

Anàlisi quantitativa i qualitativa del contingut proteic al llarg de l'eix anteroposterior de la planària *Dugesia (G) tigrina*.

J. Collet i J. Baguñà.

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal, 645. 08028 Barcelona.

Abstract.

Quantitative and qualitative pattern of proteins along the anteroposterior axis of the planarian *Dugesia (G) tigrina*.

The uptake and incorporation of ^{14}C -labelled amino acids as related to anteroposterior body levels have been studied in the planarian *Dugesia (G) tigrina*. The results show the existence of an antero-posterior gradient of uptake and incorporation with maximal levels in the cephalic region.

The incorporation of ^3H -Leucine into protein in different regions along the antero-posterior body axis of the planarian *Dugesia (S) polychroa* showed too a similar pattern, with differentiated cell types having higher values than undifferentiated cells (neoblasts). These results are discussed in connection with Child's hypothesis (1941) of physiological gradients to explain intercellular coordination.

The analysis of the pattern of proteins in different body regions by two dimensional electrophoresis (NEPHGE/IEF + PAGE) show that differences are mainly quantitative. Qualitative changes are rarely observed, mainly in the pharynx. Both changes, qualitative and quantitative, could be useful to pinpoint specific markers of different regions and follow their appearance during regeneration.

Introducció

El fenomen de diferenciació seqüencial al llarg de l'eix anteroposterior és un fet tan pels primers estadis del desenvolupament com per la regeneració. Planària, donada llur gran capacitat regenerativa adhuc a

a partir de petits fragments de la seva massa corporal, ha sigut un model ampliat utilitzat per estudiar la polaritat que porta implícit tot fenomen de regeneració.

Encara que els aspectes morfològic-cel·lulars de l'establiment de la polaritat durant la regeneració han estat ben establerts (Brønsted, 1969), els aspectes bioquímics i, encara en molt meyns grau, moleculars no han estat aprofundits. El següent treball està concentrat en l'estudi descriptiu de les diferències a nivell bioquímic (proteic, en concret) al llarg de tot el cos de la planària Dugesia tigrina. Les raons que ens han portat a fer aquest han estat diverses.

La primera està relacionada amb el concepte de gradient desenvolupat per Child (1941) que va postular l'existència d'una regió fisiològicament més activa que impediria duplicacions d'aquesta en altres de contigües. A més, continuava, aquesta propietat dominant no ha d'ésser local sino distribuïda com una variable contínua al llarg d'eixos definits i que el pic de la distribució coincidiria amb la regió dominant. Flickinger (1959) demostrà a D. dorotocephala l'existència d'un gradient anteroposterior de síntesi de ADN, ARN i proteïnes que mostrava una relació causal amb la determinació i el manteniment de la polaritat axial durant la regeneració (Coward i Flickinger, 1962). Per contra, Calow i Read (1981) treballant en espècies sexuades van trobar que no hi havia cap mena de gradient ni en l'entrada dels aminoàcids del medi ni en la incorporació a proteïnes, però s'ha d'esmentar que aquest patró podria estar enmascarat per una intensa activitat gonadal. L'anàlisi de l'entrada d'aminoàcids i llur incorporació a la fracció proteica al llarg de l'eix A-P de Dugesia (G) tigrina (espècie asexual) pot aportar l'allum necessària per aclarir aquest punt. Adicionalment, l'anàlisi de quins tipus cel·lulars són els responsables d'aquest gradient, en cas d'existir, pot ser una informació de gran vàlua.

Un altre objecte bàsic plantejat era estudiar les diferències dels patrons proteics entre les diferents regions. Aquests polipèptids específics ens podrien servir com a marcadors per estudis de regeneració (tan "in vivo" com "in vitro") per tal de quantificar la diferenciació i confirmar la identificació de les regions regenerades feta histològicament.

Finalment, un altre objecte, encara que molt més problemàtic, era correlacionar canvis bioquímics graduals i axials a còdis posicionals que podrien explicar la formació del patró durant la regeneració.

Els resultats presentats ens permeten respondre acceptablement els dos primers punts, però ni de bon tros el darrer.

Material i mètodes:

Les planàries, Dugesia (G) tigrina, eren mantingudes a 12°C en solució salina en el laboratori i es deixaven uns 10 dies en dejuni abans d'ésser utilitzades per tal d'evitar la contaminació del menjar no digerit que encara restaria en l'intestí.

