.A., Adamson,W.J., Thrining,D., and Harker.L.A.: Characteristics of Murine Megakaryocyte Colonies In vitro. Blood 54 : 169 - 179. 1978.
- 9.- McLeod,D.L., Shreeve,M.M., and Axelrad,A.A. : Induction of Megakaryocyte Colonies with Platelet Formation In vitro. Nature. 261 : 492 - 493 . 1976.
- 10.- Mizoguchi,H., Kubota,K., Miura,Y., and Takaku,F.: An Improved Plasma Culture System for the Production of Megakaryocyte Colonies In vitro . Exp Hematol 7 :345 - 351. 1979.
- 11.- Vaincherker,W., Guichard,J., and Breton-Gorius,J.: Growth of Human Megakaryocyte Colonies in Culture from Fetal and Neonatal and Adult Peripheral Blood Cell. Ultrastructural Analysis. Blood Cells. 5 : 25 - 39. 1979.
- 12.- Fienendegen,L.E., Odartchenko,H., Cottier.H., and Bond.V.P.: Kinetics of Megakaryocyte Proliferation. Proc Soc Exp Biol Med 111: 177 - 182. 1962.

- 13.- Jackson,C.W.: Cholinesterase as a Possible Marker for Early Cells of the Megakaryocytic Series. Blood. 42: 413-421.1973.
- 14.-Gewirtz,M.A., Hoffman,R.: Human Megakaryocyte Production: Cell Biology and Clinical Considerations. Hematol Oncol Clin Nor Am 4: 43 -63. 1990.
- 15.- Behnke,O.: An Electron Microscope Study of the Megakaryocyte of the Rat Bone Marrow I. The development of the Demarcation Membrane System and the platelet Surface Coat. J Ultrastruc Res 24: 412 - 433. 1968.
- 16.- Paulus.J.M.: Etude Ultrastructurale et Microphotometrique de la Maturation Mègacaryocytaire. Exp Cell Res 53: 310-318. 1968.
- 17.- Mac Pherson.G.G.: Development of Megakaryocytes in Bone Marrow of the Rat.: An Analysis by Electron Microscopy and High Resolution Autoradiography. Proc R Soc Lond (Biol) 177: 265 - 274. 1971.
- 18.- Vinci. G., Tabilio,A., Deschamps,J.F., van Haecke D., Henri,A.,Guichard,J., Tetteroo,P., Lansdorp,P.M. Hercend,T., Vainchenker,W.,and Breton-Gorius,J.: Immunological Study of *in vitro* Maturation of Human Megakaryocytes. Br J Haematol 56 : 589 -605.1984.

- 19.- Straneva,E.J.,Goheen,P.M.,Hui.L.S., Bruno,E., and Hoffman,R.
Terminal Cytoplasmic Maturation of Human Megakaryocytes in
vitro. Exp Hematol 14: 919 - 929. 1986.
- 20.- Tavassoli,M.:Platelet Production and Release. In Tavassoli,
M.,and Yoffey, M.J. Eds. Bone Marrow Structure and Function.
Alan R Liss, Inc, N.Y. 193 - 206. 1983.
- 21.- Tomer, A., Harker,A.L., Burstein.A.S. Flow Cytometric Analy-
sis of Normal Human Megakaryocytes. Blood 71: 1244 - 1252.
1988.
- 22.- Thiele, J., Wagner,S., Dienemann,D., Wienhold, S., Fischer,
R., Stein,H.: Megakaryocyte Precursors (Promegakaryoblasts
and Megakaryoblasts) in the Normal Human Bone Marrow. Anal
Quant Cytol Histol 12: 285 - 289. 1990.
- 23.- Jackson.C.W. Steward,S.A., Chenaille,J.P., Ashmun, R.A. and
McDonald ,T.P. An Analysis of Megakaryocytopoiesis in the
C3H Mouse: An Animal Model Whose Megakaryocytes Have 32N as
the Modal DNA Class. Blood 76: 690 - 696. 1990.
- 24.- Slater,D.N., Trowbridge.E.A.,and Martin.J.F.: The megakaryo-
cyte in Thrombocytopenias: A Microscopic Study wich Sup-
ports the Theory that the Platelet are Produced in the
Pulmonary Circulation. Thrombosis Res 31: 163 - 176. 1983.

