



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

INDUCCIÓN A LA AUTOPROLIFERACIÓN Y AUTODIFERENCIACIÓN DE MACROFAGOS MURINOS.

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

P r e s e n t a

ISAAC RODRIGO ZAMBRANO RAMÍREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

1.- INTRODUCCION

1.1. Diferenciación Celular.2
1.2. Inmunoglobulinas.5
1.3. Sistema del Complemento7
1.4. Receptores Fc9
1.5. Receptores C311
1.6. Macrófagos.12

2.- MATERIALES Y METODOS

2.1. Animales.22
2.2. Cultivo Celular22
2.3. Prueba de Esterilidad24
2.4. Tratamiento con Caseinato de Sodio,24
2.5. Obtención de Células.24
2.6. Elaboración de Medios Inductores,27
2.7. Otros Procedimientos.31

3. RESULTADOS.34
------------------------	-----

4. DISCUSION58
------------------------	-----

5. CONCLUSIONES.65
--------------------------	-----

6. APENDICES68
------------------------	-----

7. BIBLIOGRAFIA.72
--------------------------	-----

RESUMEN

Los macrófagos son células que tienen una función determinante en la defensa del organismo contra cuerpos extraños. Se han estudiado varias actividades de estas células como son: la producción de una amplia variedad de enzimas y componentes del sistema del complemento, así como la de inductores a la proliferación de precursores mieloides y fibroblastos. Asimismo, estas células intervienen directamente en la eliminación específica de antígenos mediante la formación de receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas y para el tercer componente del complemento. Los macrófagos de la médula ósea presentan una amplia heterogeneidad en la formación de receptores Fc y C3. Las posibles causas de tal heterogeneidad pueden ser la edad del animal, el sexo, cepa, estado de salud del ratón, o bien, a la existencia de subpoblaciones celulares así como al estado de diferenciación de las células.

En este trabajo se ensayó con médula ósea de 3 distintas cepas de ratones encontrándose variaciones en los porcentajes de rosetas Fc en cada una de ellas. Para determinar si el estado de diferenciación de las células era la causa de la variabilidad, se eliminaron las células maduras mieloides aprovechando su cualidad de adherirse al sustrato de cultivo, asimismo, se removieron de la médula las células maduras provocando su migración hacia la cavidad peritoneal.

En nuestros resultados se mostró que al eliminar a las células adherentes, no se evitó la heterogeneidad, sin embargo, al remover la reserva medular se logró cierta homogeneidad en el porcentaje de rosetas. Asociamos esto no al estado de diferenciación celular, sino a las condiciones de salud del animal.

No se detectó en el medio condicionado por macrófagos alveolares, ni FcRI ni MGI. Siendo que el FcRI se detectó en el medio condicionado de macrófagos inducidos a la cavidad peritoneal, suponemos que el macrófago alveolar tenga un origen diferente al de los peritoneales, o bien, que se encuentre en un estado de diferenciación distinto.

T A B L A D E
A B R E V I A T U R A S

- C-I: Cepa CD-1 del Bioterio de la E.N.E.P.-Zaragoza.
C-II: Cepa CD-1 del Bioterio del CINVESTAV, I.P.N.
C-III: Cepa NMR-1 del Bioterio del CINVESTAV, I.P.N.
C-IV: Cepa NIH del Bioterio del Hospital General de la S.S.A.
Fc: Fraccion cristalizabile de las inmunoglobulinas.
Fab: Fracción ligadora del antígeno (del inglés, Fraction Antigen-binding).
M. E.: Medio de Eagle
M.C.: Medio de Cultivo.
SAF: Solución Amortiguadora de Fosfatos.
SC: Suero de Caballo.
EA: Eritrocitos Activados con Anticuerpo.
EAC: Eritrocitos Activados con Anticuerpo más Complemento.
FcRI: Inductor de receptores Fc (del inglés, Fc Receptor Inducer).
C3RI: Inductor de Receptores C3b (del inglés, C3 Receptor Unducer).
LPS: Lipopolisacárido de Salmonella tiphymurium.
SE: Suero Endotóxico.
MCP: Medio Condicionado de Pulmón.
MCM: Medio Condicionado de Macrófagos Peritoneales.
MCMA: Medio Condicionado de Macrófagos Alveolares.
d.e.: desviación estandard.
c.v.: coeficiente de variación.

1. INTRODUCCION

1.1. Diferenciación Celular.

Un organismo superior no es un clon formado por células idénticas resultantes de las sucesivas divisiones del huevo, pues en su desarrollo interviene la diferenciación. Las diversas estirpes celulares procedentes de un huevo presentan sus propias características, la diferenciación se manifiesta desde las primeras divisiones del huevo, tal vez como consecuencia de una desigual distribución de los productos de reserva en las distintas células (1), o como resultado de las interacciones núcleo-citoplásmicas que producen una progresiva individualización del citoplasma y una creciente especialización de los núcleos de las células en particular (2).

La década de los 70's vió el desarrollo de técnicas in vitro para el cultivo y crecimiento de células precursoras hematopoiéticas representativas de muchos, si no de todos los elementos de la médula ósea (3). Actualmente se cuenta con técnicas que permiten el estudio morfológico y molecular de la diferenciación de células como los granulocitos, en donde se emplean cultivos líquidos y técnicas cromatográficas de gran definición (4).

Las células de la sangre (eritrocitos, plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos), son constantemente eliminados y por tanto para mantener la homeostasis cada sistema debe tener la capacidad de autorrenovación. En todos los mamíferos sus sistemas de renovación ocurren a través de la división celular. Los sistemas de autorrenovación deben de contener células primordiales, este tipo de célula puede ser definida en general, como aquella en la cual la progeñe resultante de la división celular, sea idéntica en apariencia y potencial a la célula madre (5). Un sistema de células primigenias que deba renovar compartimientos maduros también debe ser capaz de diferenciarse. Así, las características requeridas de un sistema de células primordiales hematopoiéticas son autorrenovación y diferenciación (5). La diferenciación distingue una línea celular de otra, ya que todas las células en individuos normales portan el mismo patrón genético. En general, se puede establecer que

que la síntesis de ADN es la clave para la actividad proliferativa. La síntesis de ADN parece ser un proceso importante para la diferenciación de muchos organismos (6, 7, 8).

El ADN también transmite el mensaje codificado en el ADN para la síntesis de proteínas. Sin embargo, muchos otros factores regulan procesos específicos de diferenciación, morfogénesis y organización celular (9, 10, 11). De esta forma observamos que cada una de las células sanguíneas debe ser repuesta en el compartimiento de células primordiales el cual permanece estable en tamaño bajo condiciones homeostáticas. Este compartimiento proporciona células diferenciadas y por tanto, una célula debe ser agregada al compartimiento por división por cada célula que abandone el compartimiento por diferenciación (12, 13). Muchos de los datos que se tienen hasta el momento, relacionados con el compartimiento de células primordiales, se han obtenido principalmente de estudios sobre colonias hematopoiéticas en el bazo de ratones (14, 15), colonias de granulocitos cultivadas in vitro de la médula ósea, así como con sangre de ratones (16) y de humanos (17, 18) y por cultivo in vivo mediante el empleo de cámaras de difusión (19).

Till y McCulloch (15), demostraron una relación lineal entre el número de células de médula ósea normal inyectadas en ratones letalmente irradiados, y el número de nódulos macroscópicos de tejido hematopoiético, presentes sobre el bazo de los ratones diez días después de la inyección. Subsecuentes estudios citogenéticos (20, 21) revelaron que estas colonias eran clonales, esto es, tenían su origen a partir de una sola célula. Tales colonias pueden contener eritrocitos, neutrófilos, megacariocitos y eosinófilos, indicando que la unidad celular formadora de colonias (CFU-cell, del inglés Colony Forming-Unit cell) es pluripotente para tales líneas celulares. No solo hay que considerar la presencia de la célula totipotencial, sino la existencia de otras ya que se han observado células capaces de dar origen a eritrocitos en presencia de eritropoietina (CFU-e, del inglés Erythroid Colony Forming-Unit) (3, 22, 23) y también se han encontrado células precursoras de megacariocitos que a su vez dan lugar a las plaquetas (CFU-M, del inglés Colony Forming-Unit-megakaryocyte).

A partir de la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos desarrolladas durante el siglo pasado (24), varios investigadores han ideado métodos para averiguar cuales son las moléculas implicadas en la proliferación y diferenciación celular (25). Hacia los comienzos de este siglo se introdujo la técnica de cultivo en agar la cual permite la separación de células en esta matriz semisólida y así estudiar el proceso de diferenciación celular a partir de los precursores indiferenciados (26). Al llevarse a cabo la división celular y ante el impedimento de la migración, se produce la formación de grupos celulares denominados colonias (27, 28). Destacan los trabajos de Pluznick y Sachs en 1965 y de Bradley y Metcalf en 1966 (29, 30), en el que lograron el cultivo de precursores hematopoiéticos, obteniendo colonias ya sea de macrófagos o granulocitos, o bien, colonias mixtas de ambos tipos celulares en agar. En estos trabajos se hizo evidente que no bastaban las condiciones nutricionales habituales, sino que era necesaria la presencia de inductores para la formación y proliferación de las células y la subsecuente formación de colonias (26, 31). Desde un principio, a este estimulante o inductor a la formación de colonias de macrófagos y granulocitos in vitro se le llamó MGI (del inglés, Macrophage and Granulocyte Inducer) (32) o CSA (del inglés, Colony Stimulating Activity), actualmente se emplea CSF (del inglés, Colony Stimulating Factor) (24, 33, 34, 35). Al llevarse a cabo el estudio de este factor, se encontró que consta de varias unidades con actividad simultánea para lograr la proliferación y diferenciación de los precursores mieloides (15, 36). Existen 3 formas distintas de MGI, las cuales difieren en su cualidad de inducir colonias de macrófagos (MGI-1M) (37), granulocitos (MGI-1G) (38), o de ambos tipos celulares (MGI-1MG). Además existe otra forma llamada MGI-2, la cual provoca exclusivamente la diferenciación de las células precursoras de macrófagos y granulocitos.

