

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS



134

**CULTIVO DE MACROFAGOS PARA LA OBTENCION
DE UNA PROTEINA DIFERENCIADORA DE CELULAS
MIELOIDES, MEDIANTE LA APARICION DE UN
RECEPTOR INMUNOLOGICO. Fc.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A

CONSTANTINO ORDUÑA TREJO

México, D. F.

1981



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CULTIVO DE MACROFAGOS PARA LA OBTENCION DE UNA
PROTEINA DIFERENCIADORA DE CELULAS MIELOIDES,
MEDIANTE LA APARICION DE UN RECEPTOR INMUNOLO-
GICO. Fc.

I. INTRODUCCION	1
1. Antecedentes	
1.1. Serie monocítica	2
1.1.1. Morfología	2
1.2. Serie granulocítica	4
1.2.1. Morfología	5
1.3. Desarrollo de las técnicas para el cultivo de las células de ma- míferos	8
1.4. Receptores Fc	11
1.5. Protéina diferenciadora MGI	12
1.6. Lipopolisacáridos	19
II. METODOLOGIA	21
2.1. Animales	21
2.2. Obtención y cultivo de macrófagos	21
2.3. Cultivo de pulmón	22
2.4. Cultivo de células indiferenciadas	23
III. RESULTADOS	25
3.1. Descripción de resultados	25

IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES 31

V. AGRADECIMIENTOS 36

VI. REFERENCIAS 37

INTRODUCCION

El presente trabajo se realizó con el fin de poder de mostrar la efectividad de la respuesta hacia la diferenciación celular de un cultivo de células de médula ósea de ratón, expuestas a un factor obtenido de un cultivo de macrófagos de cavidad peritoneal, los fagocitos fueron obtenidos de ratones CD1, previamente tratados con una inyección intraperitoneal de caseinato de sodio al 10%. Los macrófagos se cultivaron utilizando microacarreadores con el fin de aumentar la superficie de adhesión celular y con lipopolisacáridos (obtenidos de las paredes de Salmonella typhosa) en una concentración de 5 µg/ml, con la finalidad de activar los fagocitos, este medio fué cultivado con células de médula ósea de ratón y el incremento en el porcentaje de la formación de rosetas se tomó como pauta a una buena manifestación de la diferenciación celular causada por la proteína de bajo peso molecular llamado MGI (Inductor de Macrófago y Granulocitos) (8, 9, 10, 47, 48, 76, 77, 78).

Se revisaron las series celulares más importantes para la elaboración del presente trabajo, así como el desarro

llo de las técnicas para el cultivo de las células de mamíferos utilizando microacarreadores, el factor Fc y aspectos importantes de la obtención y purificación de la proteína diferenciadora MGI.

SERIE MONOCITICA

La serie monocítica, consta de células mononucleares en diferentes etapas de diferenciación (Esquema 1), son células fagocíticas probablemente relacionados con los macrófagos de los tejidos (88). Entre sus funciones (88 y 90), están las de la defensa corporal contra infecciones sobre todo en la formación de granulomas y como células gigantes en la destrucción de tejidos lesionados, también intervienen en las reacciones inmunes probablemente transformando el antígeno antes de que provoque una respuesta por los linfocitos (88).

Los monocitos se originan en la médula ósea, pasa algún tiempo en la sangre periférica antes de emigrar hacia los tejidos y transformarse en histiocitos fagocitarios (88).

MORFOLOGIA

✓ Monoblasto: Se llama monoblasto a toda célula de la serie monocítica que tiene estructura cromatínica, y donde se pueden observar nucleolos.

Promocito: Son células con núcleo dentado y parecen más jóvenes que los monocitos en el contenido de la cromatina nuclear, ya que está más finamente dividida y contiene nucleolos o residuos nucleolares, se consideran intermedias entre las células blásticas y los monocitos adultos, normalmente se observan en la sangre periférica.

Monocito: Suelen ser más voluminosos en la sangre periférica, el diámetro varía entre 16-22 micras, con coloración de Wright, el citoplasma presenta color gris azulado y pálido que parece más opaco que el citoplasma del linfocito, este organelo presenta gran número de partículas finas de color azul y rojizo, es fuertemente vacuolado, el núcleo muchas veces es dentado, tiene estructura cromatínica filamentososa que parece más condensada, en donde se reúnen las fibras cromatínicas. Los monocitos se distinguen

de los linfocitos y mielocitos por sus dimensiones y por el aspecto del núcleo y del citoplasma.

Macrófago: Las células que más interesan para este trabajo son los macrófagos, los cuales son fagocíticas, tienen enzimas celulares, se caracterizan por la ingestión de partículas.

Son las células que se encargan de la defensa del organismo al ataque de agentes extraños.

Metchnikoff (88), estableció la importancia de estas células y las estudia en diferentes animales, este trabajo fué reimpreso en 1968, además, la función fagocítica la estudió extensamente mediante la inyección de ácidos vitales y material colorante ingerido por estas células.

LA SERIE GRANULOCITICA

Los granulocitos constituyen la principal defensa del organismo contra infecciones bacterianas, la teoría del origen coincide en que en el adulto en circunstancias normales,

la serie granulocítica nace en la médula ósea y provienen -
de los mielocitos y sus precursores, que son mieloblastos -
(88) (Esquema II).

MORFOLOGIA

Mieloblasto: Existen en médula ósea, no se observan en sangre circulante excepto en algunos estados patológicos. El tamaño es de 11 a 18 micras, con colorante wright, el material nuclear tiene coloración azul púrpura obscuro, la cromatina está finamente dividida, punteada o en forma de hebras y solo se condensa alrededor de los bordes de los nucleolos, el citoplasma se tinte de azul más ligero que el núcleo, los mieloblastos dan reacción negativa a la peroxidasa.

Progranulocito (Promielocito), es la etapa continua del desarrollo después del mieloblasto, a veces puede parecerse al mieloblasto con adición de gránulos citoplásmicos azurófilos, en esta etapa del desarrollo tienen la estructura nuclear más burda que el mieloblasto, son muy voluminosos y contienen gran cantidad de gránulos azurófilos. La -

aparición de estos gránulos, parece estar relacionada con la diferenciación de las proteínas citoplásmicas. Thorell (88), ha demostrado que el mieloblasto tiene muchos polinucleótidos citoplásmicos y un núcleo prominente. Cuando la célula madura, está en la etapa de progranulocito, los polinucleótidos citoplásmicos disminuyen, y al ir apareciendo los gránulos, en las etapas mielocítica ya no se descubre RNA en el núcleo.

Mielocito: Estas células son las primeras que tienen gránulos específicos (Neutrófilos, eosinófilos, basófilos), tanto los neutrófilos como los eosinófilos dan reacción positiva a la peroxidasa. Con el colorante supravital pueden demostrar en el citoplasma muchas pequeñas mitocondrias y un número variable de cuerpos rojos neutros. El número, localización y disposición de estos cuerpos se utiliza como base para la clasificación de las células según sus diferentes etapas como mielocito A, B y C.

Metamielocito (juvenil): La estructura cromática se hace más gruesa, persiste la granulación específica y el nú

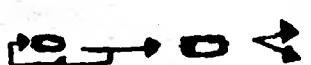



ESQUEMA I

7.

MEDULA		OSEA		SANGRE	TEJIDO
Conjunto de células primitivas - pluripotenciales.	Conjunto de células multipotenciales primitivas.	Conjunto de células primitivas - especializadas.	Conjunto de células en maduración y proliferación.		
Célula Madre	Célula Tronco	Célula Primitiva "SGM" Monoblasto	Promonocito	Monocito	Macrófago

Cinética de la formación de células de la serie monocítica (88).

ESQUEMA II

MEDULA		OSEA						SANGRE	TEJIDO		
Compartimiento células tronco	Compartimiento mitótico						Compartimiento maduración y guardado				
								CGP  MGP			
CFU	célula tronco comisionada	MB	PRO	MYEIO	META	BAND	SEG				
Compartimiento de tallos	2.6						2.7	3.6	2.5	0.7	
C x 10 ⁹ cel/kg	(.14)						(.51) (1.95)				
Tiempo de tránsito por compartimiento	18 hrs.						24 hrs.	104 hrs.	40 hrs.	66 hrs.	95 hrs.
	8 a 14 días									9.5 hrs. $\left(\frac{T_1}{2} 6.3 \text{ hrs}\right)$	

Cinética de la Producción de células de la serie Granulocítica (88).

CFU: Unidad formadora de colonias. MB: Mieloblasto. PRO: Progranulocito. MYEIO: Mielocito. META: Metamielocito. BAND: Célula en banda. SEG: Célula segmentada.

cleo adopta la forma dentada, en esta etapa la célula recibe también el nombre de metamieloblasto.