Entrada d'aminoàcids i incorporació a proteïnes:

Grups de 10 planàries (d'uns 10mm de llargada) eren incubades durant 24h. a 12°C en un medi salí amb gentamicina (5 µg/ml., Sigma) en presència de, o bé, 2.5 µCi/ml. de ¹⁴C-hidrolisat proteic d'algues (act. esp. 57mCi/milliatom carbon, Amersham), o bé, 2.5 µCi/ml de ¹⁴C-Lisina (act. esp. 22Ci/mmol, Amersham). La gentamicina no afecta per res ni l'entrada ni la incorporació (dades no mostrades) però era una mesura contra una possible contaminació microbiana.

A l'acabar la incubació es netejaven i tallaven en 5 trossos i faringe (com està indicat en la fig 1) i es sonicaven en TITX (50mM tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.02% azida sódica, 0.05% tritó X100 i 5mM sulfat de benzamidina) en fred. Quantitats iguals de proteïna (calculada a partir d'una alíquota per Bio-Rad Assay Protein (Bio-Rad Lab.)) es precipitaven amb 10% TCA (àcid tricloroacètic). La radioactivitat associada tan al sobrenadant (fracció TCA soluble) com al pellet (fracció TCA insoluble) es determinava per espectrometria de centelleig.

Ja que la informació desitjada era descriure el patró relatiu de l'entrada d'aminoàcids i de la incorporació i no les activitats específiques absolutes (que, per altre costat, estan fora de sentit donat que, com indica Stephens (1964), l'entrada de material orgànic dissolt en el medi ocorre de forma poc ostensible en els invertebrats inferiors per el que els invalida per fer estudis cinètics), les dades d'entrada i d'incorporació de cada regió (dpm/µg prot.) eren corregides per l'activitat específica mitjana de tot l'animal (dpm/µg prot.). D'aquesta manera s'evita la variabilitat originada pels diferents radioisòtops i grups de planàries utilitzats.

Autorradiografia de macerats cel·lulars de diferents regions:

S'utilitzà una altre espècie, Dugesia polychroa. Animals de uns 10mm de llargada s'incubaren en presència de 50 µCi/ml. L-4-5 ³H-Leucina (act. esp. 25 Ci/mmol, Amersham) durant 8h. a 17°C. A partir de macerats de les diferents regions distribuïdes axialment (cap, prefaringea, faringea meyns faringe, postfaringea i cua) i per la tècnica de "dipping", seguint el protocol descrit per Baguñà (1973), es calculà la incorporació de leucina tritiada a proteïna en funció del nº de grans/cèl.lula.

Preparació de la mostra i isoelectroenfoc (IEF):

Les mostres de cada una de les regions eren preparades, separades i tenyides en Coomassie Blue com descriuen Karlsson i col (1973). S'aplicaren 200 µg de proteïna/pista.

Preparació de la mostra i electroforèsi SDS (SDS-PAGE):

Regions equivalents provingents de 10 animals diferents de 10mm eren juntades i el seu contingut proteic extret segons Kessler (1981). S'aplicà uns 200 µg/pista i la separació es feu en gels de 13.5% d'acrilamida-SDS com descriu Laemmli (1970). Es tenyiren amb Coomassie blue.

Preparació de la mostra i electroforesi bidimensional (2D-NEPHGE/IEF-PAGE):

La fracció proteica de les regions i faringe era solubilitzada d'acord a Tracy i Young (1984). La separació dels polipèptids bàsics (NEPHGE) o àcids (IEF) i pels diferents pesos moleculars (13.5% acrilamida PAGE) era feta essencialment com introduí O'Farrell (1975) modificada posteriorment per Bravo (1984). Els polipèptids eren revelats per la tinció d'Ag (Wray i al. (1981) amb petites modificacions: després de la fixació amb metanol (50%)/acetic (10%) es fa una fixació sequndària, amb l'objecte d'augmentar la sensibilitat amb gluteraldehid (10%) 30'; l'excés de gluteraldehid era eliminat amb un rentat exhaustiu de H₂O.

En molts casos els patrons electroforètics no es superposaven completament degut a lleugeres però incontrolables variacions durant la separació proteica. Per tant, estem obligats a pendre rigorosos criteris per la comparació dels gels. Cada gel era, primer orientat respecte a algunes proteïnes més importants que estan present en totes les regions. Després, per evitar canvis deguts a l'extracció proteica es corrien mostres de diferents extraccions. Aleshores qualsevol canvi en el patró era considerat significatiu si era reproduïble en varis gels d'una mateixa regió però a partir de diverses extraccions.