Al realizar el estudio bioquímico de los MGI, se ha encontrado que tienen propiedades de glicoproteína, ya que es termolábil, resistente a la acción del éter, de la desoxirribonucleasa y ribonucleasa y sensible a la acción proteolítica de la tripsina. Al efectuar la electroforesis de las moléculas, se encuentra que migran

inmediatamente después de la albumina y junto con la gama globulina (39, 40).

Varios autores han determinado el peso molecular del MGI, encontrando que es muy heterogéneo dependiendo del tipo de tejido o células en estudio, obteniendo pesos que van desde 5000 daltones (41) hasta 300 000 daltones (42). Asimismo, se ha encontrado que casi todos los tejidos del organismo en humanos y ratones son capaces de producir MGI, cuya actividad llega a ser en ocasiones idéntica a pesar de la diferencia en los pesos moleculares. Este comportamiento puede deberse a una rápida respuesta del organismo ante una invasión patógena, aunque surge la cuestión del por que la heterogeneidad en los pesos moleculares del MGI, siendo que todos tienen la misma función. Esto último se ha tratado de explicar suponiendo que que los MGI de menor peso molecular son subunidades de moléculas de mayor peso (42, 43, 44, 45). Es obvio que se deben realizar más estudios para confirmar o rechazar esta hipótesis.

Hay que considerar que el fenómeno de proliferación y diferenciación no es un proceso aislado, sino que está incluido dentro de un mecanismo de regulación en el que intervienen sustancias inhibitoras de la proliferación, como son la lactoferrina (46, 47), prostaglandinas, chalconas y otras moléculas encontradas en medios condicionados por células maduras (47). Ante esto, es evidente que tal mecanismo de regulación tiene como cometido, el provocar un aumento de células sanguíneas en caso de necesidad (por ejemplo infecciones bacterianas), o bien, inhibir esta proliferación cuando sea necesario.

1.2. Inmunoglobulinas.

Además de las sustancias inductoras a la proliferación celular, producidas por ciertos tipos celulares, en el organismo se producen moléculas de importancia en la defensa del cuerpo contra agentes extraños. Tales moléculas son producidas por células especializadas con este fin, llamadas linfocitos B. Las inmunoglobulinas producidas por estas células son moléculas protéicas que portan actividad de anticuerpos, es decir, la propiedad de combinarse específicamen

te con la sustancia que provocó su formación (antígeno). Con la posible excepción de los anticuerpos naturales, los anticuerpos se originan como respuesta a las sustancias extrañas introducidas en el cuerpo. Los anticuerpos son moléculas bifuncionales y se ligan de manera específica con el antígeno e inician también toda una gama de fenómenos secundarios como la fijación del complemento y la liberación de histamina por las células cebadas, que son independientes de su especificidad por el antígeno (48).

Como la diversidad estructural y funcional de los anticuerpos normales hace difícil su análisis fisicoquímico, mucho de nuestro conocimiento concerniente a la estructura de las inmunoglobulinas es derivado de estudios de las proteínas del mieloma y de macroglobulinas monoclonales (49). A pesar de su gran heterogeneidad, todos los anticuerpos presentan ciertas similitudes estructurales, todos consisten de una subunidad básica compuesta por 4 cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. Dos tienen un peso molecular de 53 000 a 75 000 daltones dependiendo de la clase de inmunoglobulina, y son conocidas como cadenas pesadas (H del inglés heavy); las otras dos tienen un peso molecular de 22 500 d y son denominadas cadenas ligeras (L). Teniendo como base sus propiedades generales, así como sus características fisicoquímicas e inmunoquímicas de sus cadenas H constituyentes, las inmunoglobulinas pueden ser subdivididas en 5 clases principales: IgG, IgM, IgD, IgE e IgA. Dentro de una clase dada de cadenas pesadas, se han distinguido subclases de acuerdo a sus características antigénicas. Por ejemplo, hay 4 subclases de IgG: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En tanto, solo dos tipos de cadenas L han sido identificadas, κ y λ . Estas cadenas son portadas por todas las clases de inmunoglobulinas, aunque la relativa cantidad de cada una varía de clase a clase.

Cuando una molécula de gama globulina es tratada con papaína en presencia de cisteína, se producen 3 fragmentos (50), dos de estos idénticos y consisten de una cadena ligera y la porción amino terminal de la cadena pesada; estos son referidos como Fab (del inglés, Fraction antigen binding), es mediante esta porción que la inmunoglobulina se une al antígeno. La tercera pieza, conocida como fragmento Fc (del inglés fraction cristalizabile), contiene la porción carboxi

lo terminal de las cadenas H, así como muchos de los carbohidratos de la molécula (fig 1). La porción Fc media la fijación de la molécula o las células (células de mast, linfocitos, macrófagos), la transferencia placentaria y fijación del complemento (51).

Las cadenas L están compuestas de aproximadamente 214 aminoácidos (52). Las cadenas L pueden ser vistas como 2 regiones enlazadas de igual longitud; la primera de estas regiones es referida como la región variable (V_L), mientras el restante se denomina región constante (C_L) (52). La región variable se denomina así debido a que varía considerablemente de una inmunoglobulina a otra, mientras la región constante muestra mucho menos variabilidad; regiones similares son encontradas en las cadenas pesadas. Las cadenas pertenecientes a la clase IgG1 han sido estudiadas más extensamente (53), además, la IgG constituye casi 3/4 partes de las γ globulinas totales. Esta es la única inmunoglobulina selectivamente transferida a través de la placenta, por tanto provee de cierta protección al feto; también está involucrada en la activación del sistema del complemento.

1.3. Sistema del Complemento.

El sistema del complemento (c), es el mediador humoral primario de las reacciones antígeno-anticuerpo. Consiste de cuando menos 15 proteínas séricas química e inmunológicamente distintas que son capaces de actuar de manera recíproca una con otra, con el anticuerpo y con las membranas celulares. Su actividad consiste en la lisis de diferentes clases de células, bacterias y virus, hasta la mediación directa de los procesos inflamatorios. También induce la liberación de histamina de la célula cebada, la emigración dirigida de los leucocitos, la fagocitosis y la liberación de los constituyentes lisosómicos de los fagocitos (48).

Las proteínas individuales de este sistema se encuentran normalmente en la circulación como moléculas inactivas, estas moléculas se designan con símbolos numéricos: C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, o en el caso de ciertos componentes, por símbolos o nombres triviales: properdina, factor B, factor D, factor A, β H. Cada componente debe ser activado sucesivamente en condiciones apropiadas para que progrese una reacción del complemento. Por lo tanto, la activación no constituye un evento único, sino más bien un proceso dinámico que permite a las proteínas volverse miembros de un sistema funcional integrado, en el cual actúan recíprocamente (48).

Hay dos mecanismos o vías paralelas, totalmente independientes que conducen a la activación de la porción terminal, de la serie de reacciones del complemento.

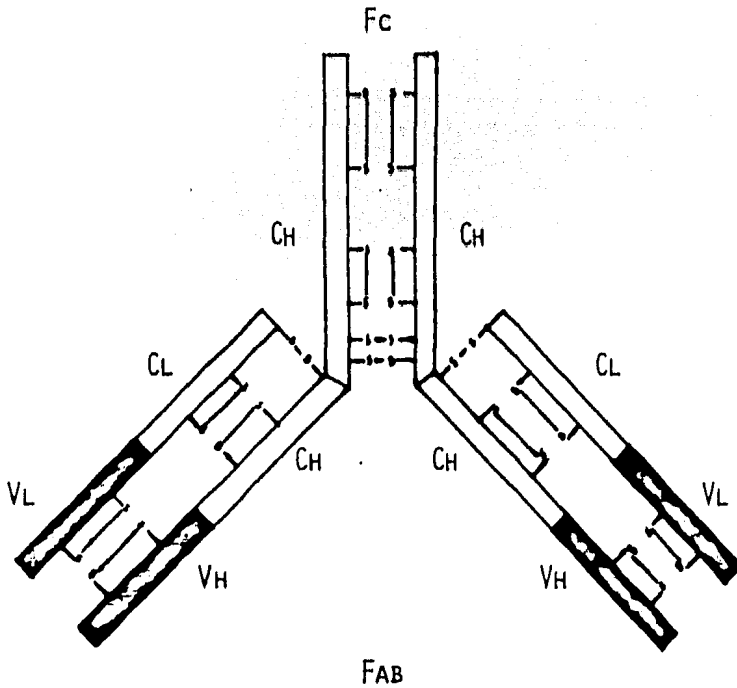


Fig. 1. Modelo general de la estructura de la gamaglobulina. Se muestran las porciones Fc y Fab, así como las porciones pesadas (H) y ligeras (L) de las regiones constantes y variables de la molécula (tomado de: Wintrobe M. Clinical Hematology 1974).

Uno de ellos, la vía clásica puede ser activada por complejos antígeno-anticuerpo o inmunoglobulinas agregadas. Las inmunoglobulinas humanas pertenecientes a las subclases IgG1, IgG2 e IgG3 y la clase IgM son capaces de iniciar la vía clásica, mientras que la subclase IgG4 y las clases IgA, IgD e IgE son inactivas al respecto (48). Entre las subclases de IgG, la IgG3 es la más activa, seguida por IgG1 e IgG2. La vía clásica puede tener también activación no inmunológica, dada por un número de sustancias químicamente diversas, incluyendo el ADN, ciertas membranas celulares y enzimas semejantes a la tripsina. La vía clásica comprende los pasos de reacción de los componentes primero (C1), segundo (C2), tercero (C3) y cuarto (C4) del complemento. La vía puede subdividirse en 2 unidades funcionales: la primera es la activación del primer componente C1 y la segunda, la generación de 2 enzimas relacionadas con el complejo del complemento: C $\bar{4}$ 2 y C $\bar{4}$ 23.