CELULAS SEGMENTADAS (Polimorfonucleares).

Se trata de células completamente desarrolladas - de la serie granulocítica, cuyo núcleo contiene 1 ó más lóbulos unidos por conexiones filamentosas. La cromatina nuclear es densa y tiene aspecto de bloques o nudos unidos - por fibras. El citoplasma contiene gran número de gránulos que se tiñen específicamente con el colorante de Wright.

DESARROLLO DE LAS TECNICAS PARA EL CULTIVO DE LAS CELULAS DE MAMIFEROS

Los primeros trabajos en demostrar inequívocamente que las células de mamíferos pueden ser cultivados in vitro, por un período de tiempo determinado fueron realizados por Carrel (82). En muchos de los trabajos recientes (83, 84), se concentran para que las metodologías de cultivos en suspensión tengan un mayor rendimiento con un mínimo esfuerzo.

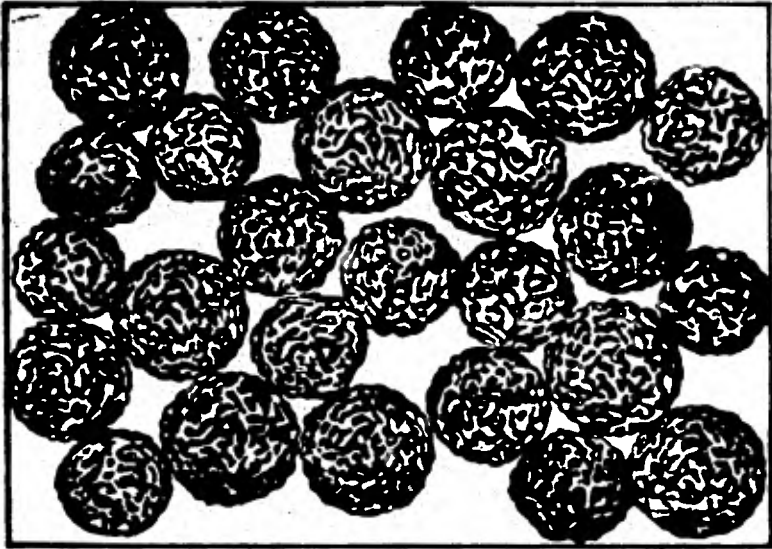
Se tienen que utilizar evidentemente superficies sólidas como el primer requerimiento para el crecimiento - de estas células.

La gran escala de cultivos masivos ha sido de mucho interés por varios años, ya que las aplicaciones prácticas que puede acarrear el cultivo in vitro de las células de mamíferos son muchas, por ejemplo: las células cultivadas masivamente pueden ser utilizadas a su vez como sustrato en la multiplicación de partículas virales y su más inmediata aplicación sería para la producción y obtención de vacunas virales o de productos virales, esto en nuestros días es una de las mejores industrias químico-farmacobiológicas, (82, 83).

El desarrollo para la técnica del cultivo con microacarreadores, (Dibujo No. 1), para las células de mamíferos se debe a Van Wesel (82), y posteriormente se desarrollaron otras técnicas para los cultivos en suspensión (84), con esto ahora se pueden producir un sinnúmero de elementos útiles para su estudio o para la aplicación terapéutica de los microacarreadores dentro de las tecnologías para los cultivos masivos de células de mamíferos.

Los experimentos originales realizados por Van Wesel (82, 83, 84, 85), en donde utilizó como microacarreadores DEAE Sephadex A-50, se encontró que la utilización del DEAE Sephadex A-50 aumentaba la superficie para la adhesión celular y que facilitaba el manejo de un monocultivo celular. -

DIBUJO Nº 1



TECNICA DE MICROCARREADORES EN CYTODEX 1 PARA EL CULTIVO CELULAR...

En cultivo con microacarreadores con un pequeño sistema de agitación se puede mantener en cultivo masivo células en una superficie pequeña y presenta ventajas, (Wesel 1967), - (82), éstas pueden ser: Primero, la facilidad para el manejo que reduce la contaminación, ya que evita un gran manipuleo y además se pueden llevar con mayor claridad los registros del pH, CO₂, temperatura, concentración de oxígeno y - cantidad de nutrientes (Wesel 1973) (83).

En particular los microacarreadores tienen que presentar una densidad muy parecida a la del medio de cultivo, - con la finalidad que mediante una pequeña agitación permanezcan en suspensión, además deben soportar varios cientos de células alrededor de la superficie del microacarreador, (aunque esto no guarde un orden de magnitud homogéneo en - cuanto al número de células adheridas) y por último los microacarreadores no deben tener toxicidad para las células.

Los materiales de DEAE Sephadex A-50, pueden ser más susceptibles para ser empleados como microacarreadores, aunque también se pueden utilizar productos similares como son DEAE Sephadex 25 y QAE Sephadex, Polystirino y nilsan, con resultados satisfactorios siendo estos últimos materiales - una especie de nylon, también se han empleado para la manufactura de los microacarreadores Spherosil (una especie de vidrio poroso), presentando una gran desventaja, ya que pa-

ra cultivos celulares en suspensión se utilizan una frecuencia muy alta de agitación, provocando un choque continuo de los microacarreadores entre sí y perjudicando a las células. Los cultivos en donde se utilizan microacarreadores, ofrecen técnicas muy elegantes para producir en gran escala células y sus productos metabólicos que se pueden obtener - (82, 83, 84, 85).

RECEPTOR Fc

El componente de las membranas celulares responsable del acoplamiento con IgG(2), se le define como receptor Fc. Estos receptores celulares tienen varias funciones inmunológicas, que incluyen el de la fagocitosis, la particular localización de complejos inmunológicos, la transferencia placentar del IgG, la dependencia de anticuerpos mediante la citotoxicidad y la retroalimentación inhibitoria de la síntesis de anticuerpos (23, 24, 25, 51).

Las diferentes funciones atribuidas al receptor Fc y a su especificidad tan diversificada en asociación con otros componentes de la membrana celular es un punto muy importante en la heterogeneidad de funciones que desempeña la membrana celular (23, 25).

Las diferentes propiedades y funciones del receptor Fc, pueden ser descritas para los linfocitos, los macrófagos y las células k. Estas remarcables diferencias se toman como base en la especificidad de IgG, (21, 23, 24, 51).

La relación IgG-Fc sufre cambios cuando las membranas celulares son expuestas a diferentes temperaturas (21, 24).

PROTEINA DIFERENCIADORA (MGI)

La proteína encargada de la diferenciación celular a lo largo de la elaboración de este trabajo se llamará inductor de macrófagos y granulocitos (MGI), (8, 9, 10, 47, 48, 76, 77, 78).

En 1966, Bradley y Metcalf (8), reportaron que la célula y médula ósea contenían una clase de célula que formaban colonias al ser cultivadas en agar en la presencia de material diferenciador, obtenido del cultivo del riñon o células embrionarias. La efectividad al ser sembradas, fué de una colonia por cada 2000 células indiferenciadas. Las colonias fueron claramente visibles al séptimo día y consistían en granulocitos maduros, fagocitos, mononucleadas o una mezcla de ambas (11, 22, 45, 46, 55). Al material estimulador producido por el metabolismo celular se le llama -

también factor estimulador de colonias (9, 60). la presencia de este factor en el cultivo celular resulta ser esencialmente para la proliferación celular (45, 73).

En 1967, Viraloinen y Defendi (86), reportaron que las células de cavidad peritoneal obtenidas por la inyección de células de almidón se reproducen en cultivo masivo si tienen la presencia de la proteína diferenciadora formadora de colonias como le llama al MGI, obtenida del cultivo de una línea celular (42, 86).

En 1973, Lin y Stewart (38), reportaron que las células de cavidad peritoneal obtenidas por inyección de medio con tioglicolato y cultivadas subsecuentemente en agar semi-sólido y en presencia MGI, de un cultivo de pulmón, formaban solamente macrófagos, diferentes al cultivo con células de médula ósea y estas colonias no fueron visibles hasta el 21-avo día de cultivo.

En 1975, Stewart, Lin y Adles (80), exponen que solo las células de cavidad peritoneal presentan colonias cuando son cultivadas en medio líquido y MGI de pulmón, formando colonias de células diferentes a las que aparecen en el cultivo de agar, estas colonias son visibles al décimo o doceavo día de cultivo. Estudios subsecuentes demuestran que es-

te factor estimulador de colonias es producido por fagocitos mononucleados (36).