Resultats:

Entrada d'aminoàcids i síntesi proteica al llarg de l'eix A-P:

Els resultats obtinguts emprant un sol aminoàcid (lisina) no diferien significativament dels que utilitzaven tota una barreja d'ells (hidrolisat proteic) (dades no mostrades). Els resultats de 7 proves en total (3 per la lisina i 4 per la barreja d' aminoàcids) es mostren en la fig.1. Hi ha el màxim tan en la fracció soluble com en la TCA insoluble a la regió cefàlica i el mínim a la central (prefaringea). L'alta taxa d'incorporació cefàlica ha d'ésser explicada per un increment en la síntesi proteica de la regió i no per l'existència d'un "pool" intracelular d'aminoàcids més gran. En la

fig. 1b es pot observar que la radioactivitat associada a proteïnes respecte aquella al "pool" intracel.lular en la regió cefàlica és significativament superior al reste de les altres parts del cos.

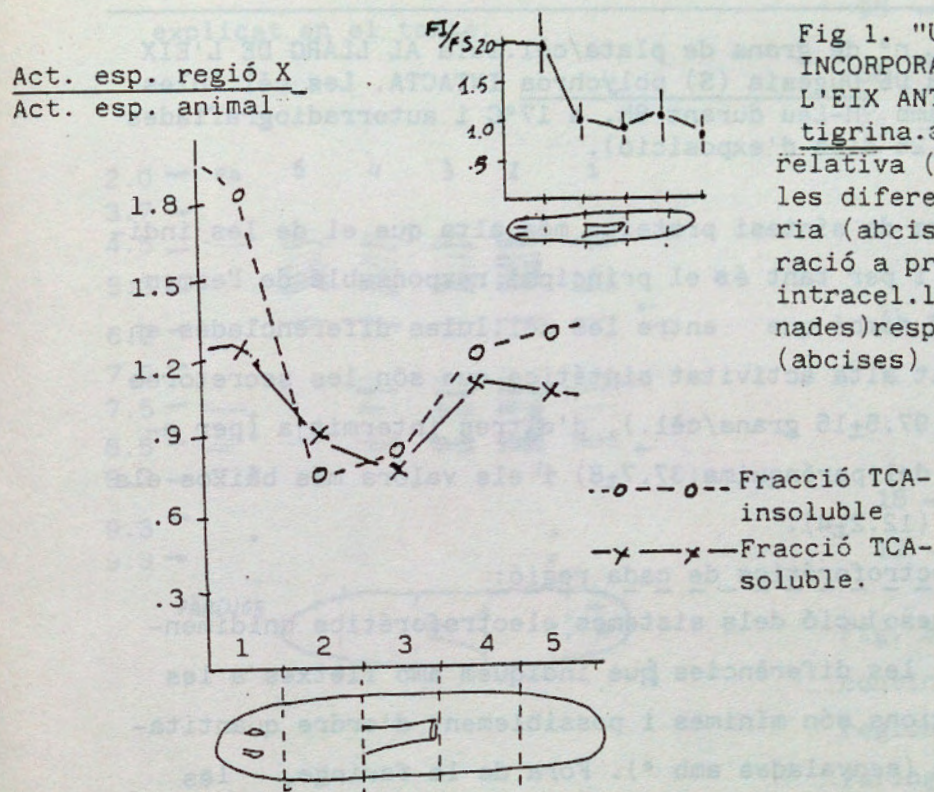


Fig 1. "UPTAKE" DE ^{14}C -AMINOACIDS I INCORPORACIO A PROTEINES AL LLARG DE L'EIX ANTERO-POSTERIOR DE *Dugesia tigrina*. a) entrada i incorporació relativa (eix de les ordenades) en les diferents regions de la planària (abcises). b) taxa d'incorporació a proteïnes referit al pool intracel.lular d'aminoàcids (ordenades) respecte al llarg de l'animal (abcises)

Per veure quin paper pot tenir la faringe en l'entrada i conseqüentment en la incorporació a proteïnes dels aminoàcids del medi, es comparà llur activitat específica a la de la mitjana del reste del cos. Sobre tot en l'entrada (4.26 ± 1.5) però també en la incorporació (1.48 ± 0.3) s'observa que la faringe és un lloc d'entrada i incorporació diferencial (cal fer esment que la faringe és un òrgan ric em cèl.lules plenes de grànuls de secreció). Mal grat aquestes activitats específiques altes, la quantitat d'aminoàcids que entren per la faringe respecte al total (4.5%) deu ser poc important per l'animal i per tant no creiem que afecti de forma substancial a la síntesi proteïca de les diferents regions. Aixó està d'acord amb en Calow i Read (1981) que no observen diferències significatives ni en l'entrada ni en la incorporació a proteïna entre planàries sense faringe i normals.

