UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"Variación de los Factores Inductores a la Formación de Receptores Fc (FcRI) y C_3 (C_3RI) Existentes en Sueros de Pacientes Leucémicos y la Caracterización del Factor C_3RI en Medio Condicionado de Pulmón Humano"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A:

FRANCISCO VALDES VEGA

México, D. F. 1985

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E .

	Pags.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
OBJETIVOS	16
MATERIALES Y METODO	18
RESULTADOS	24
DISCUSION	36
BIBLIOGRAFIA	40
APENDICES	48

RESUMEN.

El ser humano requiere de la existencia de mecanismos reguladores de la proliferación y diferenciación de las células que integran su tejido hematopoyético, para un funcionamiento normal. Estos mecanismos dependen de una delicada y compleja interacción entre células y factores humorales. Entre los factores conocidos, el más estudiado es el inductor a la proliferación y diferenciación de granulocitos y macrófagos, llamado MGI.

Recientemente se encontró que para que una célula mieloide llegue a una diferenciación completa, es indispensable la interacción de otros factores; entre éstos se encuentran al FcRI y C_3RI los cuales tienen la función de inducir la aparición de receptores Fc y C_3 en las membranas de las células mieloides. Se ha encontrado que la producción de MGI, FcRI y C_3RI es llevada a cabo por los macrófagos, lo cual indica la posible existencia de un mecanismo de autorregulación de este tipo celular.

Cuando existe alguna falla en los mecanismos de regulación homeostático, se presentan las diferentes enfermedades hematológicas. Estas fallas pueden ser debidas a variaciones en la producción de los factores reguladores, ó defectos celulares que impidan la acción reguladora, como en el caso de la leucemia.

Con la finalidad de determinar los niveles de FcRI y C_3RI en el torrente sanguíneo humano, se evaluaron éstos en sueros provenientes de donadores normales. Con excepción de dos sueros, se encontró que en general hay niveles semejantes de FcRI y C_3RI en el ser humano normal. En uno de los sueros probados el donador pasaba al momento

del experimento por un cuadro infeccioso, lo cual puede explicar este aumento; posteriormente, al obtener nuevamente suero de esta persona, se encontraron valores semejantes al valor promedio. En otro caso, se mantuvo un valor elevado de FcRI y C_3RI aún después de tres tomas separadas por varios meses; el único dato sobresaliente de este último donador, es que manifestó ser una persona que nunca se enferma. Esto lo interpretamos como una consecuencia de su alto nivel de factores inductores de la — respuesta inmune.

Posteriormente, con la finalidad de contribuir al entendimiento de los mecanismos reguladores asociados con leucemias, así como por su posible valor diagnóstico, se determinaron los niveles de FcRI y C_3RI en sueros de pacientes con esta enfermedad. Se encontró que únicamente en las leucemias agudas tipo M_3 y M_4 existía una pequeña elevación de FcRI y que en la Leucemia, Granulocítica Crónica (LGC) el aumento era aún mayor, además de presentar en estos casos altos niveles de C_3RI. Estos resultados se pueden interpretar en base a que en las leucemias de tipo M_3 y M_4 existen células del tipo monocítico lo suficientemente maduras como para producir niveles aumentados de Fc RI y que en la LGC este nivel es mucho mayor por ser ésta la leucemia con mayor número de células monocíticas diferenciadas.

Es importante hacer notar que al estudiar sueros de pacientes con LGC en crisis blástica se encontró que no existe ningún aumento de Fc RI y C_3RI con respecto a controles normales, obviamente estos resultados tienen implicación diagnóstica, sobre todo en un caso de LGC en donde se detectó una disminución de FcRI y C_3RI antes de que se diagnosticara morfológicamente el paso hacia la fase de crisis blástica.

Por último, con la finalidad de determinar las propiedades molecualres de estos factores en el ser humano, y poder diseñar una posible purificación bioquímica, se deter-

INTRODUCCION.

En la mayoría de los tejidos de los mamíferos, las células que los conforman se encuentran diferenciadas y por lo tanto muestran poca evidencia de proliferación y auto renovación. No obstante un grupo pequeño de células tanto de la mucosa gastrointestinal, como de la piel y del tejido hematopoyético, tiene la capacidad de proliferar y diferenciarse continuamente hacia células maduras (1). El funcionamiento de un organismo pluricelular requiere de sistemas de control y recambio para realizar sus funciones específicas. Por ejemplo, la sangre es un sistema homeostático importante en el cuerpo ya que distribuye calor, acarrea gases respiratorios, nutrientes y desechos; fluye a través de sensores específicos capaces de regular a factores tales como tensión osmótica, pH, temperatura y algunos niveles hormonales. La sangre contiene los agentes celulares y humorales que controlan los efectos de tumores e infecciones en el cuerpo (2). Aproximadamente el 45 % del volumen sanguíneo consiste en eritrocitos, el 1 % esta formado por plaquetas y leucocitos: linfocitos monocitos y granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos); el resto del volumen sanguíneo lo constituye el plasma, el cual es una sustancia rica en proteínas y se le considera el líquido intercelular (2). El tejido hematopoyético presenta un ancestro común o célula madre, la cual en el camino de la proliferación y diferenciación *in vivo*, se encuentra bajo la influencia de muchos factores del medio ambiente local, entre los cuales podemos incluir los aspectos hormonales y ontogénicos, la concentración de vitaminas y otras sustancias biológica-

mente activas, así como la interación con células semejantes o bien con otras diferentes (3).

La existencia de una célula hematopoyética precursora de eritrocitos, leucocitos y plaquetas ha sido un tema de constante experimentación en hematología (1). La posible existencia de células hematopoyéticas repobladoras fué establecida, en los primeros años de la década de los 50s, mediante estudios en ratones irradiados letalmente (4-7). Posteriormente, se aportaron fuertes evidencias de la existencia de una célula hematopoyética precursora al experimentar con ratones fuertemente irradiados, los cuales morían por pancitopenia. La muerte de estos animales podía evitarse con el suministro de una suspensión de células provenientes de la médula ósea de animales sanos. Los animales así tratados sobrevivían mostrando en su brazo nódulos que representaban pequeñas colonias de células de todo tipo de células sanguíneas , las cuales fueron llamadas formadoras de colonias del bazo (CFU-S ; del inglés "colony forming unit spleen" (8). El carácter clonal de estas colonias fué demostrado por medio de marcadores cromosómicos inducidos por radiación (9).

La relación de los linfocitos con la CFU-S ha sido tema de controversia puesto que se ha demostrado que los progenitores linfoides no se encuentran en las colonias del bazo, lo que sugiere la existencia de una célula precursora común más primitiva, llamada precursora común de la unidad formadora de colonias linfoides y mieloides (CFU-L-M ; del inglés " lymphoid-myeloid colony forming unit commonprogenitor ") (10-12). Se postula que la CFU-LM da origen a los precursores linfoides y a la CFU-S que a su vez genera a los progenitores de los granulocitos, monocitos, eritrocitos y plaquetas (1) (Fig. 1).

Asímismo se aportaron técnicas para el crecimiento in vitro de las células precursoras de los elementos de la médula ósea. Mediante el cultivo de células mieloides en medios adaptados, se ha registrado la presencia de célu-

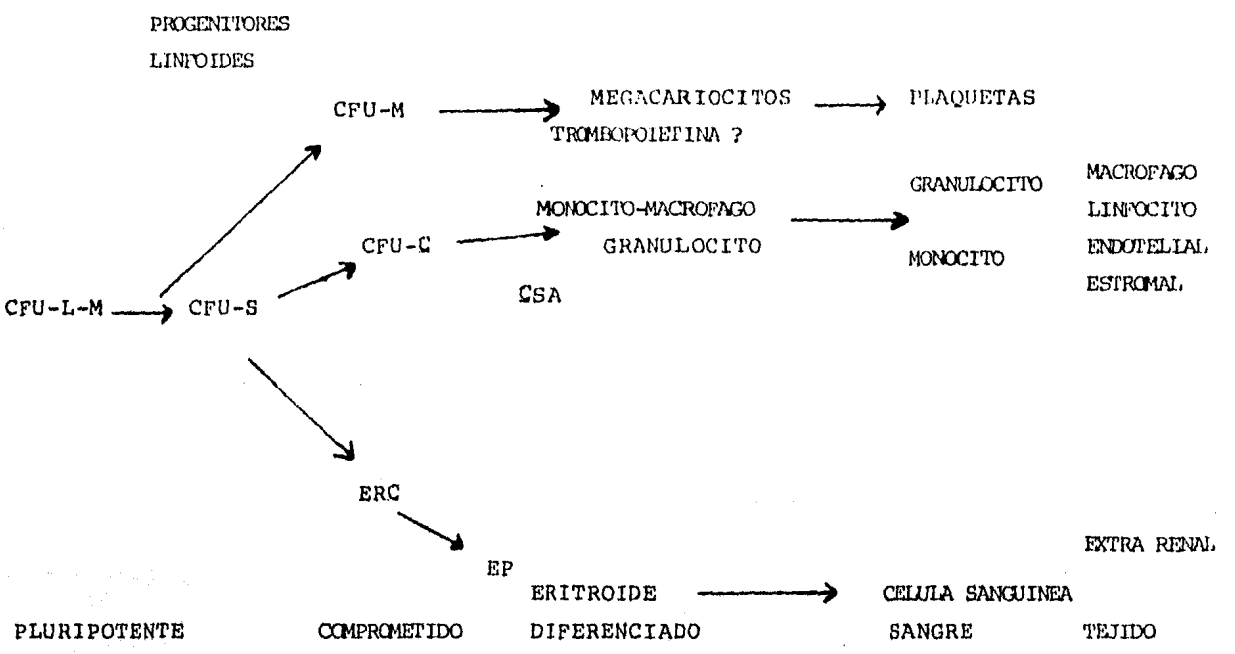


Fig. 1 Modelo de la hematopoiesis (1) .

las madres precursoras comprometidas o especializadas (CFU-C; del inglés "colony forming unit culture") capaces de originar in vitro colonias mixtas de polimorfo nucleares y macrófagos (13). Asímismo se ha encontrado células madre especializadas que generan eritrocitos en presencia de eritropoyetina (CFU-E; del inglés "ery throid colony - forming unit") (13-15) o células precursoras de megacariocitos que darán lugar a las plaquetas (CFU-M; del inglés " colony forming unit- megaka - ryocyte ").

En los ensayos clonales in vitro para células precursoras de granulocitos-mocitos-macrófagos, se ha observado que la proliferación requiere de la presencia obligada de un factor llamado " colony stimulating activity " (CSA) (16-20), también llamado " colony stimulating factor " (CSF) (21-23) o "macrophage and granulocyte inducer" (MGI) (24-25) y que probablemente tiene relación con el llamado "macrophage growth factor" (MGF) (26).

El MGI es una sustancia normalmente producida por varios órganos del cuerpo y dependiendo de la fuente de que se trate puede encontrarse en cantidades mayores o menores (27).

Los receptores de superficie son de importancia obvia para la actividad biológica de los leucocitos. Los receptores de membrana característicos de la actividad biológica del macrófago, son los receptores para la porción Fc de la IgG, receptores para el complemento y receptores no específicos denominados también receptores para sustancias extrañas (28).

Aparentemente, la función de los receptores de superficie en los leucocitos, consiste en incrementar la respuesta inmune celular. Los estudios hechos recientemente acerca de la morfología de la interacción linfocito-macrófago en la respuesta inmune a un antígeno dado, proporcionan una oportunidad de poder correlacionar la estructura y función en este aspecto de la inmunidad (28).

Las inmunoglobulinas han sido específicamente relacionadas con los antígenos (29) especialmente la inmunoglobulina G (IgG) y con el complemento (30, 31). La IgG sola y la inmunoglobulina enlazada a componentes del complemento han aportado mucho al conocimiento de la selectividad de la adherencia macrofágica (32). El papel del anticuerpo en la fagocitosis selectiva mediada, dependen de la unión de una región del anticuerpo a un receptor o sitios de reconocimiento en la superficie del macrófago.

Entonces la molécula de IgG aparentemente se une inmunoespecíficamente a los organismos a través de su porción variable de su región Fab y a la superficie macrofágica vía su región Fc (33, 34). Los receptores para la región Fc de la IgG en la superficie de los macrófagos son importantes para el combate de las infecciones parasitarias (35, 36). Además de su función en la eliminación de agentes extraños, los receptores Fc funcionan en la eliminación fisiológica de eritrocitos viejos por medio de los macrófagos (37). Estos eritrocitos son sensibilizados o cubiertos por inmunoglobulinas autónomas *in situ*, promoviendo consecuentemente la fagocitosis por macrófagos hepáticos y del bazo (38-40).

La presencia de receptores para Fc comúnmente se demuestra por medio de la técnica de formación de rosetas eritrocitarias (28). Cuando un anticuerpo cubre a los eritrocitos, éstos se unen a la superficie de los leucocitos dando lugar a lo que se ha denominado roseta, la cual se considera como aquella célula con más de tres eritrocitos adheridos a su membrana (41).

Se han mencionado otras técnicas menos comunes para la valoración de estos receptores con fluoresceinatos de anticuerpos (42) o por medio de radioisótopos (43-45).

La afinidad de los macrófagos por complejos de antígenos con IgG ha sido caracterizada, e indica que los enlaces en el receptor dependen de un número finito de sitios activos. Los complejos inmunes se combinan más ávidamente,

posiblemente porque se ofrece un número adicional de receptores Fc por complejo molecular (46-48), o porque ellos inducen cambios conformacionales en los componentes del Fc (49, 50).