La otra vía llamada alternativa o de la properdina, puede ser activada inmunológicamente por la IgA humana y también por algunas moléculas de IgG e IgE del humano. La vía también puede ser iniciada por estímulos no inmunológicos como ciertos polisacáridos complejos, lipopolisacáridos y enzimas semejantes a la tripsina. Como resultado de esta activación, C3b, el producto mayor del rompimiento del C3; factores B y D así como la properdina, interactúan para ensamblar en la vía alternativa a las convertasas de C3 y C5 (54). La modulación de la activación del complemento puede ser lograda por al menos 3 proteínas plasmáticas: el inhibidor de C1 (55), inactivador de C3b (C3bINA) (56), y la globulina β 1H. En años recientes se ha hecho obvio que al menos 3 tipos de células sintetizan proteínas del complemento, el hepatocito, las células epiteliales de los tractos gastro-intestinales y genito-urinario y células de la serie monocito-macrófago (56). Se ha mostrado que los monocitos y macrófagos humanos sintetizan C1 y sus subcomponentes, C4, C2 y C3 (57).

Tanto la vía alterna como la clásica tienen en C5 y posteriores componentes del sistema su siguiente sitio de actividad, procediendo la reacción como se ilustra en la figura 2. Las consecuencias de la adherencia de las proteínas del complemento a las membranas son

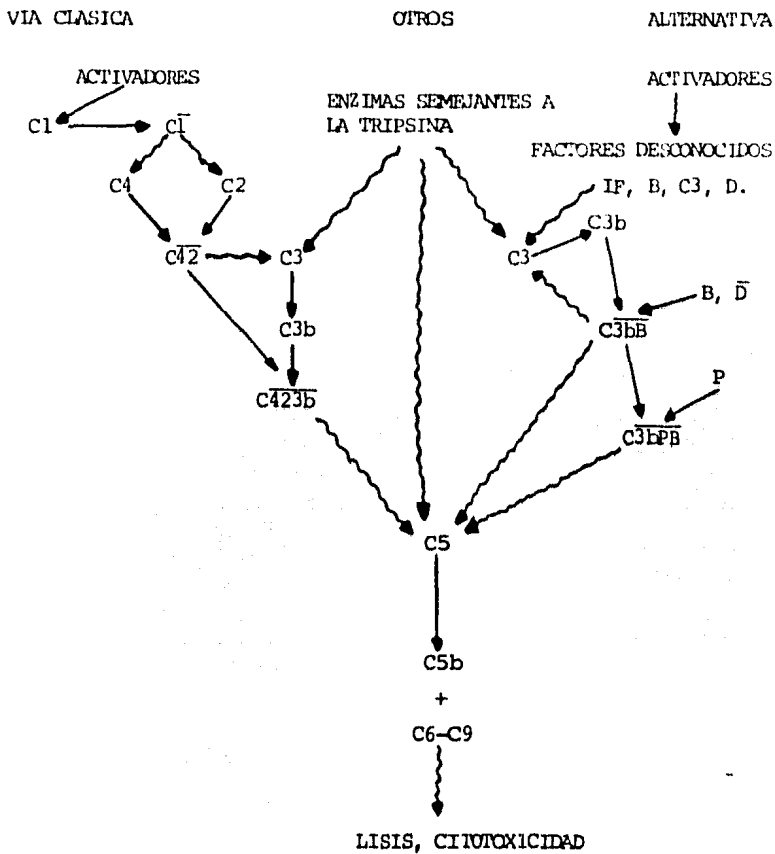


Fig 2.- DIAGRAMA ESQUEMATICO DE LOS MECANISMOS DE ACCION EN CADENA DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO (C) EN LA SUPERFICIE DE ALGUN ACTIVADOR DEL COMPLEMENTO.

las siguientes:

- .Acumulación del conjunto de proteínas del complemento.
- .Cambios en el medio y la carga de la membrana.
- .Modificación de las propiedades y funciones de la membrana.
- .Lesiones e hinchamiento de la membrana.
- .Daño o desintegración de la membrana.

1.4. Receptores Fc.

Dada la importancia que representan en la defensa del organismo moléculas como las inmunoglobulinas, y las que forman parte del sistema del complemento, se ha investigado la manera mediante la cual se lleva a cabo su acción, encontrándose que existen receptores a través de los cuales se unen a distintos tipos celulares. Los receptores que reconocen y unen la porción Fc de la IgG han sido detectados en una amplia variedad de células, incluyendo macrófagos, linfocitos y leucocitos polimorfonucleares. Estos receptores funcionan en la fagocitosis (58) y citólisis (59) de células recubiertas de IgG. Los receptores Fc que son encontrados en diferentes tipos de células, expresan distintas afinidades para las subclases de IgG. Muchos estudios con células autólogas e inmunoglobulinas sostienen que los receptores Fc de los fagocitos mononucleares unen solo ciertas clases de IgG específicamente. Los macrófagos humanos evidencian gran afinidad por las subclases IgG1 e IgG3 (60), mientras que los macrófagos de ratón unen específicamente IgG2a e IgG2b, pero en cambio no unen IgG3. Así mismo, se han descrito receptores Fc que unen distintas clases de inmunoglobulinas (IgM e IgE) (58). Los macrófagos portan en su superficie receptores para la porción Fc de la IgG, además de receptores para el complemento y receptores no específicos para sustancias extrañas, todos estos de gran importancia biológica. Existen datos sobre la existencia de receptores para la insulina, fibrina, lacto-ferrina, linfoquinas, carbohidratos y lípidos (59). En cuanto a los receptores de tipo inmune, se sabe que el recubrimiento de bacterias con inmunoglobulinas, facilita la adherencia y fagocitosis y así aumenta la acción bactericida de los macrófagos (60). El papel del anticuerpo en la mediación de

la fagocitosis selectiva depende de la unión de una región del anticuerpo a un sitio de reconocimiento o receptor sobre la superficie del macrófago. De esta forma la porción de la inmunoglobulina que se une al macrófago es la Fc, en tanto la porción Fab une inmunoespecíficamente al microorganismo patógeno (61). Además de su función en la eliminación de cuerpos extraños, los receptores Fc de los macrófagos funcionan en la eliminación fisiológica de eritrocitos viejos o inviables (62). Se piensa que el envejecimiento puede exponer grupos carbohidrato que estuvieron previamente ocultos sobre los eritrocitos, los cuales son luego opsonizados por IgG autólogo in situ, promoviendo su fagocitosis por fagocitos hepáticos y esplénicos (63).

La presencia de receptores Fc es evaluada hoy en día principalmente por el ensayo de rosetas, en donde eritrocitos xenogénicos son cubiertos con anticuerpos (EA) y luego son expuestos a los macrófagos. La actividad del receptor Fc es indicada por la adhesión de eritrocitos sobre la superficie del macrófago en una configuración denominada roseta. Se cuenta con técnicas en las que si los eritrocitos son premarcados con ^{51}Cr , pueden ser contados automáticamente. También se emplean conjugados de anticuerpos con fluoresceína que se unen a los macrófagos y de esta manera son contados con aparatos que separan a las células de acuerdo a su diferencia en fluorescencia (64).

El empleo de rosetas Ea se ha realizado no solo en investigación básica sobre la naturaleza y función biológica de los receptores Fc, sino también a nivel clínico en el que este ensayo se utiliza como diagnóstico en la detección del cáncer cervical (65).

Actualmente se han desarrollado técnicas encaminadas a la evaluación más eficiente de estos receptores. Así, tenemos por ejemplo el método avidina-biotina-peroxidasa (66), para la determinación de receptores Fc en macrófagos aislados o en tejido. Otro método consiste en el empleo de partículas fluorescentes de 2-hidroxiethyl metacrilato con dinitrofenol y anticuerpos monoclonales antidinitrofenil, de tal forma que se detectan receptores Fc y la fagocitosis mediada por estos receptores (67).

Se ha encontrado que la formación de receptores Fc está mediada

por una molécula termolábil y sensible a la tripsina evidenciándose como una proteína. El estudio bioquímico de esta molécula llamada FcRI (del inglés, Fc Receptor Inducer), indica que tiene un peso molecular de 10 500 daltones y un pH isoeléctrico de 7.6. Se ha obtenido en un principio de una línea leucémica de tipo macrófágico denominada WR 19 M.1 (68) y posteriormente en suero endotóxico murino así como medio condicionado por pulmones y medio condicionado por macrófagos peritoneales sometidos a la acción de lipopolisacáridos (69).

1.5. Receptores C3.

La unión de la porción Fc de la IgG, a las células portadoras de receptores para este fragmento, no es el único caso de unión mediada por receptores. La adherencia secuencial de los productos del complemento, a partir del tercer componente en adelante sobre un agente infectante, genera un sitio reactivo que tiene afinidad para un receptor sobre los macrófagos y así tornar al microorganismo más susceptible a ser fagocitado (70). El significado biológico de este sistema se hace evidente en individuos con un metabolismo anormal del C3, o bien, cuando presentan una deficiencia hereditaria de este componente. En tales personas se presentan infecciones bacterianas recurrentes, sin embargo, estas pueden ser controladas por los fagocitos ante la presencia de suero normal (71).

Es posible que los receptores del complemento regulen la inhibición de la migración del macrófago inducida por endotóxicas. Esta influencia puede ser efectuada por factores de quienes se sabe son generados por el complemento y el sistema de coagulación sanguínea y puede actuar sobre la membrana plasmática para inducir la activación del macrófago (72). La detección de receptores C3 se realiza en forma sencilla empleando eritrocitos sensibilizados con inmunoglobulinas (EA) y posteriormente suero para favorecer la incorporación de la fracción C3b del complemento al EA formando EAC. En forma análoga se pueden evaluar los receptores para C3b en diferentes células mediante una técnica de rosetas (73), así mismo se puede emplear el método de conteo radiactivo en donde se marcan los EAC con

51 Cr.

Los eritrocitos recubiertos tan solo con IgM, no se unen a los macrófagos en muchos sistemas, pero cuando las células rojas son incubadas con componentes del complemento o con suero fresco, el complemento se fija a los complejos inmunes permitiendo su unión a estas células. Ciertas subclases de IgG, dependiendo de la especie, también unen al complemento. Otra de las técnicas que se emplean en la detección de los receptores para los componentes de este sistema, consiste en el empleo de suero anticomplemento marcado con Fluoresceína (74) y de esta manera evidenciar los sitios de unión de los componentes a las membranas celulares. Estudios realizados sobre células portadoras de receptores C3b, muestran su participación en reacciones fagocíticas y secretoras, pero la caracterización físico-química del receptor muestra que es sensible a la tripsina, lo cual sugiere que es una proteína. Los estudios realizados al respecto, indican que tal receptor es una glicoproteína con peso molecular de 205 000 daltones, la cual fué purificada a homogeneidad usando procesos cromatográficos. Al realizar el bioensayo de esta molécula, produjo aceleración en decaimiento de la properdina y amplificación de la acción de la convertasa de C3 entre otras funciones (75).