Incorporació als diferents tipus cel.lulars en l'eix A-P:

Els resultats autoradiogràfics dels macerats cel.lulars de les diferents regions de *Dugesia polychroa* (taula 1) confirmen els de l'apartat anterior: hi ha un màxim en la regió cefàlica. A més, el compartiment de cèl.lules

Regió	Cap	Prefaringea	Faringea	Postfaringea	Cua
<u>n° grans</u> cèl.lula	16.7±0.7	14.4±0.5	11.3±0.7	12.8±0.8	16.3±0.2
<u>n° grans</u> neoblast	3.6±0.3	2.9±0.5	1.8±0.3	4.3±0.7	5.0±0.2
<u>n° grans</u> cèl diferenc.	23.1±1.4	18.7±1.0	14.5±1.1	16.1±1.6	20.7±0.2

TAULA 1. DISTRIBUCIO DEL n° de grans de plata/cèl.lula AL LLARG DE L'EIX ANTEROPOSTERIOR DE *Dugesia (S) polychroa* INTACTA. Les cèl.lules eren marcades amb ^3H -Leu durant 8h. a 17°C i autorradiografiades amb ILFORD G5 (25 dies d'exposició).

diferenciades té una taxa de síntesi proteica més alta que el de les indiferenciades (neoblasts) i per tant és el principal responsable de l'esmentat gradient. Hem trobat també que entre les cèl.lules diferenciades en hi ha que tenen una molt alta activitat sintètica que són les secretores (basòfiles i acidòfiles: 97.5±15 grans/cèl.), d'altres intermitja (per exemple, cèl.lules fixes del parénquima: 37.7±8) i els valors més baixos els presenten les nervioses (12.2±4).

Anàlisi dels patrons electroforètics de cada regió:

Donada la capacitat de resolució dels sistemes electroforètics unidimensionals (IEF, SDS-PAGE), les diferències (que indiquem amb fletxes a les fig 2 i 3) entre les regions són mínimes i possiblement d'ordre quantitatiu a excepció d'algunes (senyalades amb *). Fora de la faringe, les regions 1 i 2 no presenten determinades bandes (●) o almeys si les presenten estan en baixes quantitats.

Amb l'electroforèsi bidimensional (IEF o NEPHGE/SDS PAGE) en combinació amb la tinció de plata augmentem de forma sensible la capacitat resoluciva del sistema. La fig. 4 és un típic patró proteic d'una planària intacte on està indicat amb números (1-15) tots els canvis que es detecten al comparar els gels de diferents regions (gels no mostrats). Més del 95% de les proteïnes detectades en qualsevol gel poden ser detectades en qualsevol altre de les altres regions. Però malgrat la gran similitut entre els patrons es poden observar algunes diferències. La taula 2 resumeix tots aquests canvis en què la majoria són quantitatius (per exemple 3, 12, 15,...). Hi ha alguns polipèptids, però, que estan molt enriquits en determinades regions (per exemple, *, 1, 3, 14,...). D'altres, per contra manquen en només una o dues (per exemple, 5, 12, 13,...). Molt interessant és el polipèptid 11 que només està en quantitats detectables en la regió cefàlica, probablement relacionat amb el sistema nerviós. Cal fer esment que la tinció de plata és poc quantitativa (Wray i al., 1981) per el que diferències quantitatives detectades en el gel no siguin tals realment.

Fig 2. Típic patró proteic d'IEF de les diferents regions (el significat dels signes està explicat en el text).