El receptor Fc une varias subclases específicas del IgG, incluyendo las subclases IgG_1 e IgG_3 (51), IgG_{2A} e IgG_{2B} (52) y posiblemente la subclase IgG_1 en el ratón (53). Dependiendo del método empleado y de la especie que se examina, el macrófago posee aproximadamente 10^5 receptores en su membrana. Mediante el complejo soluble peroxidasa-antiperoxidasa, se ha podido demostrar que hay mayor número de receptores en los macrófagos que en los granulocitos, los cuales a su vez presentan una frecuencia mayor de tales receptores que los linfocitos (54). El receptor para Fc es sensible a la digestión con fosfolipasa y para su actividad depende de un componente lipídico (28).

La regeneración o conservación selectiva de estos receptores después de la unión con complejos inmunes puede ser un fenómeno que se relaciona con el tamaño o la cantidad total del material ingerido (55).

Los receptores para el complemento, presentes en la membrana del macrófago, tienen una función importante en la eliminación de los patógenos invasivos. Estos receptores estan involucrados en la defensa del hospedero. La adherencia secuencial de los productos del complemento, da lugar a partir del tercer componente a una mayor susceptibilidad para la ingestión en estas células (56). En pacientes con una deficiencia hereditaria o metabolismo anormal de receptores C_3, se evidencia la importancia biológica de este sistema. Estos pacientes son susceptibles a infecciones bacterianas recurrentes (57, 58), puesto que se disminuye la capacidad opsonizante del suero; ordinariamente estas infecciones pueden ser controladas por los fagocitos en presencia de suero normal (59).

El sistema del complemento es un conjunto de proenzimas de origen glicoproteico, que se encuentran en la sangre

de todos los vertebrados en forma inactiva (60). Constituyen aproximadamente del 10 al 15% de las proteínas séricas. Este sistema es activado en forma de cascada : una proenzima es transformada a enzima y ésta a su vez actúa sobre la siguiente proenzima transformándola a enzima y así sucesivamente (60).

La activación del complemento puede llevarse a cabo por dos vías : una vía clásica, que es a través de una reacción antígeno-anticuerpo (mecanismo específico), en donde el anticuerpo es fijador del complemento. La otra forma de activación es conocida como vía alterna o vía de la properdina; esta vía es considerada como un mecanismo de resistencia no específico (60).

Los receptores del complemento se encuentran, entre otros en los leucocitos, en los eritrocitos de primates y en las células epiteliales de los glomérulos renales (61).

Es posible que los receptores para el complemento estén implicados en la inhibición de la migración de los macrófagos por medio de endotoxinas (62). Dicha influencia podría se efectuada por factores que se sabe son generados por el complemento y el sistema de coagulación sanguínea, los cuales pueden actuar sobre la membrana plasmática para inducir la activación de los macrófagos (63).

Entre las técnicas para la detección y cuantificación de receptores para el complemento, se encuentra la técnica de rosetas, utilizando para este fin eritrocitos sensibilizados (cubiertos con anticuerpo) más suero como fuente del complemento (64). Se sabe que los eritrocitos cubiertos con IgM son incapaces de unirse a los macrófagos, pero cuando estos eritrocitos son incubados en presencia de suero fresco, la unión puede existir (56 - 65).

Las numerosas observaciones de la membrana de los macrófagos indican que existe un número relativamente pequeño de receptores de alta afinidad para el complemento (66). Además, existen evidencias de que la unión del complemento requiere de la presencia de magnesio (67). De la mis

ma forma se ha observado que este tipo de receptores es sensible a la tripsina (68).

La maduración gradual de las células hematopoyéticas ha sido caracterizada tradicionalmente por una serie de cambios en la mofología celular. No obstante, se ha trabajado poco para definir la diferenciación de los leucocitos en relación con la aparición de receptores sobre sus membranas, ya que las células precursoras van adquiriendo marcadores a medida de que se diferencian (69). Estudios recientes han evidenciado la existencia de un factor inductor de la aparición de receptores para Fc (FcRI), el cual se obtuvó a partir de una línea celular de tipo macrófagico mantenida in vitro y activada por lipopolisacáridos de origen bacteriano (LPS). Además se encontró que este factor pierde su actividad biológica al ser sometido al tratamiento proteolítico y al calor, lo cual indica que es de naturaleza proteíca (70). Asímismo, se ha encontrado un factor inductor de la formación de receptores en C_3 (C_3RI) en medio condicionado de pulmón murino endotóxico (71). Se aportó que el C_3RI es sensible a la tripsina y termolábil; es decir, es de naturaleza proteíca y es independeinte del factor inductor de macrófagos y granulocitos (MGI) ya que este no induce a la formación de colonias al utilizar la técnica en bicapa de agar. Asímismo, se ha identificado a las células monocíticas como las productoras de los factores FcRI y C_3RI (72) lo cual implica un posible mecanismo de autorregulación de inducción de receptores Fc y C_3 en leucocitos.

En la actualidad se conoce parcialmente como actúan algunos de los factores diferenciadores y promotores de la proliferación del tejido hematopoyético (73), pero solamente puede suponerse por analogía la acción de otros, ya que en un sistema tan complejo como el organismo vivo, es difícil, y ha sido casi imposible, evaluar y determinar cuantitativamente el papel de cada factor en la histogénesis de los tejidos hamatopoyético y linfoide (74).

Se ha encontrado que la acción de los factores sobre la proliferación y diferenciación, se encuentra contrarrestada en el organismo por otras sustancias con propiedades inhibidoras. Por ejemplo, se ha reportado que la presencia de lactoferrina inhibe la proliferación de granulocitos y macrófagos (75-81), de la misma forma se ha investigado la acción inhidora de sustancias como las prostaglandinas, las chalonas y otras moléculas provenientes de medios condicionados con células maduras (17, 77, 80, 82, 83) . En consecuencia, se piensa que existe en el organismo un mecanismo de regulación tanto para el aumento de la producción de elementos sanguíneos como de su inhibición; por lo que cualquier desestabilización de este sistema lleva al organismo a una hiper ó hipotrofia en las rutas de la proliferación y diferenciación celular dando origen a las enfermedades como la leucemia.

La leucemia es una enfermedad neoplástica de los tejidos linfoide y hematopoyético, la cual se encuentra propagada en un organismo al momento de su diagnóstico. Puede afectar cualquier tejido del cuerpo, pero debido a que siempre se ve afectada la médula ósea, es en este tejido en el que se puede diagnosticar su existencia (84).

Se tiene reportes de pacientes con sintomatología leucémica desde los tiempos de Sócrates, esto es, anemia, granulocitopenia y trombocitopenia asociada con esplenomegalia y linfoadenopatía, sin embargo, no es sino hasta la segunda mitad del siglo 19 cuando se reconoce a la leucemia como una enfermedad diferente (85).

Fué desde 1827 cuando Velpeau (86), realizó una descripción detallada de la leucemia en uno de sus pacientes, haciendo notar la consistencia de la sangre y su color blanquecino; las investigaciones acerca del tema se sucedieron rápidamente, encontrando con Donné en 1839 un primer análisis microscópico de la sangre de un sujeto leucémico en el que confundió a los leucocitos como un producto extracelular (pus) y no como la célula misma (87).

Poco después, en 1845, el alemán Virchow describe la sangre de sus pacientes leucémicos como " escasos corpúsculos rojos y muy abundantes cuerpos incoloros o blancos similares a los existentes en la sangre normal" por lo que la definió como "sangre blanca" (88).
En 1847, Virchow introduce el término de leucemia para definir a la enfermedad (89).
Posteriormente, con la introducción de nuevas técnicas de tinción y el avance en el conocimiento morfológico celular, se proponen varias clasificaciones a los diferentes tipos de leucemias, habiendo entre los hematólogos una gran controversia, que viene a terminar con la introducción de técnicas químicas, bioquímicas, citogenéticas e inmunológicas en la clasificación de los diferentes tipos y fases de desarrollo de esta enfermedad.
La clasificación FAB (Franco-Americano-Británico) (90) es el resultado de la conjunción de criterios de varios hematólogos de la época actual, en la que se determinan los diferentes tipos de leucemias como sigue:
LEUCEMIA LINFOCITICA AGUDA (en niños).
Células predominantemente pequeñas, núcleo redondo, rara vez agrietado, cromatina homogénea, nucleolos inconspicuos. Citoplasma moderadamente basofílico, variablemente vacuolado. No fagocítico. Muchas células son positivas al suero anti linfocito nulo de leucemia linfocítica aguda. Alrededor del 25 % de las células tienen marcadores celulares T. Tiene actividad terminal transferasa.
Este tipo de leucemia se conoce como L_1.
LEUCEMIA LINFOCITICA AGUDA (en adultos).
La línea exterior del núcleo es irregular, a menudo agrietada, el patrón cromático nuclear es variable; uno o más nucleolos presentes. Citoplasma moderadamente abundante , variablemente basofílico, variablemente vacuolado. No fagocítico. Alrededor del 50 % de las células son positivas al suero anti linfocito nulo de leucemia linfocítica aguda. Alrededor del 25 % tienen marcadores celulares T. Tiene alta actividad transferasa terminal y pocas células

tienen cromosomas Phialdelphia.
Este tipo de leucemia se conoce como L_2.
LEUCEMIA TIPO BURKITT.
Las células son predominantemente alargadas, núcleo de redondo a ovalado con un borde exterior liso, con uno o más nucleolos prominentes.Citoplasma moderadamente abundante, profundamente basofílico, vacuolización a menudo prominente. Frecuentemente fagocítico. Negativo al suero anti linfocito nulo de leucemia linfocítica aguda. Todas las células tienen marcadores celulares B.
Este tipo de leucemia se conoce como L_3.
LEUCEMIA MIELOBLASTICA SIN FORMAS DE MADURACION.
Las células son predominantemente blastos no granulares. El patrón de cromatina nuclear es delicado, con uno ó más nucleolos. Citoplasma limitado, raramente con unos pocos gránulos, raramente tienen presentes bastones de Auer. Este tipo de leucemia se le conoce como M_1.
LEUCEMIA MIELOBLASTICA CON FORMAS DE MADURACION.
Las células presentan una maduración superior a las del estado progranulocítico, con el 50 % de blastos y progranulocitos. Las células más antiguas semejantes a los blastos, tienen abundante citoplasma, contienen gránulos azurófilos y a menudo también bastones de Auer. Los mielocitos, metamielocitos y los granulocitos maduros pueden ser granulares. En raros casos, las células son predominantemente eosinófilas. Algunos casos presentan también hiperplasia eritroide.
Este tipo de leucemia se le conoce como M_2.
LEUCEMIA PROGRANULOCITICA HIPERGRANULAR.
La mayoría de las células tienen citoplasma muy granular, la tinción de los gránulos es variable mente rosa, roja o púrpura; comúnmente tiene cuerpos de Auer, a menudo son bastantes. Una variante de este tipo, esta caracterizada por células con muy poca granulación en el citoplasma y un núcleo bilobulado, multilobulado ó reniforme.
Este tipo de leucemia se le conoce mo M_3.
LEUCEMIA MIELOMONOCITICA.

Característicamente las células poseen un núcleo monocitoide y un citoplasma granulocítico, dicho núcleo monocitoide distingue a este tipo de leucemia a la del tipo M_2. Se encuentran presentes en la sangre y en la médula ósea monocitos y promonocitos.
Este tipo de leucemia se le conoce como M_4.

LEUCEMIA MONOCITICA (HISTIOCITICA).

Las células son predominantemente monoblastos, y en los núcleos se observa cromatina en forma laxa y uno o más nucleolos. El citoplasma es abundante con escasos gránulos finos de color rosado. Las formas más diferenciadas en este tipo de leucemia muestran características de monoblastos, promonocitos y monocitos; las células más maduras presentan en su citoplasma muchos gránulos rosas que asemejan polvo.
A este tipo de leucemia se le conoce como M_5.

ERITROLEUCEMIA (SINDROME DE DI'GUGLIELMO).

En este caso el 50.% de las células de la médula ósea son normoblastos o megaloblastos, en algunas ocasiones tienen un núcleo atípico, así como también las células eritroides nucleadas en la sangre. Existe un incremento de mieloblastos y progranulocitos, existen en ocasiones megacariocitos atípicos y frecuentemente se convierte , este tipo de leucemia en M_1, M_2 o M_4.
A este tipo de leucemia se le conoce como M_6.

LEUCEMIA GRANULOCITICA CRONICA (LGC).

La leucemia granulocítica crónica esta considerada en el grupo de los síndromes mieloproliferativos en los que se incluye a la policitemia vera, metaplasia mieloide, trombocitosis y eritroleucemia. Recientes investigaciones, han hecho dudar del carácter exclusivamente mieloide de la enfermedad. Básicamente, se considera a este enfermedad como un desorden del tronco celular proliferativo de médula ósea. La fase inicial es representada por una excesiva proliferación de elementos maduros derivados del tronco celular mieloide; la fase terminal de la enfermedad

es una progresión hacia una menor diferenciación ó fase blástica.

La mayoría de los casos presenta una anormalidad citogenética, el cromosoma Philadelphia; el cual es el primer marcador característico de todas las enfermedades malignas en humanos. El cromosoma philadelphia presente en las células de pacientes con LGC son la progenie de una célula simple que adquiere esta anormalidad; la evidencia de esto deriva del hecho de que todas las disfunciones hematológicas presentan este cromosoma (91).

La transformación blástica es sinónimo de la fase terminal, usualmente presenta de un 30 a un 40 % de las células de la médula ósea con morfología de blastos o promielocitos, sin embargo es necesaria la presencia de anemia y trombocitopenia para apoyar su diagnóstico (92). La crisis blástica esta definida por un aumento repentino de blastocitos, excediendo el número de las 100000 células por ml. La mayoría de los pacientes tienen una transformación celular mieloblástica, pero del 20 al 30 % de las células tienen características morfológicas linfo - blásticas (93); sin embargo, los estados blásticos pueden ser descritos como mieloblásticos o indiferenciados.

OBJETIVOS.