- 25.- Harker,L.A. Control of Platelet Production. Ann Rev Med 25: 383 - 387. 1974.
- 26.- Williams,N., McDonald,T., and Rabellino,E.: Maturation and Regulation of Megakaryocytopoiesis. Blood Cells 5: 43-55. 1979.
- 27.- Hoffman,R., Mazur,E., Bruno,E., and Floyd,V. Assay of an Activity in the Serum of Patients with Disorders of Thrombopoiesis that Stimulates Formation of Megakaryocytic Colonies. N Eng J Med 305: 533 - 538. 1981.
- 28.- Stoll, D., Cines,B.C., Aster,R.H., and Murphy,S.: Platelet Kinetics in Patients with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura and Moderate Thrombocytopenia. Blood 65: 584 - 588. 1985.
- 29.- McDonald,T.P.: Thrombopoietin and Its Control of Thrombocytopoiesis and Megakaryocytopoiesis. In Evatt.,Levine., and Williams Eds. N.Y. - Elsevier. 39 - 57. 1981.
- 30.- Ebbe,., Yee,T., Carpenter,D.: Megakaryocyte Increase in Size, within Ploidy Groups in Response to the Stimulus of Thrombocytopenia. Exp Hematol 16: 55 - 59. 1988.

- 31.- Penington,D.G., Lee,N.L.Y., Roxburgh , A.E.,and McGready, J.R.: Platelet Density and Size: the Interpretation of Heterogeneity. Br J Haematol 34: 365 - 370. 1976.
- 32.- Levin,J., Levin,F.C., Hull,D.F. III., and Penington,D.G.: The Effects of Thrombopoietin on Megakaryocyte - CFC, Megakaryocytes, and Thrombopoiesis: with Studies of Ploidy and Platelets Size. Blood 60: 989 - 992. 1982.
- 33.- Trowbridge, E.A., Martin,J.F.: An Analysis of the Platelet and Polyploid Megakaryocyte Response to Acute Thrombocytopenia and its Biological Implications. Clin Phys Physiol Meas 5: 263 - 267. 1984.
- 34.- Cullen,W.C., McDonald,T.P.: A Comparison of Stereologic Techniques for the Quantification of Megakaryocyte Size and Number. Exp Hematol 14: 782 - 789. 1986.
- 35.- Corash,L., Chen,H.Y., Levin,J., Baker,G.,L.H., Mok,Y.: Regulation of Thrombopoiesis: Effects of the Degree of Thrombocytopenia on Megakaryocyte Ploidy and Platelet Volume. Blood 70 : 1771 - 182. 1987.
- 36.- Corash,L.: The Relationship between Megakaryocyte Ploidy and Platelet Volume. Blood Cells 15: 81 - 84. 1989.

- 37.- Odell Jr, T.Y., McDonald, T.P., and Petwiler, T.C.: Stimulation of Platelet Production by Serum of Platelet Depleted Rats. Proc Soc Exp Biol Med 108: 428 - 236. 1961.
- 38.- Specto, B.: In vivo Transfer of a Thrombopoietic Factor. Proc Soc Exp Biol Med 108: 146 - 152. 1961.
- 39.- Shreiner, D.P., and Levinn, J.: Detection of Thrombopoietic Activity in Plasma by Stimulation of Suppressed Thrombopoiesis. J Clin Invest 49: 1709 - 1713. 1970.
- 40.- Cooper, G.W., Cooper, B., and Chang, C.: Demonstration of a Circulating Factor Regulating Blood Platelet Production Using S- sulfate in Rats and Mice. Proc Soc Exp Biol Med 134: 1123-1128. 1970.
- 41.- Dassin, J.E., Boerebia, J., and Nejean, Y.: Use of ⁷⁵Se-Methionine as a Tracer of Thrombocytopoiesis. Biochem Biophys Res Comm 91: 332 - 337. 1979.
- 42.- Ishibasi, T., Kimura, H., Shikama, Y., Uchida, T., Kariyone, S., Hirano, T., Kishimoto, T., Takatsuky, F., and Akiyama, Y. Interleukin - 6 is a Potent Thrombopoietic Factor *in vivo* in Mice. Blood 74: 1241 - 1247. 1989.