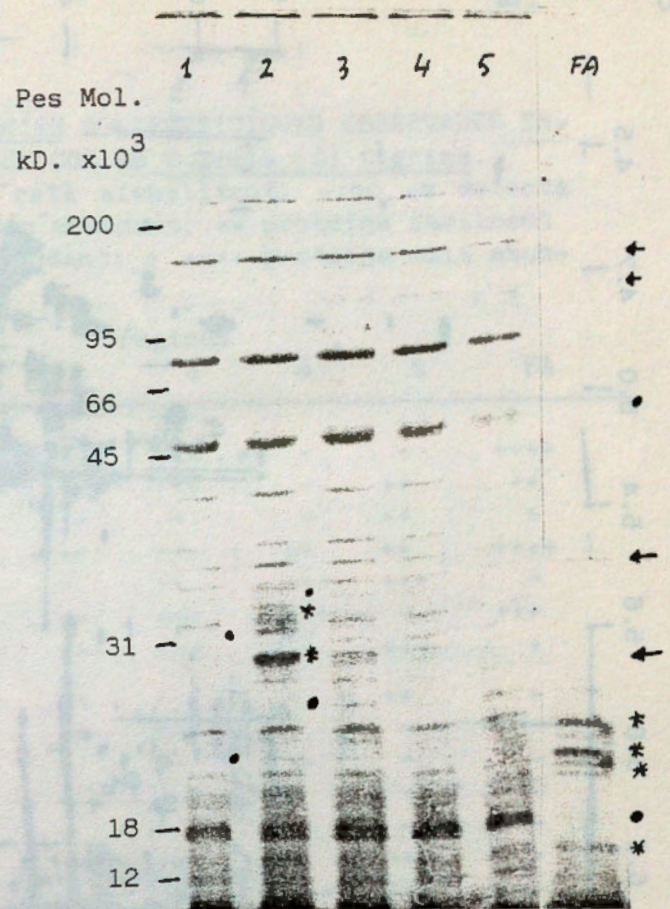
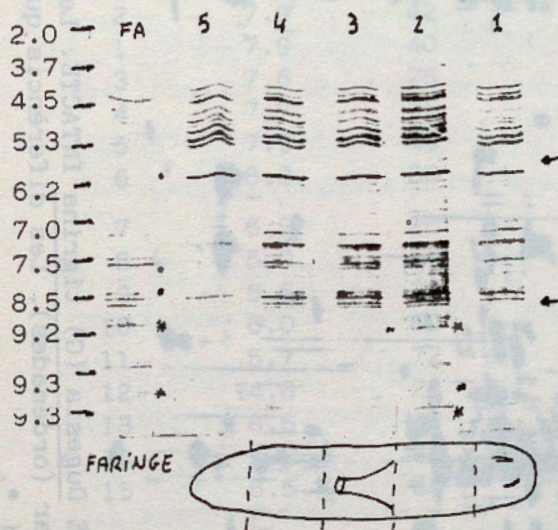


Fig. 3. Gel de SDS-poliacrilamida del contingut proteic de les diferents regions. (1:cap; 2:prefaringea; 3: faringea meyns la faringe; 4:postfaringea; 5: cua i FA: faringe.)

Discussió:

Dels estudis sobre la taxa d'entrada d'aminoàcids i llur incorporació a proteïnes, dos importants punts han d'ésser esmentats: (i) l'entrada total i la incorporació mostren un gradient axial antero-posterior amb el màxim a la regió cefàlica i el mínim en la prefaringea, i (ii) les cèl.lules diferenciades presenten una major activitat sintètica en quant a proteïnes que no pas presenten els neoblastes.

El primer punt el podem relacionar amb la hipòtesi de Child (1941) dels gradients metabòlics. Les nostres dades coincideixen amb les de Flickinger i Coward (1962) per *Dugesia dorotocephala* referent al màxim cefàlic trobat. Com demostrà Coward (1965) i Calow i Read (1981) i com es pot veure en la fig. 1b, aquesta alta taxa d'incorporació no es el reflexe d'una permeabilitat diferencial que presenta l'epidermis al llarg de l'eix antero-posterior als aminoàcids del medi, tal com postulava Best (1965).