Por otra parte, se ha identificado una molécula cuya actividad consiste en inducir a macrófagos y monocitos a la formación de receptores para C3, razón por la que se le denomina C3RI (del inglés, C3 Receptor Inducer), su pH isoelectrico es de 3.9 (76); su peso molecular es de 35 000 daltones y debido a que pierde su actividad después de ser tratada con tripsina o calor, se considera que es una proteína. Esta molécula se demostro en suero y medio condicionado de pulmones de ratón sometidos a una inyección intravenosa de endotoxinas y en medio condicionado de macrófagos residentes en la cavidad peritoneal, estimulados con lipopolisacáridos de Salmonella typhosa.

1.6. Macrófagos.

Como ha sido apuntado con anterioridad, los macrófagos son un grupo celular sumamente importante en las reacciones inmunes, ellos representan un grupo heterogéneo de células tanto funcional como morfológicamente. Actualmente no se sabe si esta heterogeneidad es

el resultado de diferentes niveles de maduración, o si de hecho hay distintas subpoblaciones de macrófagos, las cuales pueden ser identificadas en base a ciertas características de su superficie celular o de acuerdo a su función (77). Durante la maduración de promonocito a monocito y de este a macrófago inmaduro a macrófago maduro (78, 79), hay muchos cambios en sus características funcionales, existe evidencia (80) que indica que la frecuencia de división decrece a medida que la célula madura, mientras que otras características, tales como la actividad fagocítica, adherencia al sustrato de cultivo, actividad microbicida, receptores de superficie para inmunoglobulinas y la habilidad para interactuar con células linfoides en varias reacciones inmunes, generalmente se incrementa.

Los macrófagos y monocitos de diversas fuentes presentan características divergentes. Así, se ha mostrado (81) que macrófagos de diferentes tejidos al ser aislados y cultivados *in vitro*, su tasa de adherencia al vidrio, así como su tasa mitótica en cultivo variaba. Basándose en estas características, Bennet describió tres categorías de macrófagos: macrófagos peritoneales y de sangre periférica que se adhieren rápidamente y tienen una baja tasa mitótica; macrófagos de la médula ósea, del bazo y del hígado que se adhieren lentamente, pero tienen una alta tasa mitótica; y macrófagos alveolares que se adhieren rápidamente y tienen una alta tasa mitótica.

Aunque existen diferencias morfológicas entre los macrófagos de distintos tejidos, se puede encontrar una estructura típica como la que presentan los macrófagos peritoneales, ya que tienen un diámetro de casi 12 μm con escaso citoplasma (82). Al microscopio electrónico se advierte que la superficie celular es rugosa con numerosas prolongaciones; el citoplasma presenta evidencia de actividad secretora ya que tienen retículo endoplásmico rugoso y una zona de Golgi bien desarrollada, esta última frecuentemente relacionada con el centriolo. También se observan numerosas vacuolas que pueden ser de 0.1 μm o más de diámetro y pequeñas vacuolas micropinosómicas de menos de 100 nm en diámetro. Algunas células contienen peroxidasa en cuerpos densos mientras otras la presentan en los canales del retículo endoplásmico, zona de Golgi y el espacio perinuclear. Estas últimas probablemente representen células residentes

en la cavidad peritoneal u otras regiones (83). En el citoplasma se ha determinado la presencia de actina, que viene siendo la mayor proteína contráctil del macrófago (84).

Dentro de las características fisiológicas de estos fagocitos, se observa que derivan su energía de la glicólisis o del metabolismo aerobio, esto último especialmente en el caso de los macrófagos alveolares. Estas células sintetizan ARN y una amplia variedad de proteínas, sintetizan y esterifican ácidos grasos y sintetizan fosfolípidos, pero probablemente no colesterol (85). Se ha observado que nuevos componentes de membrana son rápidamente resintetizados, por ejemplo, ciertos receptores de superficie son resintetizados 6 horas después de su remoción (86). Los macrófagos liberan una diversa serie de productos en su ambiente pericelular; estas sustancias varían desde compuestos de bajo peso molecular, como las prostaglandinas y nucleótidos cíclicos y sustancias de mucho mayor peso molecular, tales como componentes del sistema del complemento y una variedad de enzimas hidrolíticas como: hidrolasas ácidas, lisosima; proteínas neutras, colágenasa, elastasa, proteoglicanasa; componentes del complemento, moduladores de funciones celulares como el factor activador de linfocitos T, factor activador de linfocitos B, factor de maduración tímico, inhibidor de proliferación celular en fibroblastos y linfocitos (87), así como un factor inductor a la proliferación de fibroblastos, células endoteliales y del músculo liso (88, 89). También se piensa que el macrófago produce un factor que interviene en la proliferación de células mesenquimales después de un daño a los tejidos, como ocurriría durante una inflamación y posiblemente en la arterioesclerosis. También se ha reportado la producción por parte de los macrófagos, de un factor proliferador de fibroblastos de pulmón (90).

En diversos tejidos del organismo, existen macrófagos como residentes habituales, no obstante, se ha experimentado con mayor frecuencia con los provenientes de la cavidad peritoneal, debido a que la población es fácilmente caracterizada (91). Su colecta es sencilla comparando con los macrófagos de otros tejidos, que solo se pueden obtener por disgregación enzimática, con lo que se afecta a las células. Los macrófagos de la cavidad peritoneal son utilizados en

estudios acerca de la morfología, diferenciación, fagocitosis, citotoxicidad y respuesta inmune (92).

Además de los macrófagos que se encuentran en la cavidad peritoneal, se pueden obtener granulocitos eosinófilos y células linfocíticas. No es común observar monocitos en dicha cavidad, aunque su presencia y cantidad se asocia con neutrófilos y esto con un estado patológico del animal (93).

Se piensa que la población de macrófagos residentes se mantiene mediante un mecanismo de autorreplicación y que las células con características de monocitos allí encontradas, pueden ser monocitos transitorios en la cavidad y no estar relacionados con los macrófagos residentes (91).

Se ha empleado una amplia variedad de agentes irritantes para provocar la llegada a la cavidad peritoneal de un gran número de células (como los monocitos y los neutrófilos). El patrón que sigue la respuesta a la estimulación por diversos agentes, es generalmente la misma (94): cuando el irritante que se emplea en la cavidad peritoneal es el caseinato de sodio, se observa que el tipo celular que arriva en primer término es el granulocito, dándose este fenómeno entre una y dos horas después de la inoculación, posteriormente llega a su número máximo a las 16 horas y comienza a declinar hasta desaparecer casi completamente a las 24 horas. En el caso de los monocitos, estos tienen su máximo (95) a los 4 días de haber sido inoculado el ratón. El tiempo que lleva el restablecimiento de la normalidad en la cavidad varía dependiendo de la concentración y de la naturaleza del estímulo (96).

Otro tipo de macrófago cuya obtención es relativamente sencilla es el macrófago alveolar, estas células son componentes esenciales en la defensa de las vías respiratorias. Estos fagocitos ocupan una posición especial dado que el pulmón, con casi 90 m² expuestos al ambiente, es vulnerable a ser dañado por las diversas sustancias encontradas en el aire. Esta amplia superficie pulmonar es protegida por un sistema primario de filtración en la nariz y vías aéreas, el cual evita el paso de partículas mayores de 3µm, sin embargo, los gases dañinos pueden ser absorbidos en un alto grado. Dentro de los alveolos, el macrófago es el responsable de la protección del delga

do epitelio que recubre los capilares pulmonares (97).

Existe una correlación positiva entre la cantidad de polvo que penetra al tracto respiratorio y el número de células fagocíticas (98). La exposición al polvo incrementa el reclutamiento de los macrófagos hacia los alveolos mediante dos mecanismos diferentes (99), ya sea por la migración de los monocitos circulantes, o bien, por proliferación y migración de macrófagos intersticiales (100). La respuesta de los macrófagos después de la exposición a un gas ha sido menos estudiada, sin embargo, por lo general el número de macrófagos presente en el tracto respiratorio profundo varía con las propiedades químicas y cantidad de polvo y gas en exposición (101). Por otro lado, se ha encontrado que individuos fumadores tienen un mayor número de macrófagos alveolares comparado con los no fumadores (102), relacionándose esto con la cantidad de humo inhalado.

Se acepta generalmente que el origen de las células del sistema mononuclear fagocítico es la médula ósea, y en términos generales esta relación también concierne a los macrófagos pulmonares. Las diferencias entre la mayoría de macrófagos de tejido y los fagocitos alveolares parece estar relacionada al distinto medio funcional del pulmón. En contraste a los fagocitos de los sinusoides del hígado y el peritoneo, los macrófagos alveolares se encuentran en una atmósfera aerobia. Además, ante la constante invasión de partículas extrañas, el sistema debe responder rápidamente con un enorme incremento en la producción celular. Parece que estas funciones son sostenidas por una población lábil de macrófagos intersticiales, es decir, un compartimiento entre los monocitos sanguíneos y las células alveolares libres. En este compartimiento, las células pueden presentar adaptaciones bioquímicas previas a la migración hacia los sacos aéreos, así, se pueden considerar dos componentes del sistema pulmonar macrofágico: células intersticiales y fagocitos alveolares libres (97).