- 43.- Weiner, M., and Karparkin, S.: Use of the Megathrombocyte to Demonstrate Thrombopoietin. *Throm Diathe Haemorrh* 28: 24 - 30. 1972.
- 44.- McDonald, T.P. Neutralizing Antiserum to Thrombopoietin. *Proc Soc Exp Biol Med* 158: 557 - 562. 1978.
- 45.- Evatt, L.B., Kellar, L.K., and Ramsey, B.R.: Thrombopoietin Past, Present and Future. In Levine, R., Williams, N., Levine, J., and Evatt, B.: *Megakaryocyte Development and Function*. Alan R. Liss, Inc. 143 - 155. 1986.
- 46.- McDonald, T. P. Current Status of Thrombopoietin. In Tavasoli, M., Zanjani, D.E., Ascensao, I.J., Abraham, G.N., and Levine, S.L.: *Molecular Biology of Hemopoiesis*. Plenum Publishing Corporation 1988. 243 - 253.
- 47.- Burgess, W.A., Metcalf, D., Russell, H.M.S., and Nicola, A.N.: Granulocyte / Macrophage, Megakaryocyte, Eosinophil and Erythroid Colony-Stimulating Factors Produced by Mouse Spleen Cells. *Biochem J* 185: 301-314. 1980.
- 48.--Nakeff, A.: Examination of Culture Conditions for Optimizing the Growth of Megakaryocyte Colonies. In Evatt., Levine., and Williams. Eds. *Megakaryocyte Biology and Precursors In vitro Cloning and Cellular Properties*. Elsevier-N.Y. 111 - 125. 1981.

- 49.- Murphy Jr, J.M.: Megakaryocyte Colony-Stimulating Factor and Thrombopoiesis. *Hematol Oncol Clin N Am* 3: 465 - 478. 1989.
- 50.- Mergenthaler, G.H., Dörmer, P.: Hemopoiesis in Human Micro Long-Term Bone Marrow Culture with Preformed Extracellular Matrix. *Haematologica* 75: 12 - 16. 1990.
- 51.- Takayuki, A., Tsuyuoka, R., Ueda, Y., Suzuki, A., Ichiba, S., Okuno, Y., Nakamura, K., and Imura, H.: Megakaryocyte Potentiating -Activity of IL-1, IL-6 and GM-CSF as Evaluated by Their Action on *in vitro* Human Megakaryocytic Colonies. *Br J Haematol* 78: 480 - 487. 1991.
- 52.- Debili, N., Hegyi, E., Navarro, S., Katz, A., Mouthon, M.A., Breton-Gorius, J., and Vainchenker, W.: *In vitro* Effects of Hematopoietic Growth Factors on the Proliferation, Endoreplication, and Maturation of Human Megakaryocytes. *Blood* 77: 2326 - 2338. 1991.
- 53.- Williams, N., Jackson, H., Sheridan, A.P.C., Murphy, Jr J.M., Elste, A., and Moor, A.S.M. Regulation of Megakaryopoiesis in Long-Term Murine Bone Marrow Cultures. *Blood* 51: 245 - 255. 1979.
- 54.- Vainchenker, M.J., Bouuet, J., Guichard, J., and Breton-Gorius,

- J.: Megakaryocyte Colony Formation from Human Bone Marrow Precursor. *Blood* 54: 940 - 947. 1979a.
- 55.- Rabellino, E.M., Nachman, R.L., Williams, N., Winchester, R.J., and Ross, G.D.: Human Megakaryocytes I. Characterization of the Membrane and Cytoplasmic Components of Isolated Marrow Megakaryocytes. *J Exp Med* 149: 1273- 1287. 1979.
- 56.- Rabellino, E. M., Levene, R. B., and Nachman, R.L.: Human Megakaryocytes III. Characterization in Myeloproliferative Disorders. *Blood*. 63: 615 -622. 1984.
- 57.- Geissler, D., Konwalinka, G., Peschel, C., Grünwald K., Odavic, R., and Brunsteiner, H.: A Regulatory Role of Activated T-Lymphocytes on Human Megakaryocytopoiesis *in vitro*. *Br J Haematol* 60: 233 - 238. 1985.
- 58.- Mazur, E.M.: Megakaryocytopoiesis and Platelet Production. A Review. *Exp Hematol* 15: 340 - 348. 1987.
- 59.- McDonald, T.P.: Regulation of Megakaryocytopoiesis by Thrombopoietin. *Ann N.Y. Acad Sci* 509: 1 - 29. 1987.
- 60.- McDonald, T.P., and Jackson, C.W.: Thrombopoietin Derived from Human Embryonic Kidney Cells Stimulates an Increase in DNA Content of Murine Megakaryocytes *in vivo*. *Exp Hematol*

18: 758 - 763. 1990.