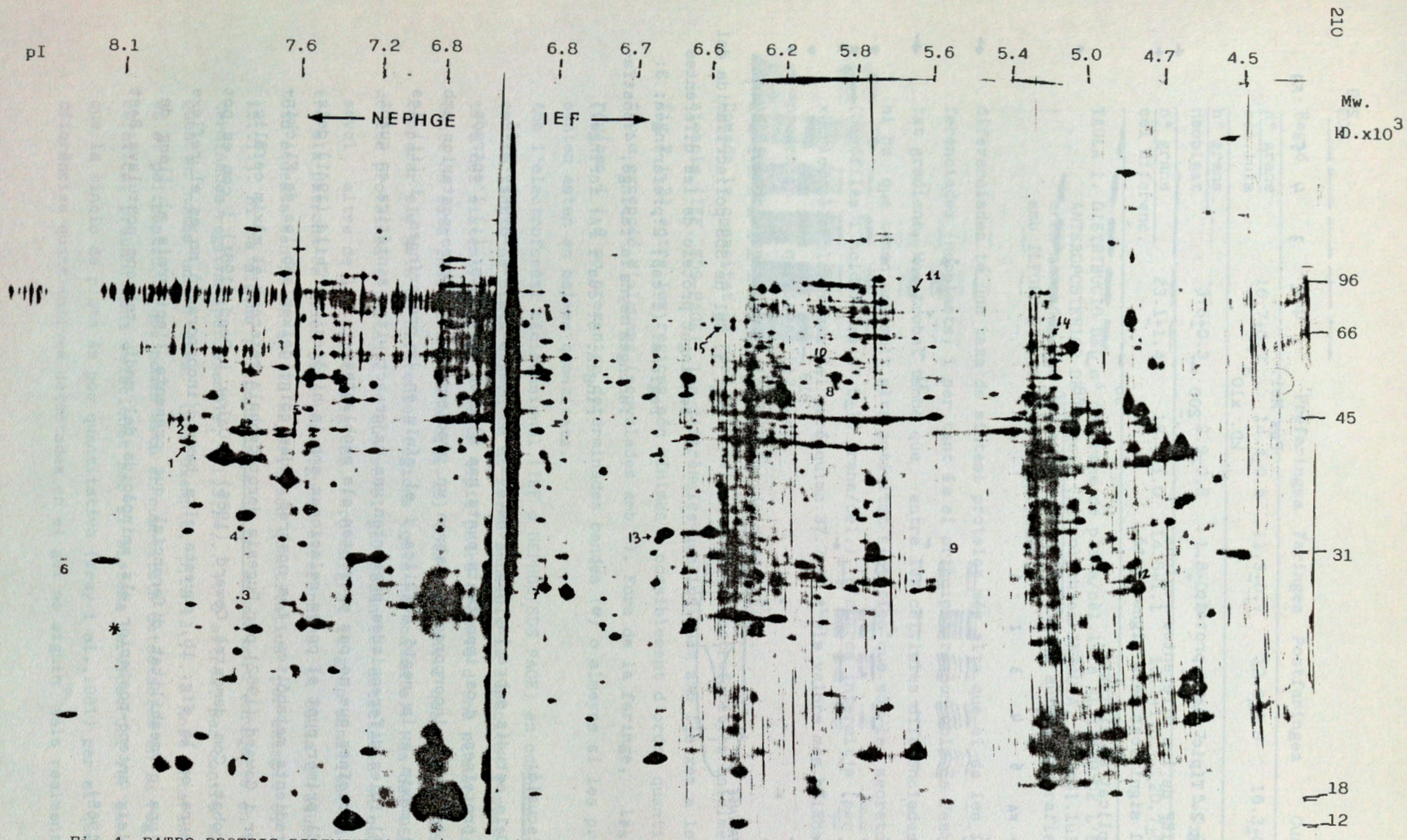


Fig.4. PATRO PROTEIC BIDIMENSIONAL (NEPHGE/IEF+ SDS-PAGE) DE *Dugesia (G) tigrina* INTACTE. Les proteïnes eren separades pel seu pI (abcises) i pel seu pes molecular (ordenades). Les diferències que es detecten entre les diferents regions estan senyalades per números i *.

TAULA 2. ESQUEMA-RESUM DE LES DIFERÈNCIES POLIPEPTIDIQUES OBSERVADES ENTRE LES DIFERENTES REGIONS DEL COS DE *Dugesia (G) tigrina*.

El contingut proteic relatiu està simbolitzat: -:no es detecta el polipèptid; +: polipèptid poc abundant; ++ proteïna fàcilment detectable; +++ relativament abundant; i ++++ proteïna molt abundant.

número del polipèptid	pI ¹⁾	pes molec. x10 ³	regions					FA
			1	2	3	4	5	
*	7.9-9.1	22	-	++	+++	+	-	++++
2	7.9	42	+++	+++	+++	-	++	++
1	7.9	40	++	-	-	-	++	+
3	7.6	26	+	++	+++	++	++	++++
4	7.7	35	-	-	++	+++	+++	-
5	7.5	45	-	++	+++	+++	-	+++
6	8.3	30	+++	+++	+++	-	+++	+
7	6.9	28	-	++	+	+	++	+
8	5.9	56	+	++	+++	+	-	-
9	5.6	31	+	+	++	++	-	-
10	6.0	60	+++	+	+	+	+	-
11	5.7	72	+++	-	-	-	-	-
12	4.8	28	++	++	+++	+	+++	-
13	6.6	33	+++	+++	+++	+++	+++	-
14	5.2	62	+	++	++	++	+++	++++
15	6.5	68	-	+	+	+	-	++++

¹⁾ els pI de * i les proteïnes 1-6 no són els reals ja han estat detectades en gels no equilibrats (NEPHGE).