Cuando las células indiferenciadas y otros tejidos son cultivados, variando la concentración de MGI la multiplicación de macrófagos es siempre constante al rango de concentración de las células indiferenciadas y a la capacidad del recipiente (7, 11, 43, 45, 73).

El porcentaje de diferenciación celular puede disminuir si la concentración de MGI, es baja durante el período de cultivo (7, 42, 73). Sin embargo la producción de inhibidores o la disminución de los nutrientes esencialmente perjudica este porcentaje, aunque para la cuantificación de este efecto se requiere de una dosis bastante pequeña (73).

Stanley et al 1976, desempeñaron un estudio exhaustivo realizando la comparación de una gama muy amplia de fuentes diferenciadoras (MGI), (11, 12, 33, 41, 72, 73, 86). Se han cultivado muchos tejidos y medios para generar MGI como: timo, células de médula ósea, bazo, hígado, pulmón cerebro, corazón, intestino delgado, testículos, músculo esquelético, suero de sangre normal (9, 10, 11, 21, 32, 53,

54, 66, 71).

Una de las fuentes de las más utilizadas para la producción de MGI, es el suero de sangre de ratón, cuando es inyectado con endotóxicos por ejemplo: de Salmonella typhosa (16, 44, 59, 63, 65),

Los subproductos del cultivo de las líneas celulares presentan cantidades considerables de MGI (6, 7, 21, 38, 41, 73, 87, 90). Las observaciones realizadas por Bradley et al (9), para el suero normal de ratón son mucho menores en respuestas cuando se presentan las leucemias espontáneas en ratones AKR. (9, 60). También se encontró que otras cepas de ratones (C₃H y C₅₇₈₁), los resultados son mucho menores (43).

Otra fuente también muy efectiva para la obtención de MGI, es la orina del humano, puede para su uso ser dializada, centrifugada y esterilizada por filtración, (61, 62, 74, 76, 88).

Prival et al (58), citan que vale la pena separar - las células adherentes de la cavidad peritoneal, ya que - producen una aceptable cantidad de MGI, cantidad que aumenta cuando son cultivados en la presencia de varios agentes (mitógenos y antígenos) (3, 4, 37).

Las propiedades físicas y químicas de la proteína - MGI, fueron obtenidas de diferentes fuentes, mediante ensajos biológicos realizados con células de médula ósea en - agar (73, 75). La actividad biológica de la proteína se - puede resumir en tres fases:

- a) Las dosis de la proliferación puede ser pequeña para causar una respuesta adecuada, aunque también, la baja en el porcentaje de diferenciación celular, puede ser por una baja en la concentración del medio condicionado utilizado. (73, 75).
- b) El MGI puede tener actividad biológica con células - indiferenciadas de médula ósea, así como con macrófagos de cavidad peritoneal.
- c) Cuando el factor de diferenciación celular (MGI), es purificado exhaustivamente no pierde su actividad biológica (73, 75).

El factor ha sido parcialmente purificado y caracterizado de varias fuentes descritas anteriormente. En general todas ellas presentan propiedades similares, por ejemplo: No existe la pérdida de la actividad si éste es procesado mediante liofilización, ni al ser dializado tampoco es desactivado cuando se emplea para su extracción en fase líquida 1M. NaCl, ó 8M de urea (76), el material es estable cuando se calienta a 60°C, pero pierde actividad cuando la temperatura es aumentada progresivamente. El factor es también estable cuando es cultivado por un lapso de tiempo prolongado en un rango de pH desde 2 a 12, pero se pierde la actividad cuando es incubado a Ph menores y mayores que el rango anteriormente enunciado. El factor puede ser precipitado por una fracción saturada de $\text{NH}_2 \text{SO}_4$, o por una fracción de etanol del 32 al 50% de concentración.

La actividad del MGI por varios tratamientos de enzimas suministradas se ha empleado para muchos estudios de abundancia y de resistencia a la digestión. por nucleasa, glicosidasa, fosfalipasas y otras enzimas proteolíticas, pero la mayor actividad ha sido obtenida mediante tratamientos con pronasas y quimiotripsinas (6, 15, 33, 72, 73, 76, 79, 86, 87).

El MGI, se reporta algunas veces como una glicoproteína (65, 68), por otro lado también es reportado con una heterogeneidad en el peso molecular. Es una molécula con entidad biológica y actividad ligada a la diferenciación celular (73). Las discrepancias aparentes entre los diferentes pesos moleculares son posiblemente debidos a las separaciones moleculares por diferentes metodologías utilizadas, por ejemplo: los pesos determinados en la utilización de diferentes geles cromatográficos en la velocidad de filtración y en la de sedimentación (77). También hay que hacer notar que en la preparación del gel, se toman grotescos rangos de separación para el material purificado.

Stanley et al (74, 76), purificaron MGI de orina de humano con un 14 al 40% de la recuperación de la actividad y un aparente peso molecular entre 45000 a 60000 daltons. (72). También se han examinado fuentes de embriones de pollo, medio condicionado de líneas celulares y células de ratón con propiedades similares y pesos moleculares aproximados a 64000 daltons (72, 74, 76).

Austin (6) purificó MGI del pulmón obteniendo un peso molecular aproximadamente de 73000 daltons, por la combinación entre el gel de filtración y la velocidad de sedimentación en un gradiente de sacarosa.

Laudau y Sachs (33) y Gues y Sachs (30), han purificado MGI de líneas de fibroblasto obtenidas de ratón y el peso molecular reportado del material purificado es de 70000 daltons.

Watson y Prichard (87), han purificado parcialmente el MGI obtenido por clones JLS-V5, de células tumorales fibroblastoides embrionarios y orina humana con un peso molecular de 75000 daltons.

Burguesa et al (13, 14). Fojo et al (27), pudieron caracterizar este factor con pesos moleculares de 30000 y 40000 daltons respectivamente.

LIPOPOLISACARIDOS

Los lipopolisacáridos son obtenidos de las paredes de las bacterias gram negativas y presentan una gran actividad en los procesos inmunológicos, además se han empleado para la obtención del MGI. (14, 38, 52, 56, 58) mediante una inyección intravenosamente de endotoxinas de (Salmonella typhosa), los ratones producen una gran actividad biológica en su suero cuando éste fué cultivado con células indiferenciadas, en medio semisólido de agar.

Remarcando el propósito de este trabajo, fué demostrar que mediante un cultivo de macrófagos se obtiene una proteína (MGI) que se encarga de la diferenciación de los precursores celulares de granulocitos y monocitos y que la aparición del receptor Fc es parte del camino hacia la diferenciación celular.

METODOLOGIA

ANIMALES

Se emplearon ratones de la cepa CD-1 de 4 a 8 semanas de nacidos.

OBTENCION Y CULTIVO DE MACROFAGOS

La cavidad peritoneal de los ratones fué estimulada mediante una inyección de 2.5 ml. de caseinato de sodio (Difco Lab. Detroit Michigan U.S.A.), al 10% en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS), (CaCl_2 0.10 grm/L, NaCl , 8 grm/L. $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.16 grm/L, KH_2PO_4 0.20 grm/L, MgCl_2 0.10 grm/L, - KCl 0.20 grm/L) a un pH de 7.2 esterilizado por autoclave. -- Después de 4 días de la inyección los animales fueron sacrificados por deservicación y las células de la cavidad peritoneal recogidas mediante inyección de lavado de 15 ml. de PBS -- por cada animal. Las células fueron colocadas en tubos de centrifuga de 50 ml. para posteriormente adicionarles medio -- EAGLE'S (Gibco, Gran island Biological company New York -- 14072), y suplementado con 10% de suero fetal de becerro FCS (Gibco, New York 14072 U.S.A.), desactivado a 56°C durante 30 min. agregando en este medio los elementos que utilizados co-

mo microacarreadores (CYTODEX 1 Pharmacia Fine Chemicals AB - Uppsala, Suecia), previamente esterilizados e hinchados con PBS, en una concentración de 4×10^5 microacarreadores por plato petri de 50 X 10 mm.

Después de 24 hrs. de incubación a 37°C con 10% de CO₂ y una humedad relativa 95%, los microacarreadores con las células adheridas fueron lavadas con PBS mediante 2 centrifugaciones a 900 g y activados con una concentración de LPS de Salmonella typhosa (Difco, la Detroit Mich. U.S.A.), de 10 µg/ml. por plato petri incubado el tiempo necesario en las condiciones anteriores expuestas según el caso. Al término de la incubación, se recolectaba todo el medio condicionado y se centrifugaba a 900 g. durante 10 minutos, decantando posteriormente el medio y guardándolo en un recipiente estéril a 20°C para su posterior utilización.

CULTIVO DEL PULMON

Para los ensayos biológicos se tomó el cultivo con medio condicionado por pulmón como un control positivo, ya que tiene una gran actividad biológica.