Como se ha identificado al monocito como el productor de FcRI y C_3RI, entonces es posible que estas moléculas se encuentren en el suero humano normal y en todos aquellos órganos en donde se encuentren células de este tipo ya maduras. En consecuencia se esperaría encontrar altos niveles de FcRI y C_3RI en leucemias en las que el número de monocitos maduros este aumentado respecto a la normalidad (como en LGC) y que mientras más inmaduras sean estas células, los niveles de estos factores serán menores. Por otro lado también se esperaría que los niveles de ambos factores sean semejantes a los normales cuando la afectada sea una línea celular diferente como lo es la linfocítica o la eritrocítica.

Es evidente que si el FcRI y el C_3RI inducen a la aparición de receptores inmunológicos de células inmunocompetentes, entonces un aumento en estos factores en el organismo podría implicar una mejor defensa contra infecciones o cuerpos extraños, en consecuencia la purificación y caracterización de estas moléculas, nó únicamente tiene un interés básico, sino que podría tener aplicaciones terapéuticas o preventivas en situaciones en donde un aumento de receptores membranales sea de utilidad.

Por lo tanto, en este trabajó se obtuvieron sueros de pacientes con diferentes tipos de leucemia para determinar si nuestra suposición acerca del aumento de estos factores en los sueros, esta relacionado con la existencia de macrófagos maduros y su grado de diferenciación, lo cual tendría una obvia aplicación diagnóstica.

Por otro lado, es sabido que el medio condicionado por

pulmón es rico en factores diferenciadores por lo que se obtuvo medio condicionado por pulmón humano para determinar algunas propiedades moleculares del factor C_3RI y apoyar de esta forma su posible purificación.

MATERIALES Y METODOS.

ANIMALES.- Se emplearon ratones de la cepa CD-1 hembras de 6 a 8 semanas de edad.

CULTIVO CELULAR.- Como fuente de nutrición se usó el medio mínimo esencial de Eagle (EM) con exceso de vitaminas y aminoácidos (Gibco Labs. USA)(apéndice 1) al que se le adicionaron 1000UI/ml de penicilina y 100 µl/ml de estreptomicina como medio preventivo para una posible contaminación bacteriana, así como 3.7 g/l de bicarbonato de Sodio para mantener un Ph fisiológico de 7.2 en los cultivos en presencia de CO_2. Posteriormente se filtró en membrana millipore (Millipore, USA) con un diámetro de poro de 0.22 micras para garantizar la esterilidad del medio. Para verificar dicha esterilidad se tomaron 5 gotas y se colocaron por duplicado en tubos de ensaye que contenían 2 ml de caldo de soya tripcaseína al 3 % (Bioxon, Mex) previamente esterilizada en autoclave, incubándolos durante 48 horas a 37°C. El medio de cultivo fué complementado con suero de caballo (Gibco Labs.USA) al 10 %, el cual fué previamente desactivado a 56°C durante 30 min.

Las células se sembraron en la cantidad y condiciones requeridas para cada experimento, en las cajas de Petri, ya sea de vidrio o de plástico desechables de 60x 15 mm, las cuales contenían siempre un volumen total de 5 ml. Las células se mantuvieron in vitro en una incubadora a 37°C con una atmósfera relativa del 10 % de CO_2 y humedad saturante. Todo trabajo de cultivo se realizó en una campana limpia y esterilizada con luz ultravioleta durante 15 min. Para verificar las condiciones de las células en cultivo, se utilizó un microscopio de tipo invertido (American Opti

cal, USA).

TECNICA PARA LA OBTENCION DE CELULAS DE MEDULA OSEA.

Con la finalidad de obtener células viables en las que se cuantificara la actividad de los factores inductores sobre la formación de receptores para Fc y C_3, se sacrificaron ratones mediante dislocación cefalo medular, para proceder a retirar los fémures; éstos se colocaron inmediatamente en cajas de Petri que contenían una solución amortiguadora de fosfatos (SAF)(Apéndice 2). Enseguida se eliminó la mayor cantidad de tejido muscular circundante. Se cortaron las epífisis con tijeras pequeñas y, con una jeringa de 1 ml que contenía SAF, se hizo fluir el líquido de un extremo a otro para de esta forma colectar las células en un tubo de ensaye. Las células así obtenidas se lavaron en SAF y se centrifugaron a 500 g durante 3 min, repitiendo este lavado en tres ocasiones. Por último, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 5 ml de medio de cultivo con el cual se resuspendieron las células. La cantidad de células obtenida se determinó con un hemocitómetro (American Optical, USA). Se sembraron para cada experimento 8 x 10^6 células por caja de Petri desechable (Vela plastic, Mex) y se mantuvieron en cultivo durante 4 días.

PREPARACION DE LA INMUNOGLOBULINA G (IgG).- Se diluyó inmunoglobulina G (7s IgG, Cordis Labs, USA) en SAF a 1: 1600. Se guardaron 4 ml en tubos de ensaye estériles y se conservaron en congelación a-20°C hasta su uso. Siempre se utilizó el total de la IgG diluída, una vez congelada.

PREPARACION DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS CON ANTICUERPO.

Se emplearon eritrocitos de carnero que se extrajeron de la yugular y se colocaron en Alsever 1:1 (apéndice 3) en condiciones de esterilidad. Los eritrocitos obtenidos se almacenaron a 4°C durante una semana, antes de su uso y nunca después de 5 semanas.

Para la sensibilización de los eritrocitos se lavaron con SAF, mediante centrifugación a 500 g durante 3 min en 3 ocasiones; después de lo cual se decantó el sobrenadante

y las células sanguíneas se resuspendieron en SAF en una preparación de 4 ml por cada mililitro de eritrocitos en la solución de Alsever utilizadc ; posteriormente se agregó un volumen igual de IgG al utilizado de SAF. Esta mezcla se resuspendió y se incubó en Baño María a 37°C durante 30 min, obteniéndose eritrocitos cubiertos con anticuerpo. Los eritrocitos cubiertos con anticuerpo así obtenidos se lavaron en SAF por centrifugación a 500 g por 3 min, con el objeto de retirar el IgG excedente. Esta operación se repitió cuantas veces fué necesario hasta que el sobrenadante fuera incoloro. Finalmente, se resuspendieron los eritrocitos sensibilizados con el antígeno en el doble del volumen de SAF utilizando para su preparación y se almacenaron a 4°C hasta el momento de su uso y nunca después de 5 días.

OBTENCION DE SUERO FRESCO DE RATON.- Después de sacrificar a los ratones, se les extrajo del corazón (mediante punción con una jeringa estéril de 1 ml) la mayor cantidad de sangre posible; se colocó en un tubo de ensaye y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 min para que se formara el coágulo, después el tubo se colocó en hielo durante una hora, con el propósito de lograr la retacción del coágulo; se separó de las paredes del tubo con la ayuda de una pipeta y se procedió a centrifugar a 1000 g durante 15 min. Finalmente, el suero se recolectó en otro tubo y se diluyó 10 veces en SAF. Esta fuente del complemento, siempre se utilizó inmediatamente para la preparación de eritrocitos sensibilizados con anticuerpos y complemento.

PREPARACION DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS CON ANTICUERPO Y COMPLEMENTO.- Se mezclaron partes iguales de eritrocitos, activados y sensibilizados con anticuerpo, y de suero fresco de ratón diluído 1:10 en SAF y se incubaron en Baño María a 37°C durante 30 min, obteniéndose de esta forma eritrocitos sensibilizados con anticuerpo y complemento. Estos eritrocitos se lavaron por centrifugación a 500 g durante 3 min con 1-2 ml de SAF, con el objeto de reti-

rar exceso de complemento nó adherido a los eritrocitos activados. El proceso de lavado se repitió cuantas veces fué necesario hasta que el sobrenadante fué incoloro. Por último, se resuspendieron los eritrocitos en un volumen de SAF igual al utilizado originalmente de eritrocitos activados, conservándoseles a 4°C hasta su uso. Los eritrocitos sensibilizados con anticuerpo y complemento, se utilizaron inmediatamente y nunca más después de dos días de su preparación.

DETERMINACION DE RECEPTORES DE MEMBRANA POR FORMACION DE ROSETAS DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS CON ANTICUERPOS Y ERITROCITOS SENSIBILIZADOS CON ANTICUERPO Y COMPLEMENTO.

Se incubaron las células de médula ósea de ratón, en presencia de los diferentes medios condicionados que se deseaban probar como fuentes de los factores inductores a la formación de receptores Fc y C_3 (Medio condicionado por pulmón humano endotóxico y sueros humanos enfermos con diferentes tipos de leucemias). Al término de 4 días de incubación se revisaron los cultivos al microscopio invertido y después de comprobar visualmente el estado de éstos, se procedió a separar las células adheridas a la superficie de cada cultivo mediante el uso de un gendarme de hule y, junto con las células que se encontraban en suspensión, se colocaron en tubos de ensaye y se lavaron 3 veces en SAF mediante centrifugación a 500 g durante 3 min; enseguida del último lavado, se desechó el sobrenadante y se acondicionó 1 ml de SAF. Una vez resuspendidas las células, se procedió a la separación de 2 partes iguales para sendas pruebas de rosetas Fc y C_3. Enseguida se añadieron 100 ml ya sea de eritrocitos sensibilizados con anticuerpo o de eritrocitos sensibilizados con anticuerpos y complemento y se mezclaron con las células; posteriormente se centrifugaron a 500 g durante 3 min. Después de una incubación de 30 min en Baño María, se resuspendieron las células con suavidad para finalmente determinar el porcentaje de rosetas formado. Se consideró como roseta-

aquel leucocito que tenía adherido más de tres eritrocitos a su membrana celular. La evaluaciones del porcentaje de las células con receptores de membrana, se hicieron al contar un mínimo de 200 células. En todos los experimentos se colocaron cultivos que no contenían ningún medio condicionado como control negativo.

MEDIO CONDICIONADO POR TEJIDO PULMONAR HUMANO IN VITRO. El tejido se obtuvo de un cadáver sin patología pulmonar evidente, dentro de las primeras 6 horas siguientes al deceso, previa autorización de los familiares. Se mantuvo en medio de cultivo para su transporte y se fraccionó y colocó en tubos de ensaye adicionándoles 10 µl/ml de LPS como tratamiento endotóxico; se mantuvieron en incubación durante 48 horas a 37°C, después de lo cual se colectaron sólo los medios de cultivo, se probó su esterilidad y se conservaron a - 20°C hasta el momento de su utilización.

CROMATOGRAFIA POR FILTRACION MOLECULAR.- Para la separación de moléculas del medio condicionado del pulmón humano endotóxico, de acuerdo a su masa molecular, se empleó una columna (K9/30) empacada con ultrogel AcA-54, para masas moleculares de menos de 70000 daltones. Además, con la finalidad de desalinizar el medio condicionado previo a su utilización en la prueba de electroenfoque, se empacó una columna K26/100 en Sephadex G-50. Las columnas se eluyeron con Tris-HCl (50mM) y NaCl (0.15M), a un pH de 7.7 con un flujo de 4 cm por hora dado por una bomba peristáltica (LKB Suecia) y a una temperatura de 4°C.

El volumen que se utilizó inicialmente fué 4 ml del medio condicionado. Las 80 fracciones eluídas, se almacenaron siempre a - 20°C hasta su uso.

ELECTROENFOQUE.- Para la técnica de separación molecular basada en el pH isoeléctrico de cada componente del medio condicionado por tejido pulmonar humano, se utilizó este medio previamente desalinizado. Se utilizó Ultrodex mezclado con anfolito de rango amplio (3 a 10). La mezcla se

extiende sobre una charola de vidrio de 5 x 125 x 260 mm y para proporcionarle una consistencia adecuada se expar con pequeñas cantidades de Ultrodex en polvo. En los ex tremos de las charolas se extraen tiras de gel de 10 mm, colocando en estos lugares tiras de papel para electroen foque, humedecidas previamente en soluciones extremas de pH (catolito:Etilen diamina 1M; anolito: Acido sulfúrico 0.2 M). La charola se coloca en la cámara de enfriamien- to del Multiphor (LKB 2117- 501 KIT USA) la cual se en - cuentra a 4°C. Para el electroenfoque se utilizarón 30 Watts durante 6 horas. El perfil proteínico se determinó mediante la aplicación sobre el gel de un papel filtro que posteriormente se retira y se lava con ácido tricloroa cético y se tiñe con azul de comassie.

Finalmente, el gel se cortó en 25 fracciones, las cuales se eluyeron con amortiguador Tris-HCl 50 mM y con NaCl 0.15 M a un pH de 7.7, y a 4°C; las fracciones así obte- nidas se guardan a -20°C hasta su utilización. A cada fracción se le ajustó el pH con NaOH ó HCl antes del en- sayo biológico.

Todos los reactivos y equipo utilizado en las técnicas bioquímicas fueron de Pharmacia Fine Chemicals, Suecia ; a menos que se indique lo contrario.

CONFIABILIDAD DE RESULTADOS.- Todos los experimentos rea lizados en este trabajo, se repitieron un mínimo de dos veces y siempre por duplicado.

Para todo experimento se incluyó un bioensayo sin suero o sin medio activador como control negativo.

RESULTADOS.

INDUCCION A LA APARICION DE RECEPTORES Fc Y C_3 EN CELULAS DE MEDULA OSEA POR SUEROS HUMANOS NORMALES.