Donat per sentada l'existència d'un gradient axial de síntesi proteica a *Dugesia tigrina* ens podem plantejar el dubte de si el gradient observat és la causa o el reflexe de la desconeguda causa de l'organització polaritzada. Les dades obtingudes per l'anàlisi del contingut proteic per tècniques electroforètiques, sobre tot 2-D PAGE, no ens permeten aportar cap informació concluent al respecte. La majoria de les diferències detectades es tracta de diferències quantitatives que podem associar-les a un diferent percentatge dels tipus cel·lulars al llarg de l'eix antero-posterior (Baguñà, 1973). En conseqüència, aquests polipèptids els podem utilitzar per identificar de forma ràpida, ja que sols seran necessaris gels d'una dimensió que separin per tamany, determinades regions o tipus cel·lulars en estudis "in vivo" o "in vitro". Per contra, cap d'aquests polipèptids positius satisfà els criteris, establerts per Slack (1982), per associar llurs canvis graduals a còdis posicionals de l'eix antero-posterior.

De fet no resulta sorprenent ja que s'hi ha proteïnes involucrades amb-
sols capacitat reguladora és força possible que estiguin insuficientment
representades com per ésser detectades. Les estimacions del nombre de
gens actius en un tipus cel.lular donen xifres d'unes 10^3 espècies de
mRNA de moderada abundància i uns 10^4 espècies de mRNA de baixa abundàn-
cia (Davidson i Britten, 1979). Ja que en gels de 2-D podem detectar unes
 10^3 espècies proteïques diferents, sembla clar que només detectem les pro-
teïnes formades a partir de mRNA moderadament o molt abundants, i que
generalment específiques proteïnes de tipus estructural. En conclusió,
les diferències observades al llarg de l'eix antero-posterior estan rela-
cionades amb la cito-diferenciació de les diferents regions.

Un altre punt a discutir, és l'origen cel.lular o supracel.lular del
gradient axial de síntesi proteica. Aquest pot ésser degut sobretot, a
nivell cel.lular a una síntesi diferencial del compartiment de cèl.lules
diferenciades. No s'observa cap tipus cel.lular que tingui un gradient
més extrem que altres, sino que en tots, adhuc els neoblasts, la pendent
és igual (dades no mostrades). Es, per tant, una resposta de tipus gene-
ral de totes les cèl.lules de determinada regió encara que podria ha-
ver-hi diferències en el grau de resposta entre les regions, depenent de
la seva posició en l'eix antero-posterior. Aleshores, el gradient de sín-
tesi proteica seria un reflexe d'aquesta resposta diferencial.

Les perspectives a curt termini és veure si les diferències observa-
des en la síntesi proteica entre les diferents parts de l'organisme res-
ponen a totes les proteïnes en general o sols a un grup d'elles. A més
serà molt interessant estudiar si existeix una determinació gradual i
axial durant la regeneració de les estructures perdudes utilitzant aques-
tos canvis detectats axialment com a marcadors específics de les dife-
rentes regions.

Bibliografia:

BAGUÑA; J. (1973). "Estudios citotaxonómicos, ecológicos, e histofisio-
logia de la regulación morfogenética durante el crecimiento y la rege-
neración de la raza asexuada de la planaria *Dugesia mediterránea* n. sp.
(Turbellaria, Tricoladia, Paludicola). Tesi Doctoral. Universitat de
Barcelona.

BEST, J.B.; ROSENVOLD, R.; SOUDERS, J. & WADE, C. (1965). Studies on the
incorporation of isotopically labelled nucleotides and amino acids in
Planaria. J. exp. Zool. 159, 397-403.