- 61.- Brook,R.R.:Growth Regulation In Vitro and the Role of Serum.
In Allison, A.C. and Funcan ,C.Eds. New York.Plenum. 1 - 35.
1975.
- 62.- Sato, G. The Role of Serum in Cell Culture. In Litwack,G.Ed.
Biochemical Actions of Hormones N.Y. Acad 3: 391- 396.1975.
- 63.- Rizzino, A., Rizzino,H., Sato,G.: Defined Media and the
Determination of Nutritional and Hormonal Requirements of
Mammalian Cells in Culture. Nutr Rev 37: 369 - 378. 1979.
- 64.- Shirpley, G.D., and Ham,R.G.: Improved Medium and Culture
Conditions for Clonal Growth with Minimal Serum Protein and
for Serum-free Survival of Swiss 3t3 Cell. In vitro 17: 656
- 670. 1981.
- 65.- Waymouth,C.:Preparation and Use of Serum-free Culture Media.
In Barnes,W.D., Sirbasku,A.D., and Sato,H.G. Eds. Methods
for Preparation of Media Supplements, and Substrate for
Serum-free Animal Cell Culture. Alan R. Liss. Inc. 23 - 68.
1984.

- 66.- Yang,J.,Balakrishnan,A.,Hamamoto,S., Elias,J.J., Resenau,W., Beattie,W.C., Das Gupta,,K.T., Wellings,R.S., and Nandi,S.: Human Breast Epithelial Cells in Serum-free Collagen Gel Primary Culture:Growth, Morphological, and Immunocytochemical Analysis. J Cell Physiol 133: 228 - 234. 1987.
- 67.- Wallace,L.,Keehan,M.,Barnes,D.,Reid,L.,Stanbridge,E.,Murakami,H.,and Sayo,H.G.: Frontiers in Mammalian Cell Culture.In vitro Cell Dev Biol 26: 9 - 23. 1990.
- 68.- Guilbert,L.J., and Iscove,N,N.: Partial Replacement of Serum by Selenite,Transferrin, Albumin and Lecithin in Haemopoietic Cell Cultures. Nature. 263: 594 - 59. 1976.
- 69.- Metcalf,D.,and Johnson,L.: Production by Spleen and Lymphoid Node Cell of Conditioned Medium with Erythroid and Other Hemopoietic Colony-Stimulating Activity. J Cell Physiol 96: 31 -38. 1978.
- 70.- Iscove,N.N., Roitsch,C.A., Williams,N., and Guilbert,L.J.: Molecules Stimulating Early Red Cell,Granulocyte,Macrophage, and Megakaryocyte Precursors in Culture: Similarity in Size, Hydrophobicity, and Charge. J Cell Physiol Suppl 1: 65-78. 1982.

- 71.- Tayrien , G., and Rosenberg,R.D. Purification and Properties of a Megakaryocyte Stimulating Factor Present both in the Serum-free Conditioned Medium of Human Embryonic Kidney Cells and in Thrombocytopenic Plasma. J Biol Chem 262: 3262 - 3267. 1987.
- 72.- McDonald, T.P.: Thrombopoietin: Its Biology, Purification, and Characterization. Exp Hematol 16: 201- 205. 1988.
- 73.- Murphy Jr, J.M.: Blood Cell Growth Factors: Their Biology and Clinical Applications . Int J Cell Clon 8: 138 - 145. 1990.
- 74.- Stanley,E.R., Guilbert,L.J., Tushinski,R.Dj. A Mononuclear Phagocyte Lineage Specific Hemopoietic Growth Factor. J Cell Biochem 21 : 151 - 157. 1983.
- 75.- Lowry,H.O., Rosenbrough,J., Lewis,F.A., and Randall,J.R.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J Biol Chem 193: 265 - 275. 1951.
- 76.- Garvey,S.J., Cremmer,E.N., and Sussdorf,D.: Methods in Immunology. Third Edition. W.A. Benjamin, Inc. 1977. 95 -

- 77.- Hudson,L.,and Hay,C.F.: Practical Immunology Second Edition
1980. Blackwell Scientific Publications 1980. 156 - 157.
- 78.- Downie,N.M. y Heath,R.W. Métodos Estadísticos Aplicados.
Tercera Edición 1973. Harla. Harper and Row Latinoamericana
182-203.
- 79.- Evatt,L.V., Sheiner,P.D., and Levin,J.: Thrombopoietic
Activity of Fractions of Rabbit Plasma: Studies in Rabbits
and in Mice. J Lab Med 83: 364-371. 1974.
- 80.- Darcel,Le Q.C.: On the Heterogeneity of Serum Albumin. Int J
Biochem 19: 295 - 301. 1987.
- 81.- Cohn,E.J., Strong,E.L., Hughes Jr, W.L., Mulford,D.J.,
Ashworth, J.N., Melin,N., and Taylor,H.L.: Preparation and
Properties of Serum and Plasma Proteins. IV. A System for
the Separation into Fractions of the Protein and Lipopro-
tein Components of Biological Tissues and Fluids. JACS 68:
459 - 474. 1946.
- 82.- Iscove,N.N.: Culture of Lymphocytes and Hemopoietic Cells in
Serum-free Medium. In Methods for Serum-free Cultured of
Neuronal and Lymphoid cells. Alan.R.Liss. Inc. 1984. 169 -
185.