Con la finalidad de determinar la existencia del factor inductor a la formación de receptores Fc (FcRI), en sueros humanos normales (SHN), se cultivaron células mieloides murinas en presencia de estos sueros.
Al ensayar 100 ml de cada uno de 6 SHN, en las células de médula ósea se encontró que sólo uno de ellos indujo una aparición significativa de rosetas Fc (Tabla 1) por lo que se consideró pertinente el analizar, en las mismas condiciones de cultivo, un segundo lote de 8 SHN para determinar si existía otro suero con actividad inductora. Sin embargo, en esta ocasión y con la finalidad de tener un estudio más completo se avaluó la existencia en estos sueros, del factor inductor a la aparición de receptores C_3 (C_3RI). Asímismo, se creyó conveniente el ensayar nuevamente el suero del donador que en el primer lote había presentado actividad de FcRI, para verificar si en esta segunda toma se presentaba también dicha actividad. En esta ocasión se encontró que también en este segundo lote había un suero con actividad inductora de receptores Fc (Tabla 2). Cabe hacer notar que este suero resultó mucho más activo que el suero encontrado en el primer lote. El SHN # 6 resultó en esta ocasión carecer de actividad inductora tanto para receptores Fc como para receptores C_3. Es interesante el hecho de que al entrevistar a este donador sobre su estado de salud al momento de tomarle las dos muestras, manifestó que sólo en la prime-

TABLA I .

PORCENTAJE DE ROSETAS Fc INDUCIDAS EN CELULAS DE MEDULA OSEA POR SUEROS HUMANOS NORMALES.

Suero No.	-	E_1	-	E_2
1	13	14	10	4
2	13	15	7	7
3	13	8	10	4
4	13	10	10	11
5	13	13	10	12
6	13	19	7	17

El signo (-) representa el valor promedio del control utilizado durante el experimento.
Los signos (E_1 y E_2) representan el valor promedio de los diferentes sueros probados.

ra toma tenía un cuadro de faringoamigdalitis que duró - aproximadamente 10 días (Tabla 2).
En vista de que encontramos un segundo SHN con cantidades considerables de FcRI y C_3RI, se creyó conveniente conseguir y probar una segunda muestra de éste. Utilizando 100 µl de esta segunda muestra, el resultado fué que se repitió el mismo comportamiento inductor y al realizarle el mismo tipo de entrevista sobre el estado de salud de este donador al momento de las tomas, manifestó no haber tenido ninguna enfermedad aparente y agregó ser una persona extraordinariamente sana y que en los últimos años no había padecido ni siquiera algún tipo de infección viral - (Tabla 2).

INDUCCION A LA APARICION DE RECEPTORES Fc y C_3 EN CELULAS MIELOIDES MURINAS POR SUEROS PROVENIENTES DE PACIENTES CON DIFERENTES ENFERMEDADES HEMATOLOGICAS.

Una vez estudiado el comportamiento inductor de los SHN, se consideró conveniente el realizar el ansayo con sueros humanos de enfermos con diferentes tipos de leucemias (SHL), con la finalidad de detectar la posible presencia de los factores diferenciadores FcRI y C_3RI. La elección de los sueros de leucémicos, obedeció al hecho de que se sabe que tanto los granulocítos como los macrófagos son productores de estos factores y que en una alteración en donde se involucren estos tipos celulares, pudiese haber un cambio significativo utilizable para fines diagnósticos. Por tanto, se utilizaron sueros de pacientes con leucemias mielocíticas agudas (LMA) en sus variedades M_1, M2 , M_3 y M_4 ; sueros de pacientes con leucemia granulocítica crónica (LGC); así como sueros de pacientes con leucemia linfocítica aguda (LLA).
Utilizando 100 µl de los SHL con LMA y LLA, se encontró que, de los seis sueros de pacientes con LMA en su variedad M_1 que se probaron, cinco indujeron la aparición de

TABLA 2 .

PORCENTAJE DE ROSETAS Fc Y C_3 INDUCIDAS EN CELULAS DE MEDULA OSEA POR SUEROS HUMANOS NORMALES.

	Fc				C_3			
Suero No.	-	E_1	-	E_2	-	E_1	-	E_2
7	22	21	5	7	30	30	6	6
8	22	22	5	8	30	21	6	2
9	22	19	5	6	30	31	6	5
10	22	20	5	5	30	30	6	12
11	22	25	5	11	30	29	6	5
12	22	19	10	7	30	27	6	4
13	22	19	5	8	30	27	6	7
14	8	37	22	35	30	34	5	34
6*	22	25	12	11	30	28	16	9
14*	18	24	5	12	11	15	8	12

* Sueros probados en su segunda muestra.

\- Valor promedio del control del experimento.

E Experimentos realizados en diferentes tiempos.

TABLA 3 .

PORCENTAJE DE ROSETAS Fc Y C_3 INDUCIDAS EN CELULAS DE MEDULA OSEA POR SUEROS HUMANOS ENFERMOS.

Suero No.	Tipo de enfermedad.	Fc				C_3			
		-	E_1	-	E_2	-	E_1	-	E_2
15	M_1	5	9	4	8	8	8	7	8
16	M_1	9	13	8	12	8	12	12	12
17	M_1	5	5	8	8	7	12	7	13
18	M_1	5	9	5	10	4	6	7	8
19	M_1	8	14	5	9	4	5	7	7
20	M_1	9	12	10	14	12	11	12	13
21	M_2	5	4	8	9	9	10	12	8
22	M_2	4	4	5	5	10	12	7	9
23	M_3	9	14	10	17	12	13	12	15
24	M_3	5	7	8	10	5	6	12	7
25	M_4	9	10	10	16	12	7	12	9
26	M_4	9	15	10	12	12	10	12	7
27	M_4	9	7	18	11	8	11	11	13
28	M_4	8	8	18	13	4	4	11	11
29	L_2	9	7	18	12	8	12	11	15
30	L_2	4	1	5	3	8	3	4	1
31	L_2	9	9	18	19	11	11	5	5

\- Valor promedio del control del experimento.

E Experimentos realizados en diferentes tiempos.

un alto porcentaje de receptores Fc. No se detectó actividad en ninguno de los sueros de pacientes con LMA en M_2 y sólo se obtuvo actividad en uno de los dos SHL con LMA en M_3 ensayados. Por último en los SHL con LMA en la variedad M_4 se encontró que en uno de los cuatro sueros hubo actividad inductora. Para ninguno de los SHL con LLA se detectó actividad inductora de receptores Fc (Tabla 3) Para el caso de la actividad inductora de a aparición de receptores C_3, se obtuvó que ninguno de estos SHL la presentó.

Por otro lado, al utiliza 100 µl de cada uno de los ocho SHL con LGC y de dos con LGC en crisis blástica para evaluar la aparición de receptores Fc, se obtuvó que en siete los ocho con LGC se detectó actividad inductora mientras que ninguno de los LGC en crisis blástica presentaron dicha actividad. Es interesante hacer notar que el SHL con LGC que mostró actividad inductora, pertenece al mismo paciente del que meses después recibimos una muestra clasificada como de paciente con LGC en crisis blástica (Tabla 4).

Cuando de efectuó el ensayo en las mismas condiciones para detectar la inducción a la aparición de receptores C_3, se encontró que todos los SHL con LGC poseían actividad inductora . Al igual que para FcRI, ninguno de los LGC en crisis blástica presentó actividad de C_3RI (Tabla 4).

DETERMINACION DE PESO MOLECULAR DE LOS FACTORES FcRI Y C_3RI CONTENIDOS EN MEDIO CONDICIONADO POR PULMON HUMANO.

Una vez determinada la existencia de FcRI y C_3RI tanto en sueros humanos normales como en sueros humanos provenientes de pacientes leucémicos inició la detección y caracterización de ambos factores. Debido a que el suero es un fluído con alto contenido proteínico, la purificación de ambos factores a partir de él sería más compleja que si se dispone de alguna otra fuente sin suero. Ya que en traba-

TABLA 4 .

PORCENTAJE DE ROSETAS Fc Y C_3 INDUCIDAS EN CELULAS DE MEDULA OSEA POR SUEROS HUMANOS DE ENFERMOS CON LGC.

	Fc				C_3			
Suero No.	-	E	-	E	-	E	-	E
32	4	20	10	14	9	21	8	14
33	10	22	17	30	8	16	18	26
34	16	21	17	28	13	16	18	24
35	5	12	5	12	8	8	7	8
36	9	15	18	28	8	18	11	20
37	4	16	5	12	8	8	7	8
38	11	20	14	21	15	15	16	16
39	11	10	10	11	15	14	16	15
40 *	17	17	11	12	18	17	15	10
39'**	17	15	10	7	18	18	16	20

* Suero humano leucémico en crisis blástica.

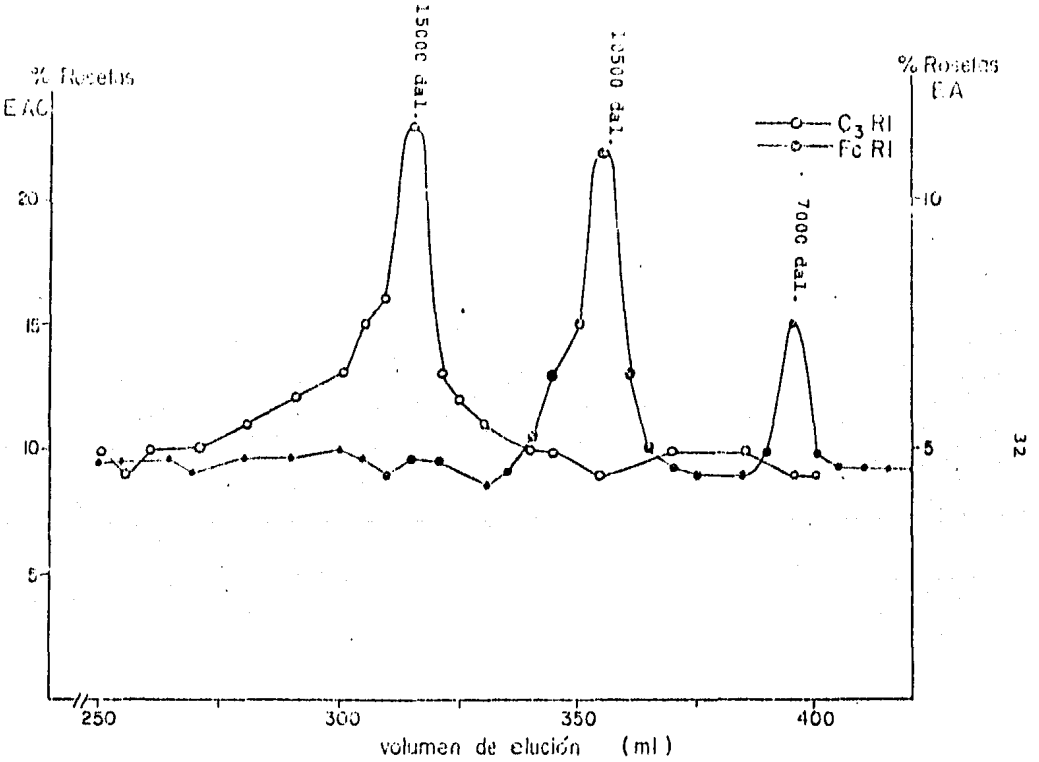
** Suero humano leucémico en crisis blástica, segunda muestra del paciente No. 39.

jos anteriores se ha informado de la presencia de ambos factores inductores en medio condicionado por pulmón endotóxico de ratón, se procedió a obtener y probar un medio condicionado por tejido pulmonar humano, sometido a tratamiento endotóxico in vitro (10 µl /mg de LPS) en ausencia de suero. El tejido provino de un cadáver si patología evidente y fué obtenido dentro de las primeras 6 horas siguientes al deceso, previa autorización de sus familiares.

Para determinar el peso molecular de los factores FcRI y C_3RI contenidos en el medio condicionado por pulmón humano se procedió a efectuar una cromatografía a 4 ml de dicho medio en una columna calibrada de Utrogel Aca-54, se recolectaron 80 fracciones de 5 ml y al utilizar 0.5 ml de cada una para inducir la aparición de receptores en células de médula ósea murina, la actividad de FcRI se obtuvó en un pico principal cuyo volumen de elución correspondió a un peso molecular de 10500 daltones; asímismo, se detectó la presencia de un pico menor también con actividad de FcRI que eluye en un volumen correspondiente a 7500 daltones (Fig. 2).

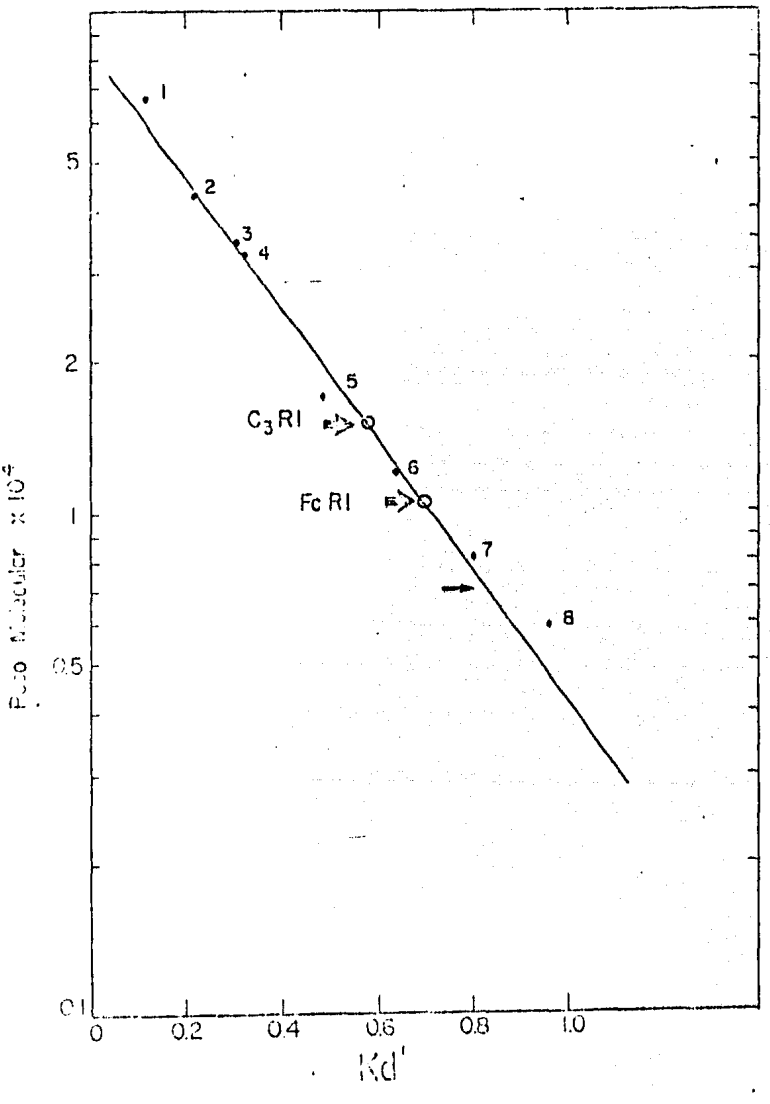
La actividad de C_3RI se detectó en el eluido de la columna de Ultrogel como único pico en el volumen que corresponde a un peso molecular de 15000 daltones (Fig. 2).