- BRAVO, R. (1984) Two-Dimensional Gel Electrophoresis: A Guide for the Beginner. de "Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins: Methods and Applications" Celis, J and Bravo, R., eds. Academic Press, Inc.
- BRØNDSTED, H.V. (1969) Planarian Regeneration. Pergamon Press.
- CALOW, P. & READ, D.A. (1981). Transepidermal uptake of the amino acid leucine by freshwater triclads. Comp. Biochem. Physiol. 69A, 443-8.
- CHILD, C.M. (1941) Patterns and problems of Development. Univ. Chicago Press. Chicago, Ill.
- COWARD, S.J. & FLICKINGER, R.A. (1965) Axial patterns of protein and nucleic acid synthesis in intact and regenerating Planaria. Growth, 29, 151-63.
- COWARD, S.J. (1968). The relation of Surface and Volume to So-Called Physiological Gradients in Planaria. Developmental Biology, 18, 590-601.
- DAVIDSON E.H. & BRITTEN, R.J. (1979). Regulation of gene expression: possible role of repetitive sequences. Science 204, 1052-9.
- FLICKINGER, R.A. (1959). A gradient of protein synthesis in Planaria and reversal polarity of regenerates. Growth 23, 251-71.
- KARLSSON, Ch.; DAVIES, H., OHMAN, J. & ANDERSON, U. (1973). LKB 2117 Multiphor: I Analytical Thin Layer Gel Electrofocusing in Polyacrylamide gel. Application Note LKB, 29 March 1973.
- KESSLER, S.W. (1981) Use of Protein A-Bearing for the Immunoprecipitation and Isolation of Antigens from Cells. Methods Enzymology, 73. Academic Press.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Clavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227, 680-5.
- O'FARRELL, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250, 4007-21.
- SLACK, J.M.W. (1982) Protein synthesis during limb regeneration in the axolotl. J. Embryol. exp. Morph. 70, 241-60.
- STEPHENS, G.C. (1964). Uptake of organic material by aquatic invertebrates. III Uptake of glycine by brackish water annelids. Biol. Bull. 126, 150-62.
- TRACY, R. P. & YOUNG, D.S. (1984). Clinical Applications of Two-Dimensional Gel Electrophoresis. de "Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins: Methods and Applications" pp. 193-240. Celis, J & Bravo, R., eds. Academic Press.
- WRAY, W.; BOULIKAS, T.; WRAY, V.P. & HANCOCK, R. (1981). Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels. Anal. Biochem. 118, 197-203.

Estudi de la maduració intratímica mitjançant anticòssos monoclonals

L. Borche, F. Lozano, R. Vilella, J. Vives

Servei d'Immunologia, Hospital Clinic i Provincial, Villarroel 170,
08036-Barcelona

Abstract

A population of thymic cells are negatively selected by monoclonal antibodies and complement. The monoclonal antibodies used are 332A3 (T3), 332C1 (T1), 725A4 (T4) and 1092D4 (T8). The population alive after treatment is $T1^-T3^-T4^-T8^-$ as assessed by cytophluorimetry. More than fifteen monoclonal antibodies are used to characterize these cells. Only four of them are systematically elevated in relation to the pretreated population. Two of these, 333B3 and 994D5, are differentiation "mature" markers (medullary located). The remaining two monoclonal antibodies are 421B5 and 843C1, directed against a class I related molecule and a 106 kD membrane protein. The presence of "mature" marker in an immature population is discussed in relation to conventional schemes of intrathymic differentiation.

Introducció

La població limfocitària tímica és fenotípicament heterogènea. Aquesta heterogeneïtat es demostrable en el ratolí per aloantisèrums (Cantor et al, 1975) o per anticòssos monoclonals (AcMo) tan en el home (Reinherz et al, 1980; Hsu et al, 1985) com en el ratolí (Van Ewijk et al, 1981; Scollay et al 1983). A partir d'aquesta heterogeneïtat s'han proposat esquemes de maduració (Reinherz et al, 1980; Scollay et al, 1985). No n'hi han proves definitives a favor d'un o altre esquema. En el esquema de Reinherz és proposen tres etapes maduratives sequencials: I) caracteritzada per la presència del antigens T11 i T10; II) és sumen T6 i concomitantment T4 i T8 i comença la expressió de T3 y T1, éssent la població tímica majoritària i de localització cortical; III) T6 i T10 negatius, T1 i T3 positius amb T4 i T8 mutuament exclusius, éssent aquesta la població madura similar a la perifèrica i que és localitza a la medul.la tímica. No és discuteix la immaduresa de la població I ni de la condició madura de la població III, però és troba sota intensa discussió el pas obligat per l'etapa II o la possibilitat d'un "bypass" entre les poblacions I i II, deixant per una línia de diferenciació cega la població III dirigida a la mort intratímica obligatoria (Scollay et al, 1984, 1985). La existència de marcadors comuns entre les poblacions I i III (i negatius per la població II) recolzarien la existència del esmentat "bypass".

Amb aquesta finalitat hem estudiat la presència de més de quinze marcadors de membrana en la població tímica total i en la població "tipus I" corresponent.

Material i mètodes

Immunodeplecció per AcMo i complement: Timus provenents d'infants entre 3m i 12a sotmesos a intervencions cardiovasculars és varen col.locar en PBS procedint-se a la suspensió de els timòcits