El estudio de la morfología, metabolismo y función de los macrófagos alveolares, se realiza en forma más adecuada en células obtenidas por lavado pulmonar (103). La característica morfológica predominante de las células obtenidas mediante lavado es su heterogeneidad. Esta variedad estructural es dependiente de la edad de la

célula, la fase de su actividad celular y la naturaleza y cantidad de material que ha sido fagocitado. Las células inmaduras inactivas muestran abundante retículo endoplásmico liso; mientras que células que han fagocitado material presente en los alveolos, muestran un marcado incremento en el retículo endoplásmico rugoso y en el número de lisosomas. La heterogeneidad estructural de los macrófagos alveolares es un reflejo de las actividades metabólicas y sintéticas de la célula. Después de la ingestión de partículas tales como carbon u óxido de hierro, hay en un lapso de 8 horas, un marcado cambio en la producción lisosomal. Se ha resaltado la prominencia de aparato de Golgi, el retículo endoplásmico, y los lisosomas en estas células (104), por lo que se ha considerado que podría ser un reflejo de la demanda de una rápida síntesis y almacenamiento de hidrolasas ácidas bajo condiciones en que se requiera la defensa del organismo contra algún daño. Las diferencias en la actividad enzimática entre los macrófagos alveolares y los fagocitos de otras partes del cuerpo, parece estar relacionada con la demanda continua e inmediata de los macrófagos alveolares debido a su situación anatómica. Los macrófagos alveolares contienen considerablemente más fosfatasa ácida, lisosima y lipasa que los macrófagos peritoneales (105).

Tal y como se mencionó, en trabajos de diversos autores se ha reportado una amplia variación en los porcentajes de receptores - para Fc y C3 en células mieloides murinas, tanto en células recién colectadas de la médula ósea, como aquellas inducidas in vitro.

Estas variaciones pueden ser atribuidas tanto a características propias de la cepa de ratón, del estado de diferenciación en que se encuentren las células, como a variaciones propias de las técnicas empleadas por cada observador.

Con la finalidad de contribuir a elucidar esta heterogeneidad, en este trabajo se emplearon ratones de distintas cepas, para evaluar el fenómeno de inducción a la formación de receptores inmunológicos en cada una. Asimismo, se realizarán ensayos en los que se removerán células mieloides totalmente diferenciadas para proceder a la inducción de la formación de receptores a partir de precursores, y así determinar si el estado de diferenciación también interviene en la formación de estos receptores.

se plantea utilizar dos métodos para eliminar o remover a las - células más diferenciadas, como podría ser mediante la inoculación intraperitoneal de un irritante que provoque la migración de la reserva medular madura hacia la cavidad. Otro método se realizará - aprovechando la cualidad de las células maduras de la médula de adherirse y por tanto ser eliminadas.

Por otra parte, se ha encontrado que macrófagos de distintos tejidos producen y liberan los factores inductores a la formación de receptores para Fc y C3, siendo además células susceptibles a ser inducidas a la formación de tales receptores. En consecuencia se evaluará si la producción de FcRI y C3RI y formación de receptores, obedece a un fenómeno de autoinducción. Para lo cual se cultivarán macrófagos peritoneales residentes a diferentes días, evaluando el porcentaje de receptores Fc y C3 en función del tiempo.

Por último, dado que se ha reportado que macrófagos inducidos a la cavidad peritoneal producen MGI pero no FcRI y C3RI, y que el macrófago residente de la misma cavidad produce FcRI y C3RI y no MGI, se tratará de determinar si el macrófago alveolar produce alguno de estos factores y así poder establecer con que grupo de fagocitos se asemeja, contribuyendo de esta forma al esclarecimiento sobre el origen de los fagocitos pulmonares.

2.- MATERIALES Y METODOS.

2.1.- ANIMALES.

Para las pruebas de rosetas en médula ósea, se usaron ratones - machos y hembras de la cepa CD-1 mantenidos en el bioterio de la E. N. E. P. - Zaragoza (C-1); la edad de estos fluctuó entre 2 y 4 meses. Además se usaron ratones machos de las siguientes cepas: CD-1 del bioterio del Centro de Estudios Avanzados del I. P. N. (C-II), cepa NMR-1 del mismo bioterio (C-III) y la cepa NIH del bioterio del Hospital General de la S. S. A. (C-IV), todos ellos de 3 - meses de edad.

Para la determinación de receptores Fc en macrófagos de cavidad peritoneal y para los ensayos con macrófagos alveolares se emplearon ratones de la C-I.

2.2.- CULTIVO CELULAR.

El medio que se utilizó es el Medio Mínimo Esencial de Eagle o Medio de Eagle (ME) (Gibco Laboratories, U. S. A.) (apéndice 1).

A este medio se le adicionaron 100 u/ml de penicilina (Laboratorios Lakeside, México), 100 ug/ml de estreptomycin (Laboratorios Lakeside, México) y 3.7 g/l de bicarbonato de sodio, antes de ser esterilizado se ajusta a un pH de 7.2.

El medio así preparado se filtra para fines de esterilidad con - filtros de membrana (millipore U. S. A.) con un poro de 0.22 u de diámetro. Asimismo, para obtener el medio de cultivo, el ME fué su plementado con 10% de suero de caballo (SC) (Microlab, México), - previamente desactivado a 56°C en baño de agua durante 30 minutos. este suero se almacena a -20°C y antes de ser mezclado con ME se - calienta a 37°C. Para el cultivo in vitro de las células fué utili zada una incubadora con temperatura constante de 37°C, humedad a - saturación y una atmósfera de 10% de dióxido de carbono en aire.- Las células se incubaron en cajas de cultivo de 60 X 15 mm (Kimax Vineland, N. J., U. S. A.) con 5 ml de medio de cultivo.

DIAGRAMA 1.-
Obtención de células
de la Médula Ósea

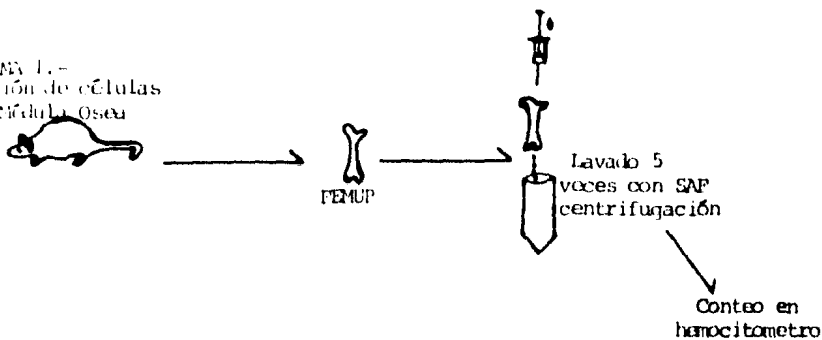


DIAGRAMA 2.-
Técnica de Preincubación

Células de Médula Ósea

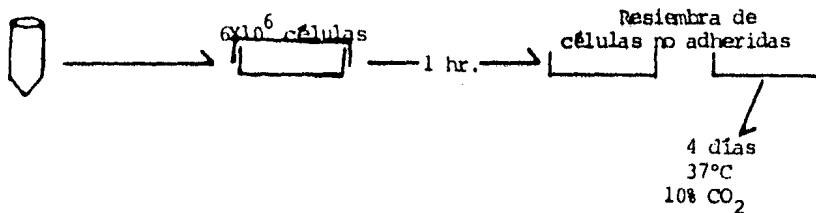
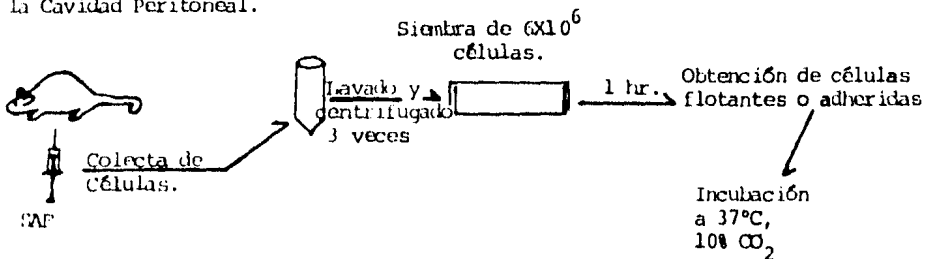


DIAGRAMA 3.-
Obtención de Células de
La Cavidad Peritoneal.



2.3.- PRUEBA DE ESTERILIDAD.

Para probar la esterilidad de las soluciones utilizadas, se colocan 3 gotas de estas, en tubos de ensaye que contengan 2 ml de caldo de soya tripticasa al 3%, o caldo de Sabouraud (Bioxón, México) previamente esterilizados en autoclave. Se incuban las muestras durante 48 horas a 37°C, al término de las cuales se observa si hubo proliferación de microorganismos contaminantes.

2.4.- TRATAMIENTO CON CASEINATO DE SODIO.

Para la obtención de células tanto de médula ósea desprovista de la reserva medular, como de células no adherentes inducidas a la cavidad peritoneal, se inyectaron 3 ml de caseinato de sodio al 10% en SAF en la cavidad peritoneal de los ratones por periodos de 16 a 48 horas.

2.5.- OBTENCIÓN DE CELULAS.

Células de Médula Ósea.- Se sacrificaron a los ratones mediante descervicación procediendo a continuación a extraer los fémures a los que se les colocó en cajas de petri que contenían solución amortiguadora de fosfatos SAF, apéndice 2).

Se limpian los huesos de todo resto de músculo y se perforan ambas epífisis con una jeringa de 1 ml haciendo fluir SAF o ME de un extremo a otro del hueso, repitiendo la operación 5 veces. Las células obtenidas se colectan en un tubo y son lavadas 3 veces con SAF centrifugándose cada vez 3 minutos a 500 g. La cantidad de células obtenidas se determinó por conteo en un hemocitometro (diagrama 1).

Para los ensayos realizados con células de médula ósea, desprovista de células maduras mediante la técnica de preincubación (diagrama 2), se colecta la médula y se siembran 6×10^6 células en cajas de petri sin SC. posteriormente se incuban durante 1 hora y al término de esta se colectan las células no adheridas al sustrato de cultivo y se resiembran en otras cajas con medio de cultivo.

Células de la Cavidad Peritoneal.- Se sacrifica al animal y se

extraen las células de esta cavidad lavando 3 veces con 10 ml de SAF en cada ocasión colectando las células en un tubo cónico. Se lavan 3 veces con SAF centrifugando 3 minutos a 500 g y sembrando 6×10^6 células en cajas de petri con ME, incubándose durante 1 hr. Después de ello, si se desea experimentar con macrófagos de esta cavidad, se desechan las células no adherentes y se adiciona medio de cultivo (MC). En caso de trabajar con los granulocitos elicitados a la cavidad peritoneal, se resiembran en otras cajas con MC (diagrama 3).