Se inyectaron ratones (intravenosamente) con 20 µg/ml. - de LPS solubilizados en 0.2 ml. de PBS y esterilizados durante 15 min. en una autoclave, después de 6 hrs. de la inyección los ratones fueron decervicados extrayéndoles los pulmones -- que después se cultivaron en 5 ml. de medio EAGLE'S durante - 48 hrs. en las mismas condiciones anteriormente especificadas. El medio fué colectado por una centrifugación a 900g durante 5 minutos y guardándolo para su posterior utilización a 20°C. (13, 27).

CULTIVO DE CELULAS INDIFERENCIADAS

Las células de médula ósea fueron extraídas de los fémures de los ratones y se cultivaron el tiempo necesario según el caso en medio EAGLE'S con 10% FCS, adicionándole medio condicionado obtenido de pulmón y de macrófagos (MGI). Para la - comprobación de actividad biológica se utilizó el bioensayo - de formación de rosetas EA que a continuación se describe.

La formación de rosetas con eritrocitos de borrego se hizo usando la modificación empleada para BIANCO et al en 1970.

Los eritrocitos de borrego fueron incubados con una con-

centración de 1:600 de IgG (Cordis Lab. Miami Flo., 33137, U. S.A.), durante 30 min. a 37°C la determinación del porcentaje de rosetas fué determinado con 1×10^8 eritrocitos EA que fueron mezclados con 1×10^6 de células indiferenciadas de médula ósea manteniéndolas en cultivo y expuestas a 1 ml. de medio condicionado MGI (obtenido del cultivo de macrófagos de cavidad peritoneal).

Las células fueron puestas en tubos de centrifuga de 15 ml. realizando un lavado con PBS por medio de una centrifugación a 900g durante 5 minutos (en tres ocasiones para eliminar el medio de cultivo) y posteriormente adicionándoles los eritrocitos EA en un volumen de 0.5 ml. preparados con PBS y centrifugados durante 3 min. a 500g e incubadas 30 min. a 37°C sin resuspenderlas. Finalmente las células fueron resuspendidas por pipetación utilizando una pipeta Pasteur y el porcentaje de células con más de 8 eritrocitos se determinó como roseta por conteo en el hemocitómetro. (2, 3).

RESULTADOS

DESCRIPCION DE RESULTADOS

Los resultados descritos en la Tabla I fueron de células de médula ósea que se cultivaron con la proteína diferenciadora obtenida del cultivo de pulmón, (el cual se tomó como testigo positivo de dicha actividad diferenciadora) y que representa un 15% de rosetas, como testigo negativo se utilizaron células de fémur cultivadas sin medio que contenga activador de la diferenciación celular (61), obteniéndose un 2% de formación de rosetas. Cabe señalar que para obtener el por ciento en cada uno de los casos incluyendo los demás resultados, cada experimento se efectuó cuatro veces y por duplicado.

El 12% de rosetas para el MGI obtenido del cultivo del - macrófago de cavidad peritoneal en una concentración de 8×10^6 (activados con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lipopolisacáridos de S. typhosa).

Las células de médula ósea que fueron obtenidas de ratones previamente se trataron con LPS, manifestaron el 14% de rosetas obtenidas para este caso.

En la Tabla II podemos observar la cantidad de rosetas - obtenidas del cultivo de macrófagos en diferentes concentra-- ciones y cultivando células de fémur también en diferentes -- concentraciones. Como control positivo se utilizó medio del - cultivo de pulmón en el que se observó un 18% de formación de rosetas. El control negativo fué el cultivo de células de mé- dula ósea sin medio condicionado.

En la Tabla II la cantidad de rosetas observadas para el número de células de médula ósea en una concentración de 8×10^6 y MGI (obtenido del cultivo de macrófagos en una concen-- tración de 8×10^6), correspondieron a un porcentaje de rose- tas del 15%. El 16% de rosetas que se observó para el MGI de macrófagos en una concentración de 16×10^6 y que posterior-- mente se cultivó con 16×10^6 células indiferenciadas. También se puede observar un 17% de la formación de rosetas, para el MGI obtenido de 32×10^6 macrófagos y cultivando la misma can- tidad de células indiferenciadas de médula ósea para el con-- trol negativo se observaron valores de el 2% en la formación de rosetas.

En otro experimento en donde los ratones fueron inyecta- dos intravenosamente con LPS y sacrificados después de 6 hrs.

T A B L A I

% ROSETAS	MEDIO CONDICIONADO
15	Pulmón
2	_____*
12	Macrófagos de cavidad peritoneal
14	LPS

* Células fémur cultivadas sin medio que contenga MGI
 LPS Células de médula ósea de ratón inyectado por 6 hrs
 con lipopolisacáridos y cultivados por dos días para la medición de rosetas.

T A B L A II

% ROSETAS	MEDIO CONDICIONADO	Nº DE CELULAS DE MEDULA OSEA
15	MGI de cultivo de macrófagos 8×10^6	8×10^6
16	MGI de cultivo de macrófagos 16×10^6	16×10^6
17	MGI de cultivo de macrófagos 32×10^6	32×10^6
2	_____*	16×10^6
18	MGI del cultivo de pulmón	16×10^6

* Sin medio condicionado.