- 83.- Gorinsky,B.: Transferrin, Structure and Function. Advances in Red Cell Biology. Weatherall,D.J. Editor. Raven Press. New York. 1982. 7-17.
- 84.- Anderson,W.L., Chase,G., and Thomas,Jr.T.B.: Transferrin Support of Stimulated Lymphocytes. *In vitro* 18 (9); 766 - 774. 1982.
- 85.- Jarett,L., Kiechle,L.S., Macaulay, L., Parker,C.J., and Kelly,L.K.: Intracellular Mediators of Insulin Action. In Czech,P.M. Ed. Molecular Basis of Insulin Action. Plenum Press 1985. 183 - 198.
- 86.- Hayashi,I., Larner,J., and Sato,G.: Hormonal Growth Control of Cell in Culture. *In vitro* 14: 23 - 30. 1978.
- 87.- Laron, Zvi. Somatomedin, Insulin, Growth Hormone and Growth. *Israel J Med Sci* 18: 823 -829. 1982.
- 88.- Pringault,E., Plas,C., Desbusquois,B., Clauser,H.: Reutilization of Insulin Receptor and Hormonal Response in Cultured Foetal Hepatocytes: the Effects of Chloroquine and Vinblastine. *Biol Cell* 52: 13 - 22. 1985.
- 89.- Heidenreich,A.K., and Olefsky,M.J.: The Metabolism of Insulin Receptors: Internalization, Degradation and Recycling.

In Czech, P.Mp. Ed. Molecular Basis of Insulin Action.
Plenum Press. 1985. 45 - 65.

- 90.- Sonne,O., and Glieman,J. : Insulin receptors, insulin degradation , and Biological Activity. In Chemistry, Structure and Function of Insulin and Related Hormones. Branderburg, D., and Wollmer A. Eds. Walter de Gruyter & Co. pag. 263-270. 1980.
- 91.- Terris,S and Steiner,D.F.: Insulin-receptor Turnover and Down Regulation. In Chemistry, Structure and Function of Insulin and Related Hormones. Branderburg,D., and Wollmer, A. Eds. Walter de Gruyter & Co. pag. 277-284.1980.
- 92.- Jacobs,S., Immunochemical Characterization of Receptors for Insulin and Insulinlike Growth Factor-1. In Czech, P.M.Ed. Molecular Basis of Insulin Action. Plenum Press 1985.31-43.
- 93.- Goldfine,I.D.: The Insuline Receptor: Molecular Biology and Transmembrane Signalling. Endocrine Rev 8: 235 - 239. 1987.
- 94.- Saltiel,A.R.,Osterman,D.G.,and Darnell,J.C.: Role of Glycyl Phosphoinositides in Insulin Action. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology LIII. 1988. 955 - 963.

- 95.- Messina, L.J.: Insulin and Dexamethasone Regulation of a Rat Hepatoma Messenger Ribonucleic Acid: Insulin has a Transcriptional and Posttranscriptional Effect. *Endocrinol* 124:754 - 761. 1989.
- 96.- Watanabe, Y., Kawada, M., and Kobayashi, B.: Effect of Insulin on Murine Megakaryocytopoiesis in a Liquid Culture System. *Cell Struct Funct* 12: 312 - 316. 1987.
- 97.- Fibbe, E.W., Schaafsma, R., Falkenburg, J.H.F., and Willemze, R. : The Biological Activities of Interleukin-1. *Blut* 59 : 147 - 156. 1989.
- 98.- Odell Jr., T.T., Murphy, J.R., and Jackson, C.W.: Stimulation of megakaryocytopoiesis by Acute Thrombocytopenia in Rats. *Blood* 48: 765 - 775. 1976.
- 99.- Shreiner, P.D., and Levin, J.: The Effect Of Hemorrhage, Hypoxia, and a Preparation of Erythropoietin on Thrombopoiesis. *J Lab Clin Med* 88: 930 - 940. 1976.
- 100.- Cullen, C.W., and McDonald, T. P.: Effects of Isobaric Hypoxia on Murine Medullary and Splenic Megakaryocytopoiesis. *Exp Hematol* 17: 246 - 251. 1989.