La relación peso molecular-volumen de elución, se obtuvo al comparar los factores con proteínas de pesos moleculares conocidos. Las proteínas utilizadas como patrones fueron: Albúmina de suero bovino (67000 daltones) , ovo albúmina (43000 daltones), media hemoglobina de bovino (37000 daltones), - Lactoglobulina (35000 daltones), mioglobulina de caballo (17000 daltones), citocromo C de equino (14000 daltones), mioglobina (fragmento 1 de BrCN, 8000 daltones) e insulina bovina (5800 daltones) (Fig. 3).



PERFIL DE ELUCION DEL MEDIO CONDICIONADO DE PULMON HUMANO POR CROMATOGRAFIA DE FILTRACION MOLECULAR EN ULTROGEL AcA 54.

Fig. 3



PESO MOLECULAR DE LOS PICOS DE ACTIVIDAD FcRI Y C_3RI

RESUMEN.

El ser humano requiere de la existencia de mecanismos reguladores de la proliferación y diferenciación de las células que integran su tejido hematopoyético, para un funcionamiento normal. Estos mecanismos dependen de una delicada y compleja interacción entre células y factores humorales. Entre los factores conocidos, el más estudiado es el inductor a la proliferación y diferenciación de granulocitos y macrófagos, llamado MGI.

Recientemente se encontró que para que una célula mieloide llegue a una diferenciación completa, es indispensable la interacción de otros factores; entre éstos se encuentran al FcRI y C_3RI los cuales tienen la función de inducir la aparición de receptores Fc y C_3 en las membranas de las células mieloides. Se ha encontrado que la producción de MGI, FcRI y C_3RI es llevada a cabo por los macrófagos, lo cual indica la posible existencia de un mecanismo de autorregulación de este tipo celular.

Cuando existe alguna falla en los mecanismos de regulación homeostático, se presentan las diferentes enfermedades hematológicas. Estas fallas pueden ser debidas a variaciones en la producción de los factores reguladores, ó defectos celulares que impidan la acción reguladora, como en el caso de la leucemia.

Con la finalidad de determinar los niveles de FcRI y C_3RI en el torrente sanguíneo humano, se evaluaron éstos en sueros provenientes de donadores normales. Con excepción de dos sueros, se encontró que en general hay niveles semejantes de FcRI y C_3RI en el ser humano normal. En uno de los sueros probados el donador pasaba al momento

del experimento por un cuadro infeccioso, lo cual puede explicar este aumento; posteriormente, al obtener nuevamente suero de esta persona, se encontraron valores semejantes al valor promedio. En otro caso, se mantuvo un valor elevado de FcRI y C_3RI aún después de tres tomas separadas por varios meses; el único dato sobresaliente de este último donador, es que manifestó ser una persona que nunca se enferma. Esto lo interpretamos como una consecuencia de su alto nivel de factores inductores de la respuesta inmune.

Posteriormente, con la finalidad de contribuir al entendimiento de los mecanismos reguladores asociados con leucemias, así como por su posible valor diagnóstico, se determinaron los niveles de FcRI y C_3RI en sueros de pacientes con esta enfermedad. Se encontró que únicamente en las leucemias agudas tipo M_3 y M_4 existía una pequeña elevación de FcRI y que en la Leucemia, Granulocítica Crónica (LGC) el aumento era aún mayor, además de presentar en estos casos altos niveles de C_3RI. Estos resultados se pueden interpretar en base a que en las leucemias de tipo M_3 y M_4 existen células del tipo monocítico lo suficientemente maduras como para producir niveles aumentados de Fc RI y que en la LGC este nivel es mucho mayor por ser ésta la leucemia con mayor número de células monocíticas diferenciadas.

Es importante hacer notar que al estudiar sueros de pacientes con LGC en crisis blástica se encontró que no existe ningún aumento de Fc RI y C3RI con respecto a controles normales, obviamente estos resultados tienen implicación diagnóstica, sobre todo en un caso de LGC en donde se detectó una disminución de FcRI y C_3RI antes de que se diagnosticara morfológicamente el paso hacia la fase de crisis blástica.

Por último, con la finalidad de determinar las propiedades molecualres de estos factores en el ser humano, y poder diseñar una posible purificación bioquímica, se deter-

INTRODUCCION.

En la mayoría de los tejidos de los mamíferos, las células que los conforman se encuentran diferenciadas y por lo tanto muestran poca evidencia de proliferación y autorenovación. No obstante un grupo pequeño de células tanto de la mucosa gastrointestinal, como de la piel y del tejido hematopoyético, tiene la capacidad de proliferar y diferenciarse continuamente hacia células maduras (1). El funcionamiento de un organismo pluricelular requiere de sistemas de control y recambio para realizar sus funciones específicas. Por ejemplo, la sangre es un sistema homeostático importante en el cuerpo ya que distribuye calor, acarrea gases respiratorios, nutrientes y desechos; fluye a través de sensores específicos capaces de regular a factores tales como tensión osmótica, pH, temperatura y algunos niveles hormonales. La sangre contiene los agentes celulares y humorales que controlan los efectos de tumores e infecciones en el cuerpo (2). Aproximadamente el 45 % del volumen sanguíneo consiste en eritrocitos, el 1 % esta formado por plaquetas y leucocitos: linfocitos monocitos y granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos); el resto del volumen sanguíneo lo constituye el plasma, el cual es una sustancia rica en proteínas y se le considera el líquido intercelular (2). El tejido hematopoyético presenta un ancestro común o célula madre, la cual en el camino de la proliferación y diferenciación *in vivo*, se encuentra bajo la influencia de muchos factores del medio ambiente local, entre los cuale podemos incluir los aspectos hormonales y ontogénicos, la concentración de vitaminas y otras sustancias biológica -

mente activas, así como la interación con células semejantes o bien con otras diferentes (3).

La existencia de una célula hematopoyética precursora de eritrocitos, leucocitos y plaquetas ha sido un tema de constante experimentación en hematología (1). La posible existencia de células hematopoyéticas repobladoras fué establecida, en los primeros años de la década de los 50s, mediante estudios en ratones irradiados letalmente (4-7). Posteriormente, se aportaron fuertes evidencias de la existencia de una célula hematopoyética precursora al experimentar con ratones fuertemente irradiados, los cuales morían por pancitopenia. La muerte de estos animales podía evitarse con el suministro de una suspensión de células provenientes de la médula ósea de animales sanos. Los animales así tratados sobrevivían mostrando en su brazo nódulos que representaban pequeñas colonias de células de todo tipo de células sanguíneas , las cuales fueron llamadas formadoras de colonias del bazo (CFU-S ; del inglés "colony forming unit spleen" (8). El carácter clonal de estas colonias fué demostrado por medio de marcadores cromosómicos inducidos por radiación (9).

La relación de los linfocitos con la CFU-S ha sido tema de controversia puesto que se ha demostrado que los progenitores linfoides no se encuentran en las colonias del bazo, lo que sugiere la existencia de una célula precursora común más primitiva, llamada precursora común de la unidad formadora de colonias linfoides y mieloides (CFU-L-M ; del inglés " lymphoid-myeloid colony forming unit common progenitor ") (10-12). Se postula que la CFU- LM da origen a los precursores linfoides y a la CFU-S que a su vez genera a los progenitores de los granulocitos, monocitos, eritrocitos y plaquetas (1) (Fig. 1).

Asímismo se aportaron técnicas para el crecimiento in vitro de las células precursoras de los elementos de la médula ósea. Mediante el cultivo de células mieloides en medios adaptados, se ha registrado la presencia de célu-

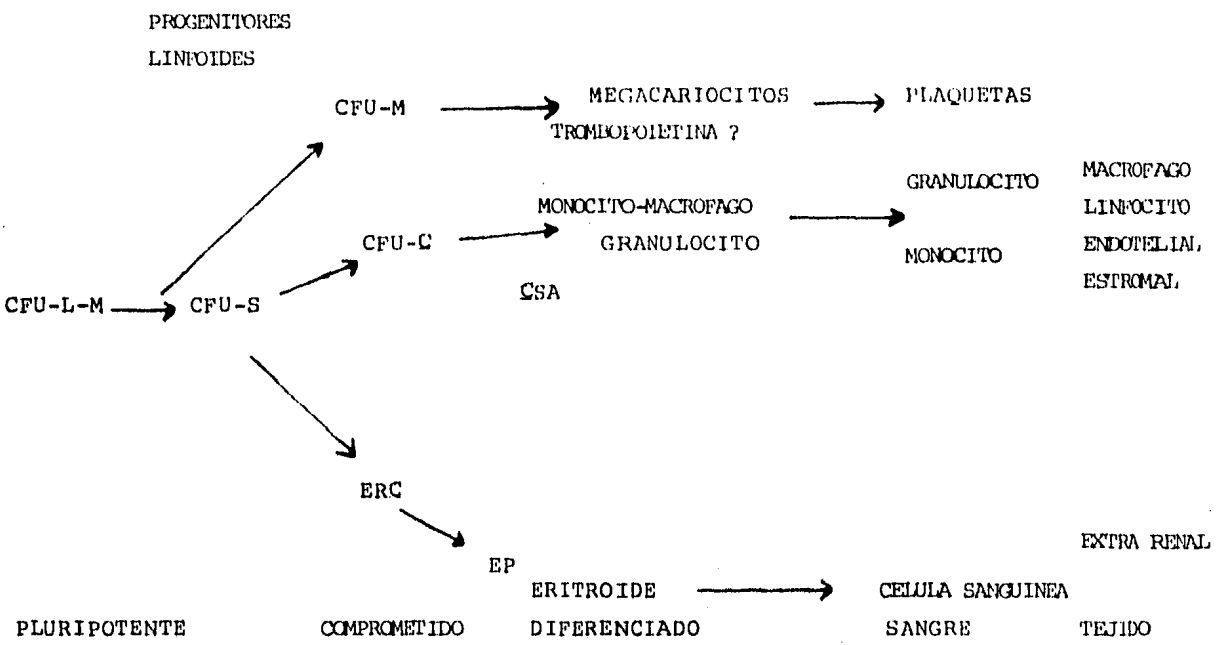


Fig. 1 Modelo de la hematopoiesis (1) .

las madres precursoras comprometidas o especializadas (CFU-C; del inglés "colony forming unit culture") capaces de originar in vitro colonias mixtas de polimorfonucleares y macrófagos (13). Asímismo se ha encontrado células madre especializadas que generan eritrocitos en presencia de eritropoyetina (CFU-E; del inglés "erythroid colony - forming unit") (13-15) o células precursoras de megacariocitos que darán lugar a las plaquetas (CFU-M; del inglés " colony forming unit- megakaryocyte ").

En los ensayos clonales in vitro para células precursoras de granulocitos-mocitos-macrófagos, se ha observado que la proliferación requiere de la presencia obligada de un factor llamado " colony stimulating activity " (CSA) (16-20), también llamado " colony stimulating factor " (CSF) (21-23) o "macrophage and granulocyte inducer" (MGI) (24-25) y que probablemente tiene relación con el llamado "macrophage growth factor" (MGF) (26).

El MGI es una sustancia normalmente producida por varios órganos del cuerpo y dependiendo de la fuente de que se trate puede encontrarse en cantidades mayores o menores (27).

Los receptores de superficie son de importancia obvia para la actividad biológica de los leucocitos. Los receptores de membrana característicos de la actividad biológica del macrófago, son los receptores para la porción Fc de la IgG, receptores para el complemento y receptores no específicos denominados también receptores para sustancias extrañas (28).

Aparentemente, la función de los receptores de superficie en los leucocitos, consiste en incrementar la respuesta inmune celular. Los estudios hechos recientemente acerca de la morfología de la interacción linfocito-macrófago en la respuesta inmune a un antígeno dado, proporcionan una oportunidad de poder correlacionar la estructura y función en este aspecto de la inmunidad (28).

Las inmunoglobulinas han sido específicamente relacionadas con los antígenos (29) especialmente la inmunoglobulina G (IgG) y con el complemento (30, 31). La IgG sola y la inmunoglobulina enlazada a componentes del complemento han aportado mucho al conocimiento de la selectividad de la adherencia macrofágica (32). El papel del anticuerpo en la fagocitosis selectiva mediada, dependen de la unión de una región del anticuerpo a un receptor o sitios de reconocimiento en la superficie del macrófago.

Entonces la molécula de IgG aparentemente se une inmunoespecíficamente a los organismos a través de su porción variable de su región Fab y a la superficie macrofágica vía su región Fc (33, 34). Los receptores para la región Fc de la IgG en la superficie de los macrófagos son importantes para el combate de las infecciones parasitarias (35, 36). Además de su función en la eliminación de agentes extraños, los receptores Fc funcionan en la eliminación fisiológica de eritrocitos viejos por medio de los macrófagos (37). Estos eritrocitos son sensibilizados o cubiertos por inmunoglobulinas autónomas *in situ*, promoviendo consecuentemente la fagocitosis por macrófagos hepáticos y del bazo (38-40).