Gráfica A

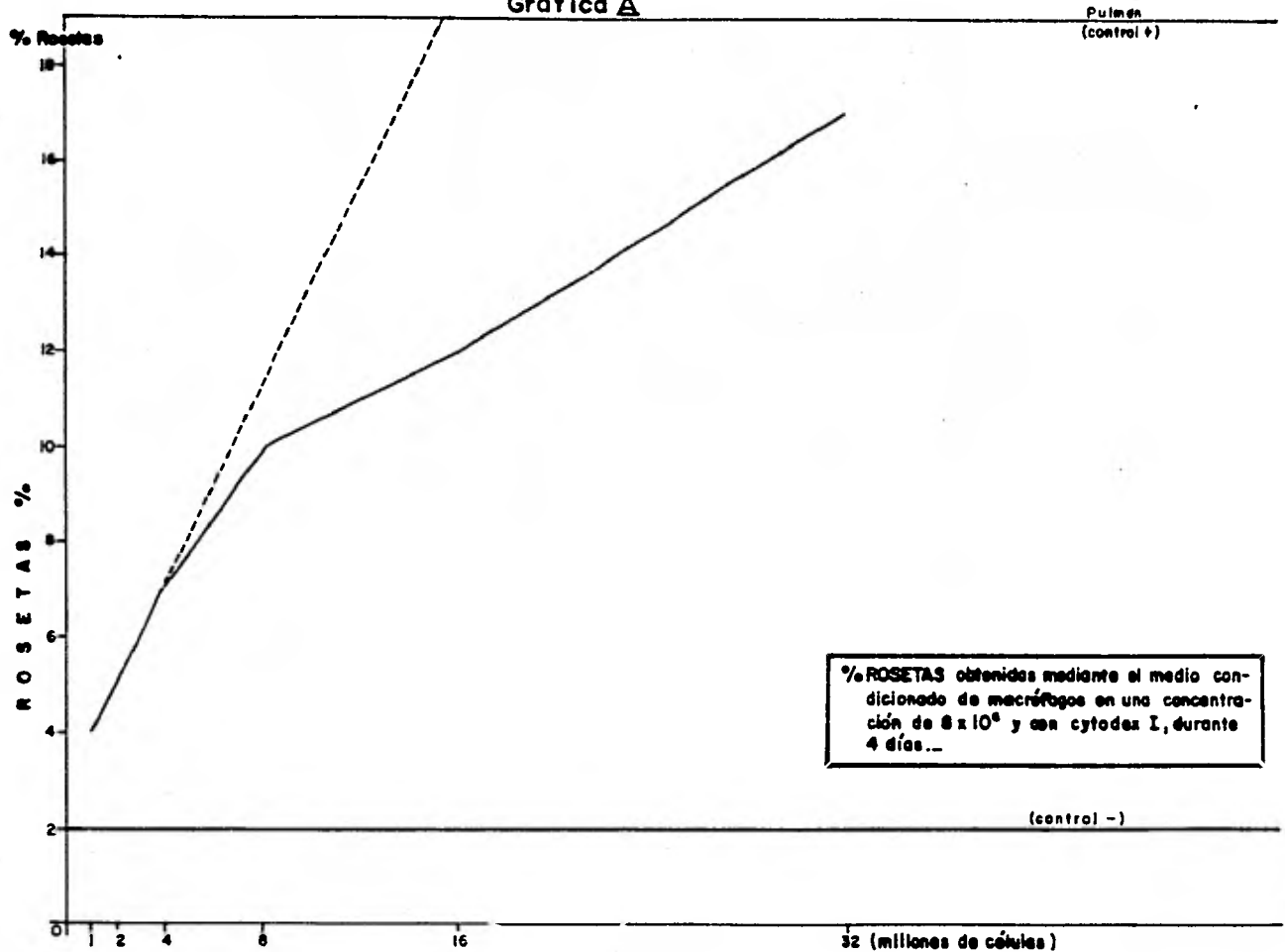
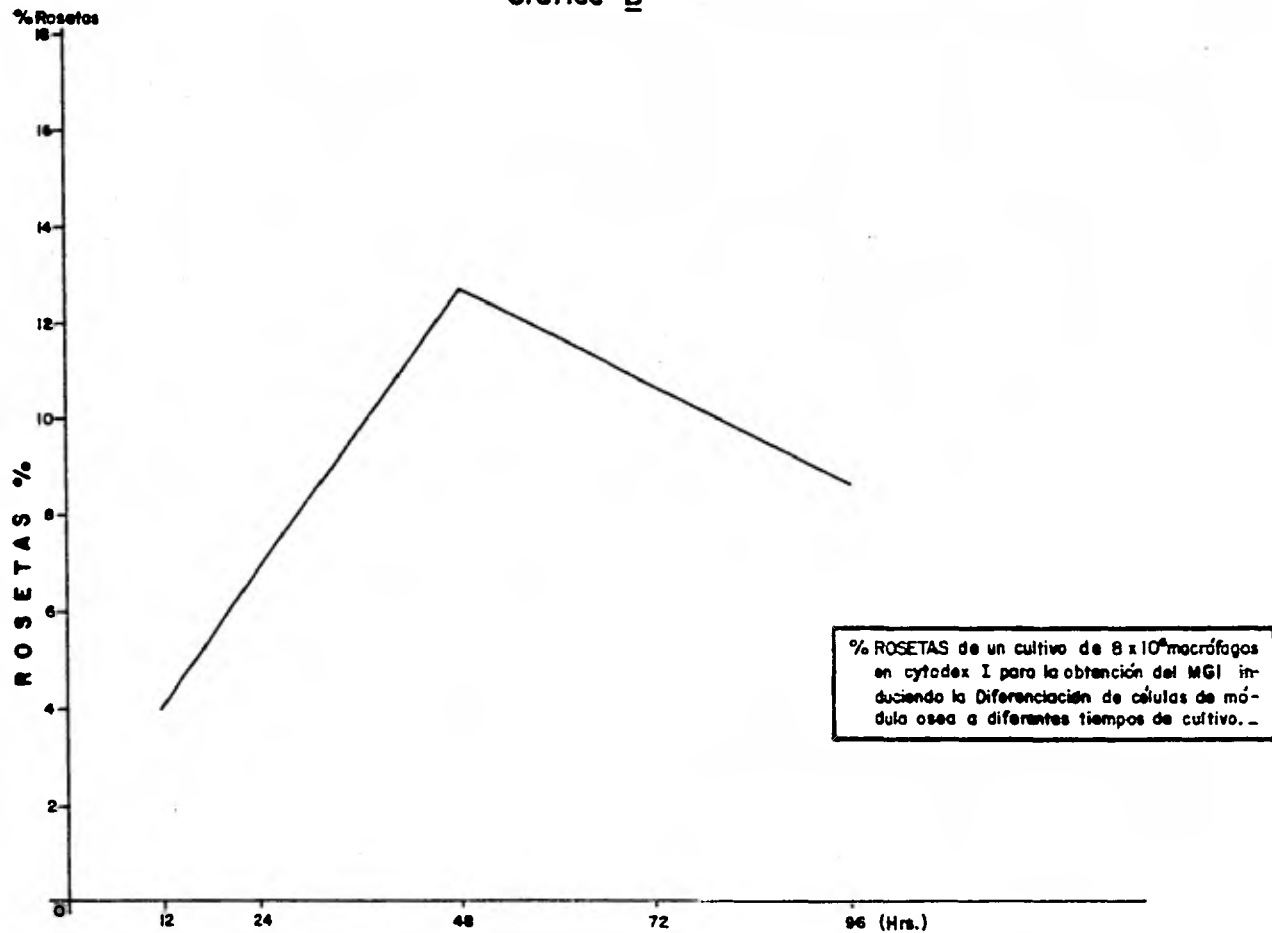
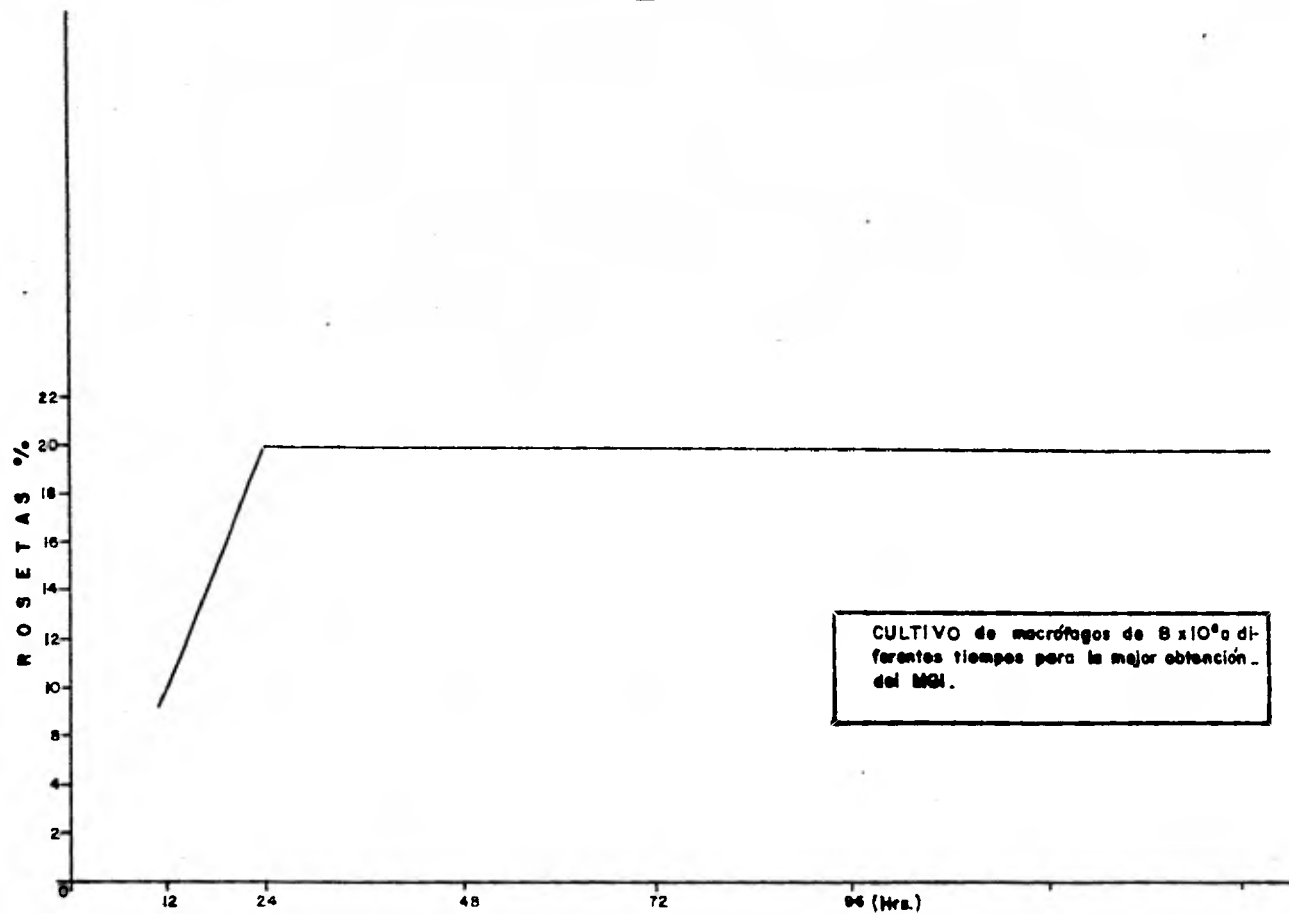


Gráfico B



Gráfica C



las células indiferenciadas presentaron una concentración del 8% de rosetas, también se sacrificaron a ratones sin ser inyectados para medirse la cantidad de rosetas y estas células indiferenciadas presentaron una concentración del 2%. Esto parece indicar que el factor inmunológico (Fc) existe en las células indiferenciadas de la médula ósea de los ratones, pero necesitan un activador para que se manifieste (89).