Macrófagos Alveolares.- Se expone la tráquea y los pulmones, retirando el esternón y la parte anterior de la caja torácica. Se hace una pequeña incisión en la parte media de la tráquea en donde se introduce una aguja despuntada de jeringa del número 21, sujetándose firmemente con un hilo. Se perfunden unas gotas de ME al interior de los pulmones empleando una jeringa de 3 ml.

Se continua el corte hasta la región ventral retirando a un lado los intestinos para seccionar la vena porta-hepática y así desangrar al ratón, con lo que se evita la contaminación de eritrocitos en los pulmones. Se procede a realizar el lavado alveolar perfundiendo un ml de ME que se extrae con la jeringa repitiéndose la operación 10 veces.

Las células así obtenidas se colectan en un tubo de centrifuga mantenido a 4°C en baño con hielo y posteriormente se lavan 3 veces con ME centrifugándose a 500 g durante 3 minutos. Se siembran 4×10^6 células por caja (diagrama 4). Hay que tener cuidado en mantener humedecidos los pulmones, por lo que hay que vertir sobre ellos unas gotas de SAF o ME con el fin de evitar que se dañe el tejido.

Eritrocitos de Carnero.- Para las pruebas de EA y FAC se usaron eritrocitos de carnero, los cuales se extraen por sangrado de la yugular de este animal y se colocaron en solución de Alsever (apéndice 3) en relación 1:1. Los eritrocitos se almacenaron una semana antes de su uso y nunca después de 5 semanas a 4°C.

DIAGRAMA 4.-
Obtención de Macrófagos
Alveolares.

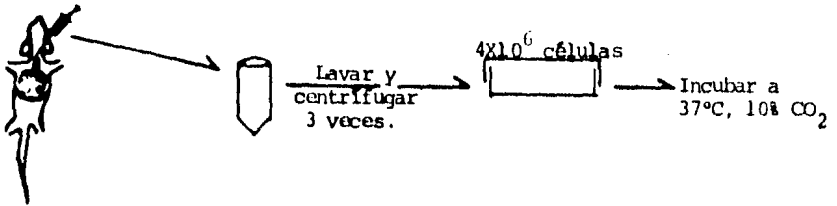


DIAGRAMA 5.-
Elaboración de Medio
Condicionado de Pulmón.

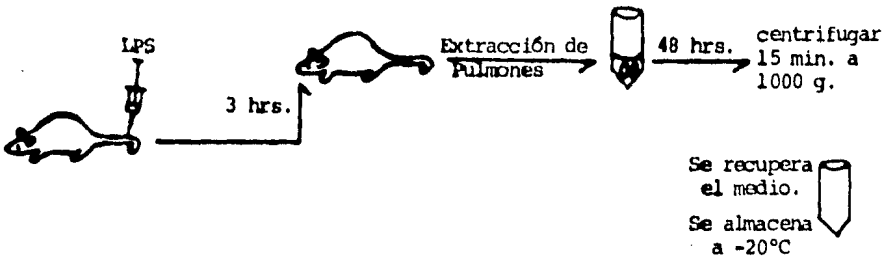
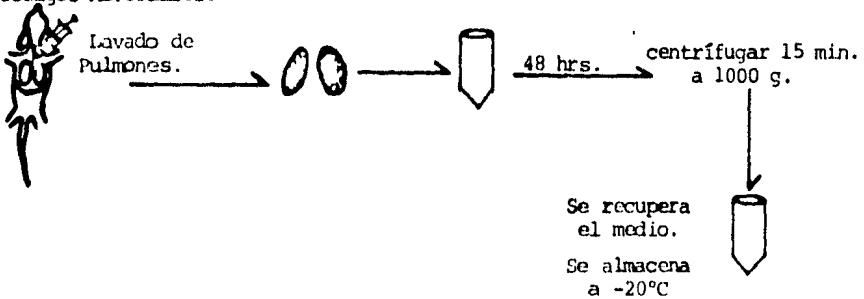


DIAGRAMA 6.-
Elaboración de MCP
Desprovisto de
Macrófagos Alveolares.



2.6.- ELABORACION DE MEDIOS INDUCTORES.

I.- Medio Condicionado de Pulmón (MCP). Este medio se ha probado que es una sustancia rica en FeRI además de contener MGI. Para su obtención se inyectó a los ratones en la vena caudal 0.1 ml de SAF conteniendo 5 ug de lipopolisacáridos (LPS) de Salmonella typhimurium (Sigma, Chemical U. S. A.). Después de 3 horas se sacrifican a los ratones para extraer completos a los pulmones colocándose en tubos de ensaye de 50 ml con 5 ml de ME y proceder a mantenerlos durante 48 horas en la incubadora. Posteriormente se centrifugan los tubos a 1000 g durante 15 minutos separándose el medio condicionado de los pulmones. Se recupera el medio condicionado, - se le aplica prueba de esterilidad y se conserva a -20°C (diagrama 5).

II.- Medio Condicionado de Pulmón Desprovisto de Macrófagos Alveolares (MCMA). A ratones inyectados con LPS por vía intravenosa, se les aplica la técnica de lavado alveolar para eliminar a los macrófagos; al terminar el lavado alveolar se extirpan los pulmones prosiguiéndose con la técnica de obtención de MCP (diagrama 6).

III.- Suero Endotóxico. Se sigue la técnica para MCP solo que en este caso se utiliza la sangre de ratón en vez de los pulmones. La sangre se obtiene seccionando al corazón con tijeras. Se colecta - inmediatamente la sangre con una jeringa de 1 ml y se vierte a un tubo de ensaye en donde se deja reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se desprende el coágulo de las paredes del tubo mediante agitación vigorosa y se coloca el tubo con sangre a 4°C durante 1 hora. Por último se centrifuga a 1000 g durante 15 - minutos colectándose el suero, el cual se conserva a -20°C hasta - el momento de su uso (diagrama 7).

IV.- Preparación de Medio Condicionado de Macrófagos Residentes en la Cavidad Peritoneal (MCM). Se obtienen los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal y se les agregan 5 ml de MC con 0.02 mg de LPS incubándose por 4 días. Los medios condicionados así preparados fueron centrifugados a 500 g por 5 minutos para eliminar a

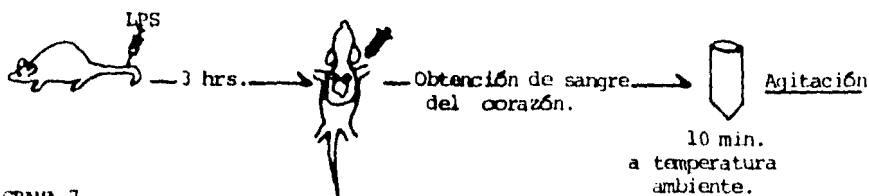


DIAGRAMA 7.-
Elaboración de suero
endotóxico.

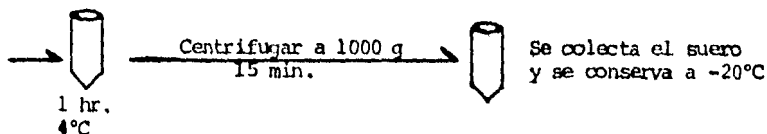
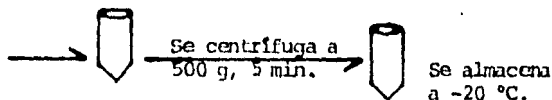
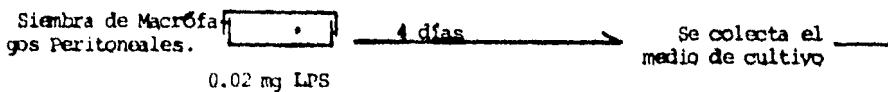


DIAGRAMA 8.-
Elaboración de Medio Condicionado
de Macrófagos Peritoneales Residentes.



las células en suspensión y almacenados a -20°C hasta su uso (diagrama 8).

V.- Preparación de Medio Condicionado de Macrófagos Alveolares (MCMA). Se sigue la técnica de obtención de macrófagos alveolares antes descrita. Una vez ya adheridas las células al plato de cultivo, también se les agrega 0.02 mg de LPS. Las células se incuban de 8 a 12 días, que una vez transcurridos, se centrifugan a 500 g durante 5 minutos y se almacenan a -20°C hasta el momento de su uso (diagrama 4).

Preparación de Eritrocitos Activados con Anticuerpo (EA) y Eritrocitos Activados con Anticuerpo más Complemento. (EAC).

VI.- Se toma 1 ml de eritrocitos de carnero lavándose 3 veces con SAF centrifugando a 500 g por 3 minutos. Al botón de eritrocitos se le quita el SAF y se agregan 4 ml de una dilución de IgG - 1:1600 (7s, Cordis Labs., Miami Fla.) y otros 4 ml de SAF fresco, se mezcla e incuba por 30 minutos a 37°C . Pasado este tiempo se centrifuga, se desecha el sobrenadante y se lavan los eritrocitos con anticuerpo otras 3 veces más con SAF para eliminar el exceso de anticuerpo. Se centrifuga finalmente a 500 g por 3 minutos, se elimina el sobrenadante y se adicionan 8 ml de SAF fresco. El EA así preparado se conserva a 4°C hasta por 5 días (diagrama 9).

VII.- EAC. Se obtiene suero de ratón diluyéndose al 10% en SAF y se mezcla con EA en relación 1:1. Esta mezcla se incuba 30 minutos a 37°C . Se lava 3 veces con SAF y se resuspende en el volumen inicial de suero y SAF. El EAC se conserva a 4°C hasta por 3 días (diagrama 10).

Determinación de Rosetas EA y EAC en Células de Médula Osea.

Se utilizan células de médula ósea ya sea después de haber sido lavada con SAF, o bien, a los 4 días de incubación. En ambos casos se mezcla un volumen determinado de EA o EAC con las células mieloides de tal forma que se establezca una proporción de 100:1. Se centrifugan a 500 g por 5 minutos, formándose un botón, el cual -

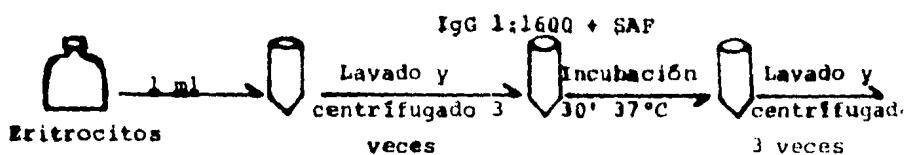


DIAGRAMA 9.-

Eritrocitos Activados
con Anticuerpo (EA).