La presencia de receptores para Fc comúnmente se demuestra por medio de la técnica de formación de rosetas eritrocitarias (28). Cuando un anticuerpo cubre a los eritrocitos, éstos se unen a la superficie de los leucocitos dando lugar a lo que se ha denominado roseta, la cual se considera como aquella célula con más de tres eritrocitos adheridos a su membrana (41).

Se han mencionado otras técnicas menos comunes para la valoración de estos receptores con fluoresceinatos de anticuerpos (42) o por medio de radioisótopos (43-45).

La afinidad de los macrófagos por complejos de antígenos con IgG ha sido caracterizada, e indica que los enlaces en el receptor dependen de un número finito de sitios activos. Los complejos inmunes se combinan más ávidamente,

posiblemente porque se ofrece un número adicional de receptores Fc por complejo molecular (46-48), o porque ellos inducen cambios conformacionales en los componentes del Fc (49, 50).

El receptor Fc une varias subclases específicas del IgG, incluyendo las subclases IgG_1 e IgG_3 (51), IgG_{2A} e IgG_{2B} (52) y posiblemente la subclase IgG_1 en el ratón (53). Dependiendo del método empleado y de la especie que se examina, el macrófago posee aproximadamente 10^5 receptores en su membrana. Mediante el complejo soluble peroxidasa-antiperoxidasa, se ha podido demostrar que hay mayor número de receptores en los macrófagos que en los granulocitos, los cuales a su vez presentan una frecuencia mayor de tales receptores que los linfocitos (54). El receptor para Fc es sensible a la digestión con fosfolipasa y para su actividad depende de un componente lipídico (28).

La regeneración o conservación selectiva de estos receptores después de la unión con complejos inmunes puede ser un fenómeno que se relaciona con el tamaño o la cantidad total del material ingerido (55).

Los receptores para el complemento, presentes en la membrana del macrófago, tienen una función importante en la eliminación de los patógenos invasivos. Estos receptores estan involucrados en la defensa del hospedero. La adherencia secuencial de los productos del complemento, da lugar a partir del tercer componente a una mayor susceptibilidad para la ingestión en estas células (56). En pacientes con una deficiencia hereditaria o metabolismo anormal de receptores C_3, se evidencia la importancia biológica de este sistema. Estos pacientes son susceptibles a infecciones bacterianas recurrentes (57, 58), puesto que se disminuye la capacidad opsonizante del suero; ordinariamente estas infecciones pueden ser controladas por los fagocitos en presencia de suero normal (59).

El sistema del complemento es un conjunto de proenzimas de origen glicoproteico, que se encuentran en la sangre

de todos los vertebrados en forma inactiva (60). Constituyen aproximadamente del 10 al 15% de las proteínas séricas. Este sistema es activado en forma de cascada : una proenzima es transformada a enzima y ésta a su vez actúa sobre la siguiente proenzima transformándola a enzima y así sucesivamente (60).

La activación del complemento puede llevarse a cabo por dos vías : una vía clásica, que es a través de una reacción antígeno-anticuerpo (mecanismo específico), en donde el anticuerpo es fijador del complemento. La otra forma de activación es conocida como vía alterna o vía de la properdina; esta vía es considerada como un mecanismo de resistencia no específico (60).

Los receptores del complemento se encuentran, entre otros en los leucocitos, en los eritrocitos de primates y en las células epiteliales de los glomérulos renales (61).

Es posible que los receptores para el complemento estén implicados en la inhibición de la migración de los macrófagos por medio de endotoxinas (62). Dicha influencia podría se efectuada por factores que se sabe son generados por el complemento y el sistema de coagulación sanguínea, los cuales pueden actuar sobre la membrana plasmática para inducir la activación de los macrófagos (63).

Entre las técnicas para la detección y cuantificación de receptores para el complemento, se encuentra la técnica de rosetas, utilizando para este fin eritrocitos sensibilizados (cubiertos con anticuerpo) más suero como fuente del complemento (64). Se sabe que los eritrocitos cubiertos con IgM son incapaces de unirse a los macrófagos, pero cuando estos eritrocitos son incubados en presencia de suero fresco, la unión puede existir (56 - 65).

Las numerosas observaciones de la membrana de los macrófagos indican que existe un número relativamente pequeño de receptores de alta afinidad para el complemento (66). Además, existen evidencias de que la unión del complemento requiere de la presencia de magnesio (67). De la mis

ma forma se ha observado que este tipo de receptores es sensible a la tripsina (68).

La maduración gradual de las células hematopoyéticas ha sido caracterizada tradicionalmente por una serie de cambios en la mofología celular. No obstante, se ha trabajado poco para definir la diferenciación de los leucocitos en relación con la aparición de receptores sobre sus membranas, ya que las células precursoras van adquiriendo marcadores a medida de que se diferencian (69). Estudios recientes han evidenciado la existencia de un factor inductor de la aparición de receptores para Fc (FcRI), el cual se obtuvó a partir de una línea celular de tipo macrófagico mantenida in vitro y activada por lipopolisacáridos de origen bacteriano (LPS). Además se encontró que este factor pierde su actividad biológica al ser sometido al tratamiento proteolítico y al calor, lo cual indica que es de naturaleza proteíca (70). Asímismo, se ha encontrado un factor inductor de la formación de receptores en C_3 (C_3RI) en medio condicionado de pulmón murino endotóxico (71). Se aportó que el C_3RI es sensible a la tripsina y termolábil; es decir, es de naturaleza proteíca y es independeinte del factor inductor de macrófagos y granulocitos (MGI) ya que este no induce a la formación de colonias al utilizar la técnica en bicapa de agar. Asímismo, se ha identificado a las células monocíticas como las productoras de los factores FcRI y C_3RI (72) lo cual implica un posible mecanismo de autorregulación de inducción de receptores Fc y C_3 en leucocitos.

En la actualidad se conoce parcialmente como actúan algunos de los factores diferenciadores y promotores de la proliferación del tejido hematopoyético (73), pero solamente puede suponerse por analogía la acción de otros, ya que en un sistema tan complejo como el organismo vivo, es difícil, y ha sido casi imposible, evaluar y determinar cuantitativamente el papel de cada factor en la histogénesis de los tejidos hamatopoyético y linfoide (74).

Se ha encontrado que la acción de los factores sobre la proliferación y diferenciación, se encuentra contrarrestada en el organismo por otras sustancias con propiedades inhibidoras. Por ejemplo, se ha reportado que la presencia de lactoferrina inhibe la proliferación de granulocitos y macrófagos (75-81), de la misma forma se ha investigado la acción inhidora de sustancias como las prostaglandinas, las chalonas y otras moléculas provenientes de medios condicionados con células maduras (17, 77, 80, 82, 83) . En consecuencia, se piensa que existe en el organismo un mecanismo de regulación tanto para el aumento de la producción de elementos sanguíneos como de su inhibición; por lo que cualquier desestabilización de este sistema lleva al organismo a una hiper ó hipotrofia en las rutas de la proliferación y diferenciación celular dando origen a las enfermedades como la leucemia.

La leucemia es una enfermedad neoplástica de los tejidos linfoide y hematopoyético, la cual se encuentra propagada en un organismo al momento de su diagnóstico. Puede afectar cualquier tejido del cuerpo, pero debido a que siempre se ve afectada la médula ósea, es en este tejido en el que se puede diagnosticar su existencia (84).

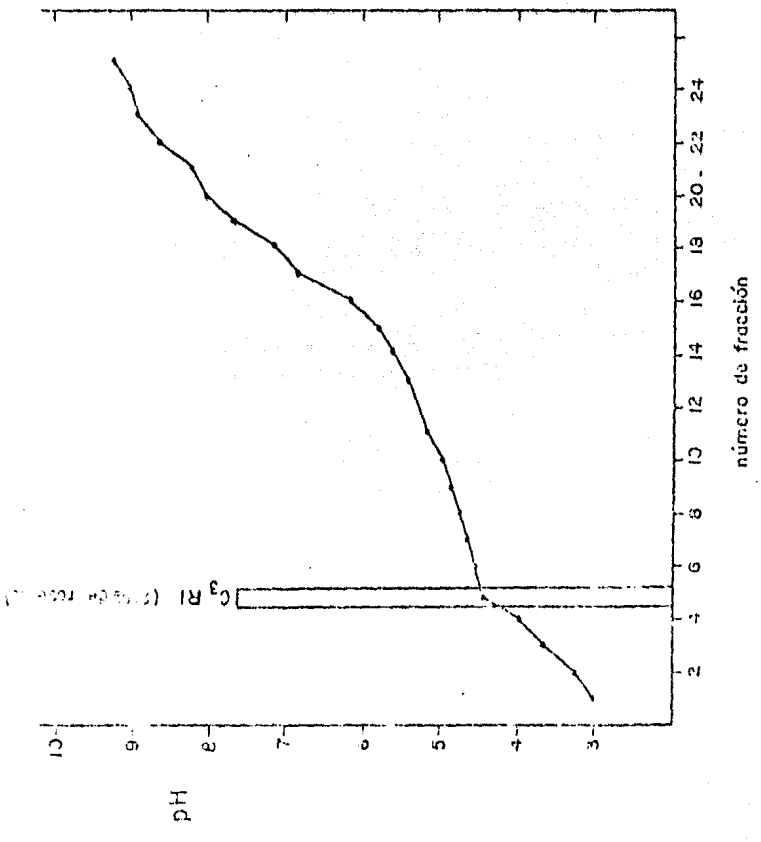
Se tiene reportes de pacientes con sintomatología leucémica desde los tiempos de Sócrates, esto es, anemia, granulocitopenia y trombocitopenia asociada con esplenomegalia y linfoadenopatía, sin embargo, no es sino hasta la segunda mitad del siglo 19 cuando se reconoce a la leucemia como una enfermedad diferente (85).

Fué desde 1827 cuando Velpeau (86), realizó una descripción detallada de la leucemia en uno de sus pacientes, haciendo notar la consistencia de la sangre y su color blanquecino; las investigaciones acerca del tema se sucedieron rápidamente, encontrando con Donné en 1839 un primer análisis microscópico de la sangre de un sujeto leucémico en el que confundió a los leucocitos como un producto extracelular (pus) y no como la célula misma (87).

Poco después, en 1845, el alemán Virchow describe la sangre de sus pacientes leucémicos como " escasos corpúsculos rojos y muy abundantes cuerpos incoloros o blancos similares a los existentes en la sangre normal" por lo que la definió como "sangre blanca" (88).
En 1847, Virchow introduce el término de leucemia para definir a la enfermedad (89).
Posteriormente, con la introducción de nuevas técnicas de tinción y el avance en el conocimiento morfológico celular, se proponen varias clasificaciones a los diferentes tipos de leucemias, habiendo entre los hematólogos una gran controversia, que viene a terminar con la introducción de técnicas químicas, bioquímicas, citogenéticas e inmunológicas en la clasificación de los diferentes tipos y fases de desarrollo de esta enfermedad.
La clasificación FAB (Franco-Americano-Británico)(90) es el resultado de la conjunción de criterios de varios hematólogos de la época actual, en la que se determinan los diferentes tipos de leucemias como sigue:
LEUCEMIA LINFOCITICA AGUDA (en niños).
Células predominantemente pequeñas, núcleo redondo, rara vez agrietado, cromatina homogénea, nucleolos inconspicuos. Citoplasma moderadamente basofílico, variablemente vacuolado. No fagocítico. Muchas células son positivas al suero anti linfocito nulo de leucemia linfocítica aguda. Alrededor del 25 % de las células tienen marcadores celulares T. Tiene actividad terminal transferasa.
Este tipo de leucemia se conoce como L_1.
LEUCEMIA LINFOCITICA AGUDA (en adultos).
La línea exterior del núcleo es irregular, a menudo agrietada, el patrón cromático nuclear es variable; uno o más nucleolos presentes. Citoplasma moderadamente abundante , variablemente basofílico, variablemente vacuolado. No fagocítico. Alrededor del 50 % de las células son positivas al suero anti linfocito nulo de leucemia linfocítica aguda. Alrededor del 25 % tienen marcadores celulares T. Tiene alta actividad transferasa terminal y pocas células

tienen cromosomas Phialdelphia.
Este tipo de leucemia se conoce como L_2.
LEUCEMIA TIPO BURKITT.
Las células son predominantemente alargadas, núcleo de redondo a ovalado con un borde exterior liso, con uno o más nucleolos prominentes.Citoplasma moderadamente abundante, profundamente basofílico, vacuolización a menudo prominente. Frecuentemente fagocítico. Negativo al suero anti linfocito nulo de leucemia linfocítica aguda. Todas las células tienen marcadores celulares B.
Este tipo de leucemia se conoce como L_3.
LEUCEMIA MIELOBLASTICA SIN FORMAS DE MADURACION.
Las células son predominantemente blastos no granulares. El patrón de cromatina nuclear es delicado, con uno ó más nucleolos. Citoplasma limitado, raramente con unos pocos gránulos, raramente tienen presentes bastones de Auer. Este tipo de leucemia se le conoce como M_1.
LEUCEMIA MIELOBLASTICA CON FORMAS DE MADURACION.
Las células presentan una maduración superior a las del estado progranulocítico, con el 50 % de blastos y progranulocitos. Las células más antiguas semejantes a los blastos, tienen abundante citoplasma, contienen gránulos azurófilos y a menudo también bastones de Auer. Los mielocitos, metamielocitos y los granulocitos maduros pueden ser granulares. En raros casos, las células son predominantemente eosinófilas. Algunos casos presentan también hiperplasia eritroide.
Este tipo de leucemia se le conoce como M_2.
LEUCEMIA PROGRANULOCITICA HIPERGRANULAR.
La mayoría de las células tienen citoplasma muy granular, la tinción de los gránulos es variable mente rosa, roja o púrpura; comúnmente tiene cuerpos de Auer, a menudo son bastantes. Una variante de este tipo, esta caracterizada por células con muy poca granulación en el citoplasma y un núcleo bilobulado, multilobulado ó reniforme.
Este tipo de leucemia se le conoce mo M_3.
LEUCEMIA MIELOMONOCITICA.