La gráfica A, nos representa los valores de las rosetas obtenidas con una concentración constante de células indiferenciadas expuestas al medio condicionado, (obtenido del cultivo de macrófagos de cavidad peritoneal). La línea en sentido horizontal en la parte superior de la gráfica nos indica el valor obtenido por el control positivo que en este caso -- fué medio condicionado obtenido del cultivo de los pulmones del ratón, la línea horizontal de la parte inferior nos dá la cantidad de rosetas para nuestro control negativo.

En valores encontrados para el MGI proveniente del cultivo celular de macrófagos, se puede observar que a medida que la cantidad de células de cavidad peritoneal fueron cultivadas, la respuesta de la aparición de rosetas también se fué incrementando. La línea punteada representa el valor que se -

esperaría aumenten las rosetas si no existiese alguna inhibición. Evidentemente existe inhibición, ya que la línea de los valores encontrados presenta una inflexión y es posible suponer que sea debido a la falta de células indiferenciadas que actúen como posibles receptores al MGI. Datos que apoyan esta idea se pueden observar en la Tabla II. (7, 11, 42, 45, 73).

En la Gráfica B, se observa la cantidad de rosetas obtenidas con medio condicionado (MGI, obtenido de un cultivo de macrófagos en una concentración de 8×10^6 , utilizando como área de adhesión celular CYTODEX I) induciendo a la diferenciación células del fémur del ratón en donde el mejor tiempo para medir la cantidad de rosetas es de 48 hrs. y por consiguiente a medida que avanza el tiempo, la cantidad del número de rosetas también decrece.

Resultados mucho menores se observan para el tiempo de 72 hrs. y mucho más pequeños a las 96 hrs. De los resultados obtenidos en el tiempo óptimo de cultivo celular para las células indiferenciadas del fémur del ratón es de 48 hrs. con una cantidad de 12.7% de rosetas.

La Gráfica C, representa la cantidad de rosetas obteni--

das por la actividad diferenciadora del medio condicionado -- (del cultivo de macrófagos, de la cavidad peritoneal de los ratones en una concentración de 8×10^6) que fué obtenido a diferentes tiempos. El MGI obtenido a las 12 hrs. reporta un 10% en la formación de rosetas y para las 24 hrs. el MGI obtenido presenta una respuesta casi similar para los demás tiempos, ya que para 24 hrs. la cantidad de rosetas es de 20% para las 48 hrs. de 20.5% y así sucesivamente se pueden observar los resultados que por consiguiente parece ser que la cantidad de MGI óptima se puede obtener a las 24 HRS. aunque es conveniente cultivar a los macrófagos el doble de tiempo, con el fin de tener una mayor seguridad de que el MGI, se encuentre en el medio de cultivo.

DUSCUSION Y CONCLUSIONES

El presente trabajo fué realizado usando una proteína diferenciadora de células mieloides provenientes de un cultivo de macrófagos de cavidad peritoneal activados previamente por una inyección de caseinato de sodio y cultivados en medio líquido con microacarreadores, con la finalidad de incrementar la superficie de adhesión celular, para obtener una mayor producción de la proteína diferenciadora, se utilizaron lipopoli sacáridos (LPS) de Salmonella typhosa.

La medición de la diferenciación celular de las células de médula ósea expuestas a este medio condicionado, fué me--- diante un bioensayo que determina la formación de rosetas Fc, la aparición del receptor a Fc en la membrana celular forma - parte de la inducción hacia el camino de la diferenciación ce lular.

Según los resultados obtenidos en este trabajo se puede observar que las células de médula ósea no presentan receptor a Fc, ésto no significa que in vivo no tengan dicho receptor pues se ha reportado que el receptor Fc se encuentra ya desde la etapa de mielocito (89). En consecuencia de alguna manera, este receptor no se manifiesta in vitro, probablemente debido

a la falta de un activador que desencadene la manifestación - del receptor Fc.

En animales que fueron tratados con LPS en donde se les inyectó intravenosamente 20 ug. en .2 ml de PBS y aplicada in travenosamente presentaron una marcada diferencia en los porcentajes de rosetas (8%), comparados con animales que no fueron tratados con LPS en cuyo caso las células extraídas del - fémul presentaban un 2% de rosetas.

Nuestros resultados indican que de alguna forma las célu las necesitan de un mecanismo activador para que el receptor Fc se manifieste. Wintrobe en 1974 (89) reporta que los metamielocitos permanecen de 8 a 14 días en el compartimiento de maduración de la médula ósea, posteriormente sale[^]s al torrente sanguíneo y finalmente al tejido en forma de polimorfonu-- cleados. Es claro en consecuencia, que si los metamielocitos presentan receptores Fc in vivo y los polimorfonucleados no - tienen estos receptores in vitro y los últimos son más dife-- renciados, entonces algún mecanismo existe in vitro para la - inducción del receptor Fc y que ésta inducción pueda ser me-- diada por lipopolisacáridos.

Las condiciones encontradas para la mejor obtención de la proteína diferenciadora resultaron ser las siguientes: El número de células de cavidad peritoneal de 8 millones, resultó ser saturante ya que con 36 millones de macrófagos en 5 ml de medio de cultivo la actividad resultó ser igual (Gráfica C) sin embargo, durante el desarrollo de este trabajo y con el fin de tener una mayor seguridad en la presencia de la proteína diferenciadora en el medio de cultivo, se consideró necesario dejar a los macrófagos 4 días (Gráfica A) y con una concentración de 8 millones de macrófagos de cavidad peritoneal, ya que ninguna actividad inhibitoria se manifestó.

Al aumentar la cantidad de células indiferenciadas inducidas por el medio condicionado, el porcentaje de receptores Fc incrementaba, por lo tanto, se puede suponer que el número de células indiferenciadas de médula ósea están en relación directa al porcentaje del número de rosetas formadas por la totalidad de las células y que el número total de rosetas que se pueden inducir depende exclusivamente del número de precursores presentes. La línea punteada en la Gráfica A ilustra esta observación y es posible pensar en consecuencia que en nuestros experimentos exista un mayor número de células indiferenciadas como probables receptores a la proteína diferen-

ciadora.

Es necesario señalar que en la elaboración de este trabajo no se realizó ningún proceso de purificación bioquímico, - para obtener la molécula diferenciadora, sino unicamente se - trabajó con el medio obtenido directamente del cultivo de macrofagos activados con LPS con la finalidad de probar que mediante la técnica de formación de rosetas se obtienen resultados mucho más rápidos que utilizando el bioensayo en medios - semi-sólidos de agar que es la técnica habitual y que toma 7 días en lugar de dos días para obtener resultados como es el caso con las rosetas, la técnica de rosetas presenta la ventaja adicional de reducir los riesgos de contaminación ya que - el tiempo de cultivo es mucho más corto.

La utilización de microacarreadores primeramente descubiertos por Van Wezel (82, 83, 84, 85), presenta muchas ventajas para los sistemas de cultivo in vitro , ya que como se incrementa la superficie sólida de cultivo, la cual ofrece un soporte a las células, fácil manejo, reduciendo el control físico-químico (la elaboración del mismo) facilitando de esta forma su empleo y disminuyendo los grandes riesgos de la contaminación pues el manipuleo se puede reducir a un mínimo. En

este trabajo se intentó aprovechar las ventajas de los microacarreadores para producir la proteína diferenciadora (MGI) a partir de células fagocíticas que evidentemente se prestarían por sus propiedades de adherencia a ser cultivadas en estos microacarreadores.

Resumiendo los resultados reportados en este trabajo son:

1. La detección de la proteína diferenciadora MGI que se encuentra en el medio de cultivo obtenido de macrófagos de cavidad peritoneal, es más rápida y por lo tanto, efectiva cuando se mide la aparición de rosetas que cuando se utiliza la técnica tradicional del bioensayo en agar, ya que el tiempo para la obtención de resultados es mucho más corto y por ende el trabajo se reduce enormemente.
2. Las células de médula ósea necesitan de un activador, (probablemente los lipopolisacáridos) para la aparición del Fc.
3. Es la primera ocasión que se utiliza la técnica de los microacarreadores para producir la proteína diferenciadora MGI, lo cual abre el camino para un cultivo en masa y una producción de MGI con posibles aplicaciones terapéuticas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr, Benny Weiss S. por su asesoría, ayuda, apoyo y su gran amistad.

A los señores Profesores: M. EN C. Marcela Esperanza Aguilar Morales, Dra. Luz María López de la Rosa, M. EN C. Clara Esquivel Huesca, Biol. Ana María Ramos Velázquez, Biol. Miguel A. Salas P., y al Biol. Miguel A. Bello, por hacer importantes sugerencias al presente trabajo.