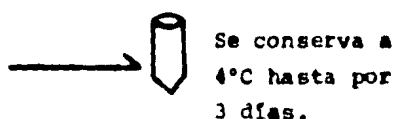
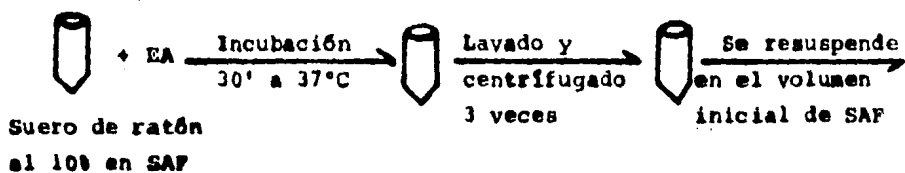


DIAGRAMA 10.-

Eritrocitos activados
con Anticuerpo más Complemento (EAC).

se incubó sin resuspender durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente se resuspende el botón muy suavemente utilizando una pipeta pasteur y se evalúa el porcentaje y número de células con más de 3 eritrocitos adheridos, a lo cual se le llama roseta; la evaluación se realiza mediante el uso de un hemocitometro (diagrama 11).

2.7.- OTROS PROCEDIMIENTOS.

Teñido de células.- Para hacer frotis de las células mieloides se procedió de la siguiente manera; las células se colocaron en portaobjetos mediante una centrifuga cytospin (Shandon Southern U. S. A.) a 1000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se fijaron y tiñeron por medio de la técnica May Green-Wald-Giemsa, con el primer colorante permanecieron 3 minutos, con el giemsa al 10% se tiñeron 10 minutos.

Para la determinación de macrófagos adheridos al sustrato de cultivo, se lavan las cajas con SAF y se agrega el fijador y el colorante de la forma antes descrita.

Confiabilidad de resultados.- Todos los experimentos realizados en este trabajo, se efectuaron un mínimo de 2 veces y por duplicado. Cada experimento se realizó independientemente uno de otro y el número de veces necesarias para obtener un máximo de 10% de error.

Manipulación del Material de Trabajo.- Todos los reactivos y cristalería usados se esterilizaron previamente en autoclave a 15 lb de presión durante 20 minutos, o bien, en el caso de los reactivos, usando filtros de membrana. Para la obtención y manipulación de las células, así como para el uso de las diversas sustancias, se trabajó en una campana de cultivo previamente limpiada con alcohol al 70% y esterilizada por 20 minutos con luz ultravioleta.

Control Positivo y Negativo.- Para el empleo de SE, MCP, MCM y MCMA, se usaron respectivamente 0.2, 0.4 y 0.5 ml de ellos en los platos con células sometidas a inducción. En el testigo no se agregaron estos medios.

DIAGRAMA 11.-

Determinación de Rosetas.

Células de Médula Osea



+ EA o EAC
en relación 1:100

Se centrifuga a
a 500 g, 5'



Se incuba
30' a 37°C

Se resuspende y se cuenta
el # de células

- 1) Determinación de la Formación de Rosetas EA y EAC en Células de Médula Osea Murina.
- 2) Inducción a la Formación de Receptores para Fc en Células de Médula Osea.
- 3) Inducción a la Formación de Rosetas EA en Médula Osea de Distintas Cepas de Ratonés.
- 4) Determinación de Receptores Fc en Células de Médula Osea Desprovista de Células Maduras Mediante Preincubación.
- 5) Inducción a la Formación de Receptores para Fc, en Células de Médula Osea desprovista de Células Maduras.
- 6) Inducción a la Formación de Receptores Fc en Células de la Cavidad Peritoneal de Ratonés Inyectados con Caseinato de Sodio.
- 7) Cinética de Formación de Rosetas Fc e Inmunofagocitosis en Macrófagos Murinos Residentes de la Cavidad Peritoneal.
- 8) Cinética de Formación de Receptores C3 e Inmunofagocitosis en Macrófagos Murinos Residentes de la Cavidad Peritoneal.
- 9) Incapacidad de los Macrófagos alveolares para Producir MGI y para Autoinducirse a la Formación de Receptores para Fc y C3.

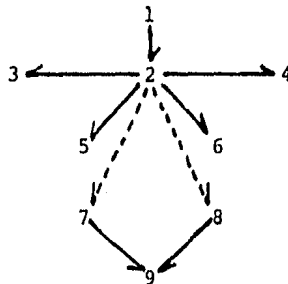


Diagrama de la secuencia de experimentos realizados durante la tesis.

3. RESULTADOS.

DETERMINACION DE LA FORMACION DE ROSETAS EA Y EAC EN CELULAS DE MEDULA OSEA MURINA.

Tomando en consideración que los receptores para la porción Fc de la IgG y para la porción C3b del sistema del complemento del plasma sanguíneo en células mieloides, son adquiridos durante el proceso de diferenciación celular y que en la médula ósea se encuentra - un compartimiento muy importante de células maduras, se esperaría - que existiese un alto porcentaje de células con receptores para Fc y C3. Sin embargo, en trabajos anteriores (106) se encontraron valores muy bajos de células con estos receptores, al grado de reportar algunos valores cercanos a cero (107).

Con la finalidad de determinar el porcentaje de células con receptores para Fc y C3 en nuestras condiciones de cultivo, se procedió a evaluar la formación de rosetas EA y EAC en células de médula ósea procedente de ratones de la cepa CD-1.

Para EA se observó una cierta variabilidad ya que se tuvieron valores desde 1% hasta 13%. El promedio de formación de rosetas EA - fué de 6.1% con una desviación estándar (d.e.) de 3.3, o sea de - casi la mitad del promedio (tabla 1).

Para EAC también se advirtió variabilidad en el porcentaje de - formación de rosetas yendo desde 4% hasta 16% obteniéndose un promedio de 9.1% con una d.e. de 4.4, que en este caso también fué de casi la mitad del promedio.

Los anteriores datos indican que las células de médula ósea portaban bajos porcentajes de receptores tanto para Fc como para C3, - pero con una amplia variabilidad.

% de Rosetas

	Fc	C3
	13	16
	10	14
	9	11
	8	9
	7	8
	6	6
	5	5
	5	4
	5	
	3	
	2	
	1	
Promedio	6.1	9.1
d.e.	3.3	4.4
c.v.(%)	54	48

TABLA 1. DETERMINACION DE LA FORMACION DE ROSETAS EA Y EAC EN CELULAS DE MEDULA OSEA MURINA.

INDUCCION A LA FORMACION DE RECEPTORES PARA Fc EN CELULAS
DE MEDULA OSEA.

Una vez determinado el porcentaje de células con receptores para Fc en médula ósea murina y con la finalidad de estudiar la cinética de inducción de receptores inmunológicos en células mieloides, se procedió a evaluar la inducción a la formación de nuevos receptores Fc en dichas células mediada por el inductor FCRI, para ello se utilizaron dos medios ricos en dicho factor, el suero endotóxico (SE) y el medio condicionado por macrófagos residentes de la cavidad peritoneal (MCM).

La inducción fue evaluada a los 4 días de incubación utilizando ya sea 0.2 ml de SE, o 0.5 ml de MCM. En los resultados obtenidos con SE la variación fue muy amplia, teniendo una ocasión en que --ninguna célula formó rosetas hasta otra en donde el valor fue de -38% (tabla 2). Como era de esperarse la desviación fue muy elevada, casi igual al promedio siendo respectivamente de 12 y 13%.

Con el MCM la variación también fue muy alta ya que la d.e. obtenida asciende a 17 contra un promedio de 22% de células que formaron rosetas EA.

Si se comparan los resultados registrados con el SE y el MCM, se puede ver que en el último los porcentajes son mucho más elevados-- pues se llegó a obtener hasta un 61% de rosetas, aunque también hubo casos muy bajos: 2%.

Al hacer la evaluación del testigo (sin medio inductor), se encontró que este también presenta una gran variación en la formación de rosetas EA con datos extremos de 42% y de 1%. El promedio fue -de 15% con una d.e. que ascendió a 12.

	% de Rosetas EA	x	d.e.	c.v.
SE	38, 38, 21, 18, 15, 13, 8, 7, 7, 7, 6, 5, 3, 0.	13	12	90
MCM	61, 51, 42, 37, 31, 21, 21, 20, 18, 18, 11, 9, 9, 6, 6, 6, 2.	22	17	77
Cont.	42, 35, 30, 27, 21, 19, 16, 16, 14, 12, 10, 6, 5, 3, 2, 1, 1.	15	12	80
	# de Rosetas ($\times 10^4$)			
SE	703, 547, 532, 530, 440, 328, 250, 224, 220, 154, 140, 119, 90, 0.	306	210	68
MCM	649, 481, 459, 330, 308, 305, 294, 260, 260, 256, 230, 220, 210, 170, 103, 21, 15.	269	159	59
Cont.	399, 350, 252, 240, 210, 160, 142, 140, 130, 126, 110, 90, 90, 80, 80, 12, 10.	154	106	68

TABLA 2. INDUCCIÓN A LA FORMACIÓN DE RECEPTORES PARA
EP EN CELULAS DE MEDULA OSEA.

Los resultados obtenidos para SE y para el control fueron muy semejantes, es más, da la impresión que hubo una mayor inducción para receptores Fc en el testigo (15%) que en el medio con FcRI -- (13%). Sin embargo hay que tener en consideración que como el SE contiene además del FcRI el llamado inductor a la proliferación de macrófagos y granulocitos (MGI, del inglés Macrophage and Granulocyte Inducer), es notorio que los datos de porcentaje no dan una idea clara del número de células que fueron inducidas por el FcRI, por ello se consideró adecuado evaluar el número de células que formaron rosetas EA en cada una de las situaciones experimentales.

Con el SE en donde se detectó la mayor proliferación de células, también se obtuvo la mayor inducción de rosetas, con un promedio de 306×10^4 células con receptores y con d.e. de 210.