- 101.- Rolovic,Z., Basara,N., Biljanovic,L., Stojanovic,N., Su-
vajdzic ,N., and Pavlovic - Kentera,V.: Megakaryocytopoiesis
in Experimentally Induced Chronic Normobaric Hypoxia. Exp
Hematol 18: 190 - 194. 1990.
- 102.- McDonald , T.P., Cottrell,B.M., Clift,E.R., Cullen,W.C.,
and Lin, F.K.: High Doses of Recombinant Erythropoietin
Stimulate Platelet Production in Mice.Exp Hematol 15: 719 -
721. 1987.
- 103.- McDonald, T.P., Cottrell,B.M., Swearingen,J.C.,and Clift,
E.R.: Comparative Effects of Thrombopoietin and Interleukin
- 6 on Murine Megakaryocytopoiesis and Platelet Production.
Blood 77: 735 - 740. 1991.
- 104.- Gillis, S.: T-Cell-Derived Lymphokines . In William,E.P:
Fundamental Immunology Second Edition.Raven Press Ltd. 1989.
621 -638.
- 105.- Michon, J., Fridman, H.W.: Pathophysiology o f Cytokines.
Leuk Res 14: 675 - 677. 1990.
- 106.- Bruno,E., Cooper,R.J., Briddell,R.A., Hoffman,R.: Further
Examination of the Effects of Recombinant Cytokines on the
Proliferation of Human Megakaryocyte Progenitor Cells. Blood
77: 2339 -2346.1991.

107.- Yamamoto,R.,Lin,S.L.,Lowe,R., Warren,M.K., and White,J.T.:
The Human Lung Fibroblast Cell Line, MRC-5, Produces Multi-
ple Factors Involved with Megakaryocytopoiesis. J Immunol
144: 1808 - 1816. 1990

AGRADECIMIENTOS:

AL DR. ALXANDER NAKEFF POR SUS VALIOSAS ENSEÑANZAS Y EL APOYO OTORGADO PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

SRA. CINTHIA NETTROUR POR SUS ENSEÑANZAS EN EL CULTIVO DE TEJIDOS.

AL DR. GIOVANNI SANTELLI POR SU ASESORIA EN LA DE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

A MIS DEMAS COMPAÑEROS DE BIOLOGIA DEL CANCER, QUE DE UNA FORMA U OTRA FACILITARON EL DESARROLLO DE MI TRABAJO.

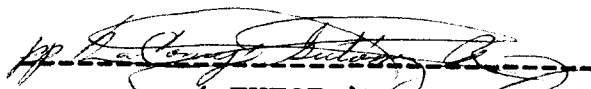
AL DR. MIGUEL BETANCOURT POR SU DESINTERESADA PARTICIPACION EN LA REVISION DE LA TESIS.

A LA DRA. BEATRIZ MEDINA DE THIELE POR SUS ACERTADAS OBSERVACIONES QUE SIRVIERON PARA MEJORAR LA PRESENTACION DEL TRABAJO.

AL DR. JOAQUIN CARILLO POR LA REVISION DE LA TESIS.

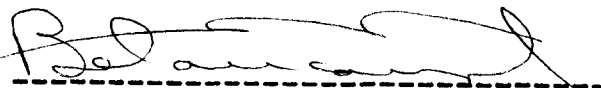
El Jurado designado por el Comité de la Maestría en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, aprobó esta tesis el día 30 de junio de 1992.

DR. ALEXANDER NAKEFF PLATT



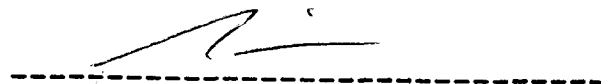
(TUTOR)

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE



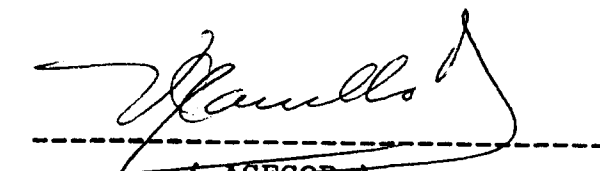
(ASESOR)

DRA. BEATRIZ MEDINA DE THIELE



(ASESORA)

DR. JOAQUIN CARRILLO FARGA



(ASESOR)