Al Sr. David Hidalgo y al Ing. Luis Jorge Flores Rodríguez por su gran apoyo.

A mi familia y amigos que en todos los momentos son la parte esencial de mi superación y a todas aquellas personas que de una u otra forma hicieron posible la culminación del presente trabajo.

REFERENCIAS

- Adolphe, M. Fontagne, J; Pelletier, M. y Giroud, J. P. Induction of syntesis in rat macrophage in vitro by inflammatory exudate. Nature 253, 637, 1975.
- Alexander J. E.; Andrews J. A.; Lesli R. G. Q. y Wood W. J. - The binding of human and guinea pig IgG subclasses to homologues macrophage and monocyte Fc receptors. Immunol. 35, 115. 1978.
- Apte, R. N.; Galanos, C. y Pluznik, D. H. Lipid A, the active part of bacterial endotoxins in inducing serum colony -- stimulating activity and proliferation of splenic granulocyte/macrophage progenitor cells. J. Cell. Physiol. 87, 71. 1975.
- Apte, R. N., Hertogs, C. F. Pluznik, D.H. Regulation of lipopolysaccharide- induce granulopoiesis and macroplage formation by spleen cells. I. Relationship between colony - stimulating factor release and lymphocyte activation In vitro. J. immunol. 118, 1435, 1977.
- Arend W. P. y Mannik M. The macrophage receptor for IgG: num-

ber and affinity of binding sites. J. Immunol. 110, 1445. 1975.

Austin, P. E., Mc. Culloch, E. A. y Till J. E. Characteriza--
tion ot the factor L-cell conditioned medium captable of
stimulating colony formation by mouse marrow cells in --
culture. J. Cell. Physiol 77, 121. 1971.

Austin, P. E. Mc. Culloch, E. A. y Till, J. E. Stimulation of
uptake of Tritiated Thymidine into mouse marrow cells in
culture by factor From L. cell conditioned medium J. cell
Physiol. 79, 181. 1972.

Bradley, T. R. y Metcalt, D. The growth of mouse bone marrow
cells In vitro. Aus. J. Exp. Biol. med. Sci. 44, 287. --
1966.

Bradley, T. R., Metcalt, D. y Robinson, W. Stimulation by leu
kaemic sera of colony formation In Solid agar cultures -
by Proliferation of mouse bone marrow cells. Nature 213,
926. 1967.

Bradley, T. R., Stanley, E. R. y Summer, M. A. Factors from --

mouse tissues stimulating colony growth of mouse marrow cells In vitro. Aust. J. Exp. Biol. med. Sci. 49, 595. - 1971.

Bradley, T.R. Summer, M. A. Stimulation of mouse bone marrow colony growth In vitro by conditioned medium. Aust. J. -- Exp. Biol. med. Sci. 46, 607. 1968.

Brown, C. H. III and Carbone, P.P. In vitro growth of normal and leukemic human bone marrow. J. Nat. Cancer Inst. 46, 989. 1971.

Burgess, A. W., Camakaris, J. y Metcalt, D. Purification and Properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium. J. Biol. Chem. 252, 1998. 1977.

Burgess, A. W., Wilson, E. M. A. y Metcalt, D. Stimulation by human placental conditioned medium of hemotopoietic colony formation by human marrow cells. Blood 49, 573. 1977.

Chan, S.A., Metcalt, D. y Stanley, E. R. Stimulation and inhibition by normal human serum of colony formation In vitro by bone marrow cells. Br. J. Haematol. 20, 329. 1971.

- Chervenick, P. A. Effect of endotoxin and postendotoxin plasma on In vitro granulopoiesis. J. Lab. Clin. Med. 79, -- 1011. 1972.
- Chervenick, P. A. y Boggs, D. R. Bone marrow. Colonies: Stimulation In vitro by supernatant from incubated human blood cells. Science 169, 691. 1970.
- Chervenick, P. A. y Lo Buglio, A. F. Human blood monocytes: - Stimulators of granulocyte and mononuclear colony formation In vitro. Science 178, 164. 1972.
- Chu, J. y Lin, H. Induction of macrophage colony forming cells in pleural cavity. J. Reticuloendothel. Soc. 20, 299. 1976.
- Cifone, M. y Defandi, V. Cyclic expression of growth conditioning factor (MGF) on the cell surface. Nature 252, 151. 1974.
- Cifone, M., Mocarelli, P. y Defendi, V. In vitro production - of a macrophage growth factor. Exp. Cell. Res. 96, 96. 1975.

Cline, M. J., Warner, N. L. y Mercalt, D. Identification of -
the bone marrow colony mononuclear Phagocyte as a macro-
phage. Blood 39, 326. 1972.

Creighton W. D., Lambert P. H. y Niescher P. A. Detection of
antibodies and Soluble antibody complexes with polyethy-
lano glycol. J. Immunol. 111, 1219. 1973.

Darrington K. J. Properties of the Fc receptor on macrophages
and monocytes Immunol. Commun. 5, 263, 1976.

Dickler, H. B. Lymphocyte receptors of Immunoglobulin. Adv.
Immunol. 26, 167. 1976.

Eaves, A. C. y Bruce, W. R. In vitro production of colony sti-
mulating activity. Cell tissue Kinet 7, 19. 1974.

Fojo, S. A., Wu, M. C., Gross, M. A. y Yunis, A. A. The Isola-
tion and characterization of a colony stimulating factor
from human ung. Biophys. acta 494, 92. 1977.

Golde, D. W. y Cline, M. J. Identification of the colony-sti-
mulating cells in Human peripheral blood. J. clin. Invest.
51, 2981. 1972.

Granstrom, M. y Gahrton, G. Colony-forming and colony-stimulating cells In normal human Peripheral blood. Exp. Cell.

Res. 80, 372. 1973.

Guez, M. y Sachs, L. Purification of the protein that Induces cell differentiation to macrophages and granulocytes. --

Febs. lett. 37, 149. 1973.

Iscove, N. N., Senn, J. S., T. II, J. E. y Mc Culloch E. A. -

Colony formation by normal and leukemic human marrow - -

cells in culture: Effect of conditions medium from hu--

man leukocytes. Blood 37, 1, 1971.

Knudtzon Sand Mortensen, B. T. Growth. Stimulation of human -

bone marrow cells in agar culture by vascular cells. - -

Blood 46, 937. 1975.

Landau, T. y Sachs, L. Characterization of the inducer requie

red for the development of macroplage and granulocyte co

lonies. Proc. Natl. Acad. Sci. 68, 2540. 1971.

Levine, D. W., Wong, J. S. Wang, D.I.C. et al. Microcarriers

cell culture: New Wethods for research-scale application.

Somatic cell Res: 3 149, 155. 1977.

Lin, H. Colony formation In vitro by mouse blood monocytes. -
Blood 49, 593. 1977.

Lin, H. y Freeman, P. G. Peritoneal exudate cells. IV Characterization of colony forming cells. J. cell. Physiol. 90,
407. 1977.

Lin, H. Kihn, C. y Kuo, T. Clonal growth of hamster free alveolar cells in Solft agar J. Exp. Med. 142, 877. 1975.

Lin, H. y Stewart, C. C. Peritoneal exudate cells. I Growth requirement of cell capable of forming colonies In Soft agar. J. cell. Physial. 83, 369. 1974.

Lin, H. y Stewart, C. C. Colony formation by mouse peritoneal exudate cells In vitro Nature (New Biol.) 243, 176. 1973.

Mac Vittie, T. O. y Mc Carthy, K. F. The direction of In vitro monocyte-Macro Phage colony forming cells In Mouse Thymus and lymph nodes: cell. Physiol. 92, 203. 1977.

Mavel, J. y Defendi, V. Regulation of DNA. Synthesis In mouse macrophage. I. Sources, Action an Purification of the macrophage growing Factor (MGF) Exp. Cell. Res. 65, 33. -- 1971.

Mavel, J. y Defendi, V. Regulation of DNA. Synthesis In mouse macrophages II. Studies of mechanisms of action of the - macrophage growth factor. Exp. Cell, Res. 65. 377. 1971.

Mc. Neil, T. A. y Fleming, W. A. Celular responsiveness to stimulation In vitro: Strain differences in hemopoietic colony forming cell responsiveness to stimulating factor - and suppression of responsiveness by glucocorticoids. J. cell physiol. 82, 49. 1973.

Metcalt, D. Awte antigen-induced elevation of serum colony -- stimulating factor (CSF) levels. Immunology 21, 427. - - 1971.

Metcalt, D. Regulation of granulocyte and monocyte-macrophage Proliferation by colony stimulating factor (CSF): A. re-view. Exp. Hemat. 1, 185. 1973.