Fig. 4



ELECTROENFOQUE PREPARATIVO EN CAMA HORIZONTAL DE ULTRODEX, CON ANFOLITOS DE RANGO AMPLIO (3- 10).

DETERMINACION DEL pH ISOELECTRICO DEL FACTOR C_3RI CONTENIDO EN EL MEDIO CONDICIONADO POR TEJIDO PULMONAR HUMANO.

Para determinar el pH isoeléctrico del factor C_3RI contenido en el medio condicionado por pulmón humano, se procedió a efectuar un electroenfoque preparativo en cama horizontal de Ultrodex, con anfolitos de rango amplio (pH entre 3 y 9); utilizando 25 ml del medio condicionado.
Al utilizar 0.5 ml de cada una de las 25 fracciones obtenidas, se encontró únicamente la actividad de C_3RI en la fracción que corresponde al pH isoeléctrico de 4.4 (Fig. 4), con una inducción a la aparición de receptores C_3 de 21 % en comparación con el testigo de 10%.

DISCUSION.

Hasta el momento se sabe de la existencia de varios factores reguladores de la homeostasis en la sangre de los organismos y día con día estos factores se van caracterizando de tal forma que algunos ya se conocen sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Entre ellos, el MGI (Inductor de macrófagos y granulocitos) es uno de los más estudiados. En un principio se creyó que este factor era el causante de la proliferación y maduración completa de las células mieloides; sin embargo, recientemente se han descrito dos moléculas cuya función es la de inducir a la formación de receptores Fc (FcRI) y C_3 (C_3RI), complementando de esta forma la acción de MGI. Asímismo se ha determinado que es el macrófago el tipo de célula que produce el FcRI y C_3RI, indicando con esto la posible existencia de un mecanismo de autoregulación de la inmunofagocitosis. En este trabajo se informa de la presencia de ambos factores, en lagunos sueros humanos normales y de pacientes leucémicos.

En los casos analizados de sueros humanos normales, en nuestras condiciones de cultivo, se puede determinar que existe una gran variabilidad inherente a la especie en cuanto a la producción de estos factores, pero que sin embargo, existe un rango en el que se encuentran la mayoría de los sueros probados.

Uno de los sueros humanos normales en donde de detectó altas concentraciones de FcRI fué donado por un individuo que se encontraba enfermo al momento de la toma de sangre y que en una posterior muestra, tomada una vez que salió del cuadro de faringoamigdalitis, se encontraron niveles

normales de ambos factores. Tomando en cuenta que el FcRI y C_3RI son secretados por los macrófagos, podría esperarse que en procesos infecciosos haya aumento de estos factores ya que hay por lo general un aumento de estos tipos celulares; en consecuencia, no sería difícil encontrar altas concentraciones de los factores en personas enfermas, las que por este proceso aumentan su capacidad defensiva. Por otro lado, también se encontró un sólo caso de un individuo clínicamente sano y que donó dos muestras en dos diferentes tiempos y en las cuales se detectó una elevada concentración de ambos factores. Siendo que esta persona refirió ser extraordinariamente sana, o sea, no presentar cuadros de padecimientos infecciosos ni de otra naturaleza, podríamos interpretar que la elevada cantidad de FcRI y C_3RI en este individuo, le proporcione constantemente un mecanismo de defensa inmunológica: sin embargo, no hay que perder de vista que podría existir algún otro mecanismo de inducción a la defensa en este individuo que podría no haberse detectado en el examen clínico rutinario que se le practicó.

Es interesante hacer notar la persistencia de altas concentraciones de ambos factores en los SHL con LGC lo cual nos indica una vez más, que son las células fagocíticas maduras las productoras de FcRI y C_3RI. Este razonamiento se refuerza al no encontrar actividad en los sueros tanto de un paciente que pasó de LGC en fase crónica a una fase aguda y en otro en crisis blástica. El hecho de que los pacientes que han pasado de LGC a crisis blástica carezcan de los factores y de que un elevado porcentaje de pacientes con LGC no tienen una gran concentración de C_3RI, podría indicar que en el camino de la diferenciación celular normal, el FcRI se produce antes que el C_3RI. Consideramos de importancia el hecho de que el paciente con LGC que se encontraba en el límite del paso a crisis blástica no presentaba ninguno de los factores, ya que esto podría utilizarse como un apoyo que afine el diagnóstico clínico

Sin embargo, no hay que perder de vista que la elevación del FcRI y C_3RI se puede deber a factores más directamente relacionados con la enfermedad. Para ello se evaluaron estos factores en sueros de pacientes con diversos tipos de leucemias y como era de esperarse no se encontraron resultados semejantes a los obtenidos con LGC. Nuestros resultados mostraron únicamente dos casos con una elevación del FcRI, uno en una M_3 y el otro en una M_4 . En el caso de la M_3 se puede explicar debido a que en este tipo de leucemias se encuentra una producción de granulocitos importante y en el caso de la M_4 la existencia de algunas formas de monocitos más diferenciadas. No obstante en los otros cuatro casos de estos tipos de leucemias, nó se presentaron estas variaciones. Estas diferencias, en caso de ser reconfirmadas al ensayar un mayor número de casos, pudiesen contribuir a la determinación del grado de desarrollo de la enfermedad, reflejado en el grado de diferenciación de las células que la componen.

En cuanto a la caracterización del factor C_3RI, nuestros resultados evidencian por primera vez la secreción del factor C_3RI por células humanas en cultivo bajo estímulo endotóxico (LPS); es importante mencionar que el factor C_3RI no se había encontrado en orina ni en suero humano, donde sí se encontró el FcRI (70, 71). Además, al comparar los pesos moleculares obtenidos se puede decir que el pico principal del factor FcRI tiene un peso similar al citado para el FcRI de origen murino y el encontrado en orina humana; mientras que la masa molecular del C_3RI de origen humano presenta diferencias con la de origen murino. El C_3RI murino tiene un peso molecular de 35000 daltones y un pH isoeléctrico de 3.9, el C_3RI humano tiene 15000 daltones de peso molecular y un pH isoeléctrico de 4.4 . Por último es muy interesante el hecho de que estos factores son interespecíficos ya que los factores de origen humano fueron activos en células de médula ósea murina.

Sería de gran importancia en un futuro, continuar con la purificación bioquímica de ambos factores, tanto por su po -

sible aplicación terapéutica en padecimientos en los cuales un aumento de receptores para Fc y C_3 , pueda ser de utilidad, como por su probable valor diagnóstico mediante la producción de anticuerpos que permitan detectar en forma inmediata la existencia de niveles anormales de estos factores en el organismo y como por su utilización en el estudio de los mecanismos de diferenciación celular e inmunofagocitosis.

BIBLIOGRAFIA

1. Quesenberry P, Levvitt L (1979) Hematopoietic steam cells. New Eng. J. Med. 301:755
2. Weiss L (1977) The Blood. En: Weiss L (ed) Histology. Mc Graw Hill, New York, p 432
3. Malcon A, More M (1978) Regulation of granulopoiesis in vitro. Academic Press
4. Ford C E, Hamerton J L, Barnes B W H (1956) Cytologic al identification of radiation - chimaeras. Nature 432:453
5. Lindsley D L, Odell T T, Tausche F G (1955) Implantation of functional erytrhopoietin elements following total body irradiation. Proc Soc Exp Biol Med 90:512
6. Mitchinson N A (1956) The colonisation of irradiated tissue by transplanted tissue spleen cells. Br. J. Exp. Pathol. 37: 239
7. Nowell P C, Cole L J, Habermayer J G (1956) Growth and continued function of rat marrow cells in X-radiated mice. Cancer Res, 16: 258
8. Till J E, McCuloch E A (1961) A directed measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat. Res. 14: 213
9. Becker A J, McCuloch E A, Till J E (1963) Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. Nature 197: 452
10. Curry J L, Trentin J J (1967) Hemopoietic spleen colony studies. I Growth and differentiation. Dev. Biol. 15: 395
11. Curry J L, Trentin J J, Cheng U (1967) Hemopoietic spleen colony studies. III Hemopoietic nature of spleen colonies induce by limph node or thymus cells,

12. Frentin J, Wolf N, Cheng J (1967) Antibody production by mice repopulated with limited numbers of clones of lymphoid cell precursors. J. Immunol. 98: 1328
13. Dexter T M (1978) Stem cells in vitro. En: Golde D W, Cline N, Metcalf D, Moore M A S eds. Hematopoietic cell differentation. Vol. X. Academic Press, N Y, p 163
14. Philips R A, Jones E V, Miller R G (1978) Different otential of hema-opoietic stem cells. En: Golde D W, Cline N, Metcalf D, Moore M A S eds. Hematopoietic cell differentation. Vol X. Academic Press, N Y, p 129
15. Bach J F (1963) Immunology. Wiley Medical, N Y, p 72
16. Bradley T R, Metcalf D (1966) The growth of marrow cells in vitro . Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 44: 287
17. Pluznik D H, Sachs L (1965) The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. J. Cell Comp. Phisiol. 66: 319
18. Eaves A, Bruce W (1973) In vitro production of colony stimulating activity. I Expositure of mouse peritoneal cell to endotoxin. Cell Tissue Kinet 7: 19
19. Brice G, Krosgrud R, Steward S, Gen J (1973) Heterogeneity of colony stimulating activities. En: Golde D W Cline M, Metcalf D, Moore M A S eds. Hematopoietic cells differentation. Academic Press, N Y, p 185
20. Ralph P, Broxmeyer H, Moore R, Nakoins I (1978) Induction of myeloid colony stimulating activity in murine monocite tumor cell lines by macrophage activators as in a "T" cell by concavalin A. Cancer Res. 38: 1414
21. Metcalf D, Johnson G R, Burger A W (1980) Direct stimulation by purified GM-CSF of the proliferation of multipotential and erithroid precursor cells. Blood 55: 1
22. Steward C, Line H (1978) Macrofage growth factor and it is relationship to colony stimulation factor. J. reticul endothel. soc. 4: 269
23. Laukel H, Gasel W D, Dotch M H, Haverman K (1978) Preparation of colony stimulating activity from large batches of human urine and production of antisera against it. J. Cell Phisiol. 94: 21
24. Di Persio J F, Bronman J R, Lichman M A, Spicer S L

(1978) Granulocyte grow modulaters elaborated by human cell lines in: Hematopoitic cell differentiation. Blood 51: 3

25. Metcalf D, Foster R (1977) Behavoir of transfer of serum stimulated bone narrow colonies. Proc. Nat. Acad. Sci. 68: 10
26. Landau T, Sachs L (1971) Characterization of the inducer required for the develoment of macrophage granulocytes colonies. Proc.Nat. Acad. Sci. 68: 70
27. Bianco C, Patrick P, Nussenzweig V (1970) A populations of limphocytes bearing a membrane for antigen-antibody complement complexes. I. Separation and characterization J. Exp. Med. 132: 702
28. McKeever P, Spicer S (1980) Surface receptor of mononuclear phagocytes. In: Carr I, Daems W eds. Reticuloendothelial System. Vol. I. Plenum Press, New York, pp 161
29. Vaughan R (1965) The discriminative behavoir of rabbit phagocytes. Br. J. Pathol46: 71
30. Jones T (1975) Attachment and ingestion phases of phagocytes. In: Furt R van ed. Mononuclear phagocytes in immunity, Infection and Pathology. Blakwell, Oxford, pp 269
31. Muller-Eberhard H (1968) Chemestry and actionism of complemente. Adv. Immunol. 8: 1
32. Haranaka K, Matsuo M, Mashimo K (1977) The enhancement of phagocytosis and intracellular killing of Pseudomonas aeroginosa and its common antigen (OEP) coated latex particles by mouse spleen macrophages to which anti-OEP IgG and Gentamicin Have been added. Jpn. J. Exp. Med. 47: 35
33. Ratcliffe A & Stanworth D R (1983) The localization of the binding site (s) on human IgG for the Fc receptors on homologous monocytes and heterologous mouse macrophages. Immunology 50: 93
34. Rasmussen J M, Brandsland I, Leslie R G Q & Svehag S E (1983) Quantitative studies of Fc receptors on human monocytes: Characterization by binding of homologous and heterologous monomeric IgG and soluble immune complexes of different composition. Immunology 49: 537
35. Shear H, Nussenzweig R, Bianco C (1979) Immune phagocy-

[illegible] Mahmoud A A F (1976) Mouse antibody dependent eosinophil and macrophage adherence and damage to schistosomula of Schistosoma mansoni. J. Immunol. 122: 396

37. Knyszynski A, Levobit S, Danon D (1977) Phagocytosis of "old" red blood cell by macrophages from singenic mice in vitro. Exp. Hematol. 4: 30

38. Shinomiya H, Sukegawa T, Mieko Hatanaka S Utsumi S (1983) Parallelism between regulatory effects of erythrocyte glicoproteins on phagocytosis and on alternative complement pathway. Immunology 49: 649

39. Jancik J, Schaver R (1978) Sequestration of neuroaminidase treated erythrocyte. Studies on it is topografic, morphologic and immunologic aspects. Cell Tisue Res. 136: 209

40. Kulberg A J, Sicheva I M, Yurin E, Tarkhanova I, Freidlin I, Kravtsov N (1983) Antibodies against Fc receptors to aggregated IgG of mouse spleen cells: Selective blocking of the receptors of splenocytes and peritoneal macrophages, and abolition of the phagocytosis enhancement produced by the opsonizing IgG antibodies. Immunology 50: 335