Metcalt, D., Bradley. T. R. y Robinson, W. A. Analysis of colonies developing In vitro from mouse bone marrow cells stimulated by Invalving "Feeder layers" and laukemic serum J. cell Phusiol 69, 93. 1967.

Metcalt, D., y Fostev. R. Bone marrow colony-stimulating activity serum from nice with vival-induced leukemia. J. - - Natl. cancer Inst. 39, 1235. 1967.

Metcalt, D., Parker, J., Chester, H. M. y Kincade, P. W. Formation of eosinophilic-like granulocytic colonies by mouse bone marrow cells In vitro. J. Cell, Physiol. 84, 275 1974.

Mintl, V. y Sachs, L. Differences In Inducing activity for human bone marrow colonies In normal serum and serum from patients with leukemia. Blood 42, 331. 1973.

Moore, M. A. S. y Williams, N. Physical separation of colony stimulating cells from In vitro colony forming cells in hemopoietic tissue. J. Cell. Physiol. 80, 195. 1972.

Ovary 2, Saluk D. H. Quijada I. y Lamm M. E. Biologie activi-

ties Immunoglobulin G. In relation to domains of Fc regions J. Immunol. 116, 1265. 1976.

Paran, M., Sachs, L., Barak, Y. y Resnitzky. P. In vitro induction of granulocyte differentiation in hematopoietic cells from leukemic and non-leukemic patients. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 67. 1542.

Parker, J. W. Metcalf, D. Production of colony stimulating factor In mixed leucocyte cultures. Immunology 26, 1039. 1974.

Parker, J. W. Metcalf, D. Production of colony stimulating factor In mitogen-stimulated lymphocyte culture. J. Immunol. 112, 502. 1974.

Pike, B. L. y Robinson. W. A. Human bone marrow colony growth In agar-gel. J. Cell. Physiol. 76, 77. 1970.

Prince, G. B., McCulloch. E. A. y Till, J. E. A new human low molecular weight granulocyte colony stimulating activity. Blood 42, 341. 1973.

Prince, G. B., Senn, J. S., Mc Culloch, E. A. y Till J. E. Heterogeneity of molecules with low molecular weight from media conditioned by human leukocytes and stimulating colony formation by human granulopoietic progenitor cells. - J. Cell Physiol. 84, 383. 1974.

Prival, J. T., Paran, M. Gallo, R. C., y Wu A. M. Colony-stimulating factors in cultures of human peripheral blood cells. J. Natl. Cancer Inst. 53, 1583. 1974.

Quesanberry, P., Morley, A., Stohlman, F. J., Richard, J. Howard, D. y Smith M. Effect of endotoxin on granulopoiesis and colony-stimulating factor. N. Engl. J. Med. 286, 227. 1972.

Robinson, W. A., Metcalf, D. y Bradley, T. R. Stimulation by normal and leukemic mouse sera of colony formation In vitro by mouse bone marrow cells. J. Cell. Physiol. 69. 83 1967.

Robinson, W. A. y Pike, B. Leukopoietic activity in human urine. N. Engl. J. Med. 282, 1291. 1970.

Robinson W. A., Stanley, E. R. y Metcalf, D. Brist Report: --
Stimulation of bone marrow colony growth In vitro by human urine. Blood 33., 396. 1969.

Ruscetti, F. W., y Chervenick, P. A. Release of colony-stimulating factor from monocytes by endotoxin and Polyinosinicpolycytidylic acid. J. Lab. Clin. Med. 83, 64. 1974.

Russo, M. y Lutton, J. D. Decreased In vitro and In vitro colony stimulating activity responses to bacterial lipopolysaccharide in C3H/HeJ mice. J. Cell. Phusiol. 92, 303. -- 1977.

Sheridan, J. W. y Metcalf, D. Studies on the bone marrow colony stimulating factor (CSF): Relation of tissue CSF to serum CSF. J. Cell. Physiol. 80, 129. 1972.

Sheridan, J. W. y Metcalf, D. The bone marrow colony stimulating factor (CSF): Relation serum CSF to urine CSF. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 144, 785. 1973.

Sheridan, J. W. y Metcalf, D. A low molecular weight factor - in lung-conditiones medium stimulating granulocyte and -

monocyte colony formation In vitro J. Cell. Physiol. 81, 11. 1973.

Sheridan, J. W. y Metcalt, D. Purification of mouse lung-conditioned medium colony stimulating factor (CSF) (38073). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 146, 218. 1974.

Sheridan, J. W. y Metcalt, D. y Stanley E. R. Further studies on the factor in lung-conditioned medium stimulating gra nulocyte conditioned medium stimulating granulocyte and monocyte colony formation In vitro. J. Cell. Physiol. 84 147. 1974.

Sheridan, J. W. y Stanley, E. R. Tissue sources of bone marrow colony stimulating factor. J. Cell. Physiol. 78, 451. -- 1971.

Stanley, E. R., Bradley, T. R. y Sumer, M. A. Properties of the mouse ambryo conditioned medium factor (S) stimulating colony formation by mouse bone marrow cells growth In vitro. J. Cell. Physiol. 78, 301, 1971.

Stanley, E. R. Cifone, M., Heard, P. M. y Defendi, V. Factors

regulating macrophage production and growth: Identify of colony-stimulating factor and macrophage growth factor.

J. Exp. Med. 143, 631. 1976.

Stanley, E. R. Hansen, G. Woodcock, J. y Metcalt, D. Colony stimulating factor and the regulation of granulopoiesis and macrophage Production. Fed. Proc. 34, 2272. 1975.

Stanley, E. R. y Heard, P. M. Factors regulating macrophage - production and growth. J. Biol. Chem. 252, 4305. 1977.

Stanley, E. R. y Metcalt, D. Partial Purification and some -- Properties of factor In normal and leukaemic human urine stimulating mouse bone marrow colony growth In vitro. -- Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 47, 467. 1969.

Stanley, E. R. y Metcalt, D. The molecular weight of colony - stimulating factor. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137, 1029 1971.

Stanley, E. R. Metcalt, D., Maritz, J. S. y Yeo, G. F. Stan-- dardized bioassay for bone marrow colony stimulating fac-- tor In human urine: levels in normal man. J. Lab. Clin.

Med. 79. 657. 1972.

Stanley, E. R. Robinson, W. A. y Ada, G. L. Properties of the colony stimulating factor in leukaemic and normal mouse serum. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 46, 715, 1968.

Stewart, C. C., Lin, H. y Adles, C. Proliferation and colony forming ability of Peritoneal exudate cells In liquid -- culture. J. Exp. Med. 141, 1114. 1975.

Van der Zeijst, B. A. M., Stewart, C. C. y Schlesinger, S. -- Proliferative capacity of mouse Peritoneal macrophages - In vitro. J. Exp. Med. 147, 1253. 1978.

Van Wezel, A. L. Growth of cell strains and Primary cells on microcarriers in homogeneous culture. Nature 216, 64, 65 1967.

Van Wezel, A. L. Microcarrier cultures of animal cells, In -- "Methods and Applications of tissue culture" (Druse, P. F., Patterson, M. K., J. eds.) Academic Press. New York 372, 377. 1973.

Van Wezel, A. L. The large scale cultivation of diploid cell strains in microcarrier culture improvement of microcarriers. *Devalop Biol. Standards* 143, 147. 1977.

Van Wezel, A. L. Van der Velder de Groot, CAM. Large Scale -- Cultivation of animal cells In microcarrier culture. *Process Biol. Chem.* 6, 8. 1978.

Viroloinen, M. y Defendi, V. Dependence of macrophage growth In vitro upon interaction with other cell tupes. In growth regulating substances for animal cells In culture, - (V. Defendi and M. Stoker, eds.) The wistar institute, - Philadelphia, P. A. 67, 1967.

Watson, J. y Prichard, S. Characterization of a factor required for the differentiation of myeloid and lymphoid - - cells In vitro. *J. Immunol.* 108, 1209. 1972.

Weiner, H. L. y Robinson, W. A. Leukipoietic activity in human urine following operative procedures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 136, 29. 1971.

Wintrobe, M. M., Lee R. G., Boggs R. D., Bithell C. T., Athe-

ns W. J., Foerster J. Clinical Hematology 7a. edición. -
ed. Lea y Febiger 221, 286. 1974.

Worton, R. G., McCulloch, E. A. y Till, J. E. Physical separation of hemopoietic stem cell from cells forming colonies in culture. J. cell. Physiol. 74, 171. 1969.

Wyne, K. M. Spector, W. G. y Willoughby, D.A. Macrophage Proliferation In vitro induced by exudates Nature 253, 636. 1975.