41. Bianco C (1976) Methods of study of macrophage Fc and C_3 receptors. En: Bloom B, Davies J eds. In vitro methods in cell mediated and tumor immunity. Academic Press, N Y, pp 407

42. Thrasher S, Bigazzi P, Yhosida T, Cohen S (1975) Distribution of cytophilic and antimacrophage antibody on the macrophages surface. Immunol Commun 4: 219

43. Kuhn R Cassida G (1978) An indirect quantifiable assay for cytophilic antibody. J Immunol Methods 19: 337

44. Unkeless J, Eisen H (1975) Binding of monomeric immunoglobulins to Fc receptors of mouse macrophages. J. Exp. Med. 142: 1520

45. Fiona M R, Moira G, Freda J, Gandilans G P (1983) Modulation of mouse peripheral blood lymphocytes Fc receptors by immune complexes: Recovery of Fc receptors

in the presence of normal human serum. Immunology 3
251

46. Phillips-Quagliata J, Levine B, Quagliata F, Uhr J (1971) Mechanism of underlying binding of immune complexes to macrophages. J. Exp. Med. 133: 589
47. Segal D M, Titus J (1978) The subclass specificity for the bindinf of murine myeloma proteins to macrophage and lymphocyte cell lines and to normal spleen cells. J. Immunol. 120: 1395
48. Benacerraf B (1968) Cytophilic immunoglobulins and delayed hipersensitivity. Fed. Proc. 27: 46
49. Shinomiya T, Koyama J (1976) In vitro uptake and digestion of immune complexes containing guinea pig IgG_1 and IgG_2 antibodies by macrophages. Immunology 30: 267
50. Thrasher S, Cohen S (1971) Studies of the mechanism of binding of chemical modified cytophilic antibody to macrophages J. Immunol. 107: 672
51. Huber H, Holme G (1975) Surface receptor of mononuclear phagocytes: effect of immune complexes on in vitro function of human monocytes. In: Furt R van ed. Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology. Blackwell, Oxford, pp 291
52. Rudders R, Andersen J (1982) IGD-Fc receptors on normal and nwoplastic human B lymphocytes. Clin. Exp. Immunol. 50: 579
53. Unkeless J, Eissen H (1975) Binding of monomeric immunoglobulin to Fc receptors of mouse macrophages. J. Exp. Med. 142: 1520
54. McKeever P, Garvin A, Spicer S (1976) Immune complexes receptors in cell surface. Ultraestructural demostration of macrophages. J. Histochem. 24: 948
55. Munthe-Kass A S (1976) Phagocytosis in rat Kuffer cells in vitro. Exp. Cell Res. 99: 319
56. Gigli I, Nelson R (1968) Complement dependent immune phagocytosis. I. Requeriments for C_1, C_4, C_2, C_3. Exp. Cell Res. 51: 45
57. Kinamura H, Nishimukai H, Sano Y, Nagaki K (1984) Study of C_3 like factor in the serum of a C_3 deficient subject. Immunology 51: 259

59. Alper C, Colten H, Rosen F, Rabson A, Macnab G, Gear J (1972) Homozigous deficiency of C_3 in a patient with repeated infection. Lancet 2: 1179

60. Ward H, Enders J (1983) An analysis of the opsonic and tropic action of normal and immune sera based on experimental with the Pneumococcus. J. Exp. Med. 57: 527

61. Osler A, Sandberg A (1973) Alternate complement pathways. Prog. Allergy 17: 51

61. Mc Conell I, Lachman P (1977) Complement receptor and cell components. In: Cinader B ed. Immunology of receptors. Marcel Dekker. New York, pp 111

62. Heilman D H (1977) Regulation of endotoxin-induced inhibition of macrophage migration by frsh serum. Infect Immunology 17: 371

63. Bianco C, Griffin D, Silverstein S (1975) Studies of the macrophage complement receptor, Alterated of receptor function upon macrophage activation. J. Exp. Med. 141: 1278

64. Griffin J F, Bianco C, Silverstein S (1975) Characterization of the macrophage receptors for complement and demostration of it is functional independence from the receptors for the Fc portion of immunoglobulin G. J. Exp. Med. 141: 1269

65. Møller N P H, Pedersen T S (1983) Fc-mediated immune precipitation. IV. Antigen dependency and specifity. Immunology 48: 477

66. Ehlenberg A C, Nussenzweig V (1972) The role of the membrane receptor for C_{3b} in phagocytosis. J. Exp. Med. 145: 1563

67. Lay W E, Nussenzweig V (1968) Receptors for the complement on leukocyte. J. Exp. Med. 128: 991

68. Aracz W, Pituch N A, Popiela T, Zembala M (1982) The Fc receptors of normal and cancer patients monocytes. Immunology 163: 450

69. Rabellino E M, Gordon D F, Williams N, Metcalf D (1978) Sequential expression of membrane receptors and phagocytic capacity during leukocyte differentation. J. Exp. Med. 147: 434

70. Calcagno M, Pérez J R, Waldo M G, Cabrera G, Weiss-Steider B (1982) Evidence of the existence of a factor that induces Fc receptors on bone narrow cells. Blood 59: 757

71. Calcagno M, Ríos B, Fragoso A, Arciga M A, Torres R, Weiss-Steider B (1983) Evidence of a factor that induces C_3 receptors on bone narrow cells. Blood 61: 403

72. Fragoso A, Arciga M A, Calcagno M, Weiss-Steider B (1985) Determination of the inducers of Fc (FcRI) and C_3 (C_3RI) receptors myeloid cells in several media - from human and mouse origen, and the identification of the macrophage as the cell that produces these factor. Experimental Hematol. 13: in press

73. Pluznik D, Sachs L (1965) The cloning of normal mast cells in tissue culture. J. Cell Comp. 55: 319

74. Bradley T, Stanley E, Summer N (1971) Factor from mouse bone marrow cells in vitro. Aust J Exp Biol 28: 277

75. Broxmeyer H E, Gentile P, Bognacki J, Ralph P (1983) Lactoferrin, transferrin and acidic isoferritins regulatory molecules with potential therapeutic value in leukemia. Blood 9: 83

76. Burges A W, Metcalf D (1980) The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors Blood 56: 947

77. Cline J M, Fitchen H J (1978) Inhibitors of granulopoiesis. En David W, Golde M J, Metcalf D C eds, Hematopoietic cell differentiation, Academic Press, pp 461

78. Kurland I J (1978 Dependence upon colony stimulating factor for the syntesis of prostaglandin E by normal and neoplastic mononuclear phagocytes. In: David W, Cline M J, Metcalf D, Fox F Hematopoietic cell differentation, Academic Press, pp 479

79. Miura Y S T, Motoyoshi K, Takaku F (1982) Studies on nude mice bearing human CSF producing tumor III. Colony type of granulocyte-macrophage precursors of nude mice bearing CSF-producing tumor. Stem cells 2: 335

80. Montensen R F (1983) Inhibition of colony formation by macrophage comitted stem cells during acute infla

mation by purified human C-reactive protein (CRP) Exp. Hematol. 11: 730

81. Pelus L M, Broxmeyer H E, Kurland J I, Moore M A S (1979) Regulation of macrophages and granulocyte proliferation specificities of prostaglandines E and lactoferrin. J. Exp. Med. 150: 277

82. Schenkeim H A, Rutherford B (1984) C_3-mediated release of prostaglandin from human monocytes. Behavoir in short-term culture. Immunology 51: 83

83. Metcalf D, Wilson J E (1976) Endotoxin-induced size change in bone narrow progenitors of granulocytes and macrophages. J. Cell Physiol. 89: 381

84. Wiernik P H (1982) Acute leukemias of adults. In: De Vita V T, Hellman S, Rosenberg S A (1982) Principles and practice of oncology. Lippincot J B ed. Company pp. 1402

85. Cahen (1856) Discusión en Bull. Soc. Med. Hop. París 3, 55 En: Dameshe K W, Gunz F (1967) La Leucemia ed. Científico Médica, Barcelona, España.

86. Velpeau A (1822) Rev. Med. 2: 218 citado por Virchow en: Dameshe K W, Gunz F op. cit.

87. Donné A (1844) Cours de Microscopie pp 132. En: Williams W J, Buetler E, Ersler A J, Rundles R W eds. Hematology pp 673 New York MacGraw-Hill 1972

88. Virchow R (1846) Weisses Blut und Milztumoren 1 Med. Z. 15: 157. En: Dameshe K W, Gunz F op. cit.

89. Virchow R (1847) Weisses Blut und Milztumoren 2 Med. Z. 16: 9. En: Damshe K W, Gunz F op. cit.

90. Miale J B (1982) Laboratory Medicine Hematology ed. C. V. Mosby Company 6th edition. St. Louis, Toronto, London

91. Fitzgerald P H, Pickering A F. Eiby J R (1971) Clonal origin of the Philadelphia cromosome and chronic myeloid leukemia. Br. J. Hematol. 21: 473

92. Rosenthal S, Canellos G P, Whang-Pheng J (1977) Blast crisis of chronic granulocytic leukemia, morphologic variants and therapeutic implications. Am. J. Med. 63: 542

A P E N D I C E S

APENDICE 1

MEDIO MINIMO ESENCIAL DE EAGLE

Este medio se utilizó para mantener a los cultivos celulares en condiciones mormales in vitro. A continuación se hace mención de los componentes químicos de los cuales está formado este medio.

AMINOACIDOS	mg/l
L- Arginina	84.0
L- Cistina	62.57
L-Glutamina	584.0
Glicina	30.0
L-Histidina HCl.H_2O	42.0
L-Isoleucina	105.0
L-Leucina	105.0
L-Lisina.HCl	146.0
L-Metionina	30.0
L-Fenilalanina	66.0
L-Serina	42.0
L-Treonina	95.0
L-Triptofáno	16.0
L-Tirosina (Sal Disódica)	104.2
L-Valina	94.0

VITAMINAS	mg/l
D-Ca Pantotenato	4.0

Cloruro de colina	4.0
Acido Fólico	4,0
Inositol	7,2
Nicotinamida	4,0
Piridoxal.HCl	4,0
Riboflavina	0,4
Tiamina	4,0

SALES INORGANICAS	mg/l
Cloruro de calcio anhidro	200,0
Nitrato de Fierro III nonahidratado	0,1
Cloruro de Potasio	400,0
Sulfato de Magnesio Anhidro	97,67
Cloruro de Sodio	6400,0
Fosfato monosódico monohidratado	125,0

OTROS COMPUESTOS	mg/l
L-Glucosa	4500,0
Rojo Fenol	15,0

En 950 ml de agua destilada, se diluyó el medio en polvo agitando ligeramente, se adicionaron 3.7 g/l de bicarbonato de sodio, además los antibióticos Penicilina G 100 U/ml y Estreptomicina 100 µl/ml. Posteriormente se aforó a un volumen de 1000 ml y se agitó hasta disolver, sin sobreagitar. El medio fué ajustado a un pH de 6.9 y después se filtró con filtros Millipore (Millipore, USA.) con un tamaño de poro de 22 micras. Finalmente el medio se almacenó a 4°C hasta el momento de su uso.

APENDICE 2

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS

Esta solución se usó para mantener a las células, en condiciones fisiológicas estables durante períodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes fueron diluídos en un volumen final de 1000 ml de agua bidestilada.

Cloruro de Magnesio	0.1 g
Cloruro de Calcio	0.1 g
Cloruro de Sodio	8.0 g
Cloruro de Potasio	0.2 g
Fosfato monoácido de Sodio	2.16 g
Fosfato diácido de Potasio	0.2 g

El cloruro de magnesio y el de calcio fueron disueltos en 100 ml de agua bidestilada. Las restantes sales, por separado, se diluyen en 800 ml de agua bidestilada y después se adicionan los 100 ml que se prepararon inicialmente. En seguida se aforó a un volumen final de 1000 ml y está solución se ajustó a un pH de 7.2 a 7.4; se procedió a esterilizar la solución utilizándose filtros de membrana (Millipore, USA.) con un diámetro de poro de 22 micras. Finalmente la solución se almacenó a una temperatura de 4°C hasta el momento de su uso.

APENDICE 3

SOLUCION DE ALSEVER

Esta solución permite mantener a los eritrocitos de carnero en condiciones estables por largo tiempo, aproximadamente 30 días, a una temperatura de 4°C. La fórmula dada abajo es una modificación de la fórmula original de Alsever.

Dextrosa	20.5 g
Citrato de Sodio dihidratado	8.0 g
Acido Cítrico monohidratado	0.55 g
Cloruro de Sodio	4.2 g
Agua destilada	1 litro

En 900 ml de agua destilada se disolvieron sucesivamente cada una de las sustancias, posteriormente se aforó a un volumen de 1000 ml. La solución se ajustó a un pH de 6.1 y se esterilizó en autoclave. Finalmente se guardó a una temperatura de 4°C hasta su uso. Esta solución se utilizó para colocar los eritrocitos de carnero en una proporción de 1:1.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer al Dr. Benny Weiss S. todo el apoyo que me ha dado para la realización de este trabajo reconociéndole la paciencia y don de gentes así como su capacidad e inteligencia.

Por otro lado agradezco a la Dra. Genoveva González, la M en C Concepción Sánchez, Alicia Brechú y René Hernández la revisión que hicieron de este trabajo así como sus acertados consejos para la culminación de él.

También agradezco al Dr. Mario Calcagno por su colaboración en la parte bioquímica de este trabajo.

Finalmente, expreso mi agradecimiento a Ranulfo Pedraza y José Chavarría por la colaboración técnica.

Por otra parte, agradezco al Dr. Zipitria por su apoyo con todo el material aportado por el Bioterio.