Con el MCM el número de rosetas fué de 269×10^4 con d.e. de 159. Por último, el testigo presentó 154×10^4 rosetas y desviación de 106. No obstante, hay que hacer notar que en los tres casos las variaciones fueron muy grandes tal y como lo muestra la desviación estandar.

Al analizar estos resultados se observa que el FcRI contenido en el SE duplicó el número de células con receptores para la Fc respecto al control, en tanto el MCM ocupó un punto aproximado, aunque menor al SE.

INDUCCION A LA FORMACION DE ROSETAS EA EN MEDULA OSEA DE
RATONES DE DISTINTAS CEPAS; CD-1, NMR-1 y NIH.

La gran variabilidad que se encontró en la inducción a la formación de rosetas EA, en células de médula ósea en los diferentes experimentos realizados, nos hizo pensar en la posibilidad de alguna alteración en el estado de salud de los ratones utilizados, o en una propiedad muy específica de la cepa empleada.

Para poder esclarecer estas cuestiones, se realizaron experimentos similares de inducción con SE y MCM utilizando, tanto ratones de la misma cepa CD-1 provenientes de otro bioterio (C-II), como ratones de otras dos cepas: la NMR-1 (C-III) y la NIH (C-IV) (tabla-3).

Al analizar los resultados obtenidos con médula ósea de la C-II, nos encontramos que las d.e. eran mucho menores que las observadas con la C-I, ya que con SE se encontró un promedio de 17% con d.e. de únicamente 7, asimismo con MCM se tuvo un promedio de 20% con d.e. de 10.

Por otro lado, los valores obtenidos para los controles con la C-II, fueron de menos de la mitad, 7% de promedio con d.e. de 5, que los encontrados con nuestra propia cepa. Estos resultados indican que las condiciones del bioterio pueden influir fuertemente en el porcentaje de receptores inmunológicos de las células hematopoiéticas.

Al considerar los valores obtenidos con los ratones de las C-III y C-IV, se destacó que en el caso de la C-III los resultados de inducción fueron semejantes a los encontrados para C-II con un promedio de 19% y d.e. de 7 para SE y un promedio de 26% con d.e. de 9 para MCM, sin embargo los controles fueron extremadamente variados y elevados con promedio de 30 y d.e. de 18.

Para la C-IV se encontraron valores muy similares para los promedios tanto de SE, MCM, así como en el control (15, 15 y 12%) y

CEPA	INDUCIOR	% de Rosetas	\bar{x}	d.e.	c.v.
CD-1	SE	30, 19, 18, 15, 10, 10.	17	7	40
	MCM	33, 29, 27, 25, 14, 12, 12, 7.	20	10	50
	Cont.	17, 13, 8, 7, 5, 3, 3, 1.	7	5	71
NMR-1	SE	31, 20, 18, 14, 12.	19	7	36
	MCM	35, 31, 29, 21, 13.	26	9	34
	Cont.	48, 44, 30, 22, 4.	30	18	60
NIH	SE	19, 16, 15, 11.	15	3	20
	MCM	20, 15, 13, 11.	15	4	26
	Cont.	16, 14, 10, 6.	12	4	30

TABLA 3. INDUCCION A LA FORMACION DE ROSETAS EA EN RATONES DE DISTINTAS CEPAS.

d.e. muy baja de 3, 4 y 4 respectivamente.

Nuestros resultados indican que para efectuar estudios de inducción a la formación de receptores inmunológicos, es muy importante seleccionar la cepa de ratón a ser utilizada y considerar el estado general de salud de los mismos. Para la continuación de este -- trabajo se eligió proseguir con la C-II, ya que la C-III tenía con-- troles muy elevados y la C-IV muy parecidos a los encontrados me-- diante inducción.

DETERMINACION DE RECEPTORES Fc EN CELULAS DE MEDULA OSEA DESPROVISTA DE CELULAS MADURAS MEDIANTE PREINCUBACION.

Siendo que los portadores de receptores Fc son células maduras, se pensó que la variabilidad encontrada en la C-I, respecto a la C-II, podía ser debida a la existencia en la médula ósea de células altamente diferenciadas.

Con el objeto de separar a dichas células, se optó por la propiedad que tienen de adherirse al sustrato de cultivo.

Para ello se cultivaron previamente las células durante 1 hora y se eliminaron aquellas que no se encontraban en suspensión.

Tal y como era de esperarse, el porcentaje de células con receptores bajo significativamente de 7% a 2% tanto para Fc como para -- 13 (tabla 4).

Sin embargo, al utilizar estas células para estudiar la inducción mediada por FcRI contenido en el MCM, durante 4 días de incubación, se obtuvieron valores muy semejantes a los encontrados cuando no se depletó a la médula de las células adherentes, ya que en -- aquellas que habían sido preincubadas se encontró un valor de 14% de rosetas EA en los medios que contenían FcRI y sólo 7% en el control, en tanto, en células sin preincubación se tuvo que en las -- que no se agregó MCM el porcentaje de rosetas EA fué de 13% y el control de 7%.

Determinacion de Rosetas EA. Tiempo Cero					
		% de Rosetas	\bar{x}	d.e.	C.V.
Medula Osea	Fc	13, 10, 8, 7, 6, 5, 2.	7	3.3	47
Completa	C3	14, 9, 8, 6, 4, 4, 4.	7	3.7	53
Medula Osea Preincubada 1 hora.	Fc	3, 3, 2, 1.	2	0.9	45
	C3	3, 2, 2, 1.	2	0.8	40

Determinacion de Rosetas EA. 4 dias de Incubacion		
Medula Osea	MCM	14, 13, 12. 13
Completa	Cont.	9, 7, 4. 7
Medula Osea	MCM	17, 14, 12. 14
Preincubada	Cont.	10, 8, 4. 7

TABLA 4. DETERMINACION DE RECEPTORES Fc, EN CELULAS DE MEDULA OSEA DESPROVISTA DE CELULAS MADURAS MEDIANTE PREINCUBACION.

INDUCCION A LA FORMACION DE RECEPTORES PARA Fc_γ EN CELULAS
DE MEDULA OSEA DESPROVISTA DE CELULAS MADURAS.

Es conocido que la inoculación intraperitoneal de un irritante ocasiona la migración a esta cavidad, de leucocitos maduros. Estos leucocitos están constituidos principalmente de granulocitos provenientes de la reserva medular. En consecuencia, otra forma de lograr la depleción de células maduras portadoras de receptores para Fc en la médula ósea, es mediante una previa inyección intraperitoneal de caseinato de sodio, de tal forma que después de 16 horas - la mayoría de células maduras de la reserva hayan migrado al sitio en que se localice al irritante y por tanto desprovisto a la médula ósea de sus células más maduras portadoras de receptores para Fc.

Esta forma indirecta de enriquecer a la médula de precursores - mieloides fue aplicada a ambas cepas de ratones CD-1, para determinar si en estas condiciones se comportaban en forma similar y tratar de obtener controles bajos de rosetas EA, para de este modo estudiar con más detalle el proceso de inducción de receptores Fc mediado por el FcRI contenido en el SE y MCM.

Se tomó como tiempo ideal para este experimento las 16 horas, - pues es sabido que la mayoría de los granulocitos se encuentran a este tiempo en la cavidad peritoneal y por otro lado, es un periodo lo suficientemente corto como para evitar la repoblación de la reserva de la médula ósea.

Además, para asegurarnos de que no era necesario esperar más -- tiempo para garantizar la depleción medular, se evaluó el porcentaje de células formadoras de rosetas EA en la médula ósea de C-1, a las 16 y 48 horas después de ser inyectados 3 ml de caseinato de sodio al 10% en la cavidad peritoneal. En ambos casos se encontraron resultados semejantes (tabla 5), ya que obtuvimos un promedio de 8 y 7% con d.e. de 2 y 2.5 respectivamente.

Hay que notar que el porcentaje de células con receptores para -

**Evaluacion de Rosetas Ea en Celulas de
Medula Osea (%).**

	16 horas	48 horas
	11 8 8 6	10 6 5
Promedio	8	7
d.e.	2	2.5
c.v.(%)	25	35

TABLA 5. DETERMIANCIÓN DEL PORCENTAJE DE ROSETAS EA EN MEDULA OSEA DESPROVISTA DE CELULAS MADURAS. ENSAYOS A 16 Y 48 HORAS DESPUES DE LA INOCULACION INTRAPERITONEAL DE CASEINATO DE SODIO.

Fc fué muy parecido al encontrado cuando no se depletó la reserva medular, no obstante las d.e. fueron sensiblemente menores. Estos resultados nos llevan a pensar que la d.e. nos sirve como un parámetro para detectar el estado de salud de los animales, en consecuencia se tomaron ratones de la C-II para reconfirmar estos resultados pero divididos en dos grupos, en el primero se inyectó como se describió anteriormente el caseinato de sodio y en el segundo grupo no (control).

Nuestros resultados indican que la médula depletada se comportó en forma análoga a la C-I, con un 8% de promedio de rosetas y una d.e. de 13 (tabla 6).

Con el propósito de estudiar en ambas cepas de ratones el efecto inductor del FcRI en médula ósea depletada de células maduras, se procedió a incubar estas células durante 4 días en presencia de -- los medios inductores SE, MCM y medio condicionado de pulmón (MCP). Los resultados mostraron que el MCM fué el medio con mayor actividad inductora, ya que se obtuvo un promedio de 18% en comparación de 16% para SE y 11% para MCP.

Al igual que lo realizado en el caso de la determinación de la formación de rosetas EA y EAC en médula ósea, se evaluaron el número de células que formaban rosetas con y sin los medios condicionados, para calcular la capacidad inductora a la formación de nuevas rosetas del FcRI contenido en ellos. Se encontró que en ausencia -- de medio condicionado (tabla 7) habían en promedio 54.5×10^4 --- células con rosetas EA y que en tanto con SE como con MCM aumentaron considerablemente a 310 y 190×10^4 respectivamente.

Es claro que aunque el MCM resultó tener mayor porcentaje de -- células con receptores para Fc, fué el SE el que resultó más activo al inducir al mayor número de células a formar dichos receptores, esto es probablemente debido al MGI que contiene SE.

Ensayos a	Ratones Inyectados	% de Rosetas	\bar{x}	d.e.	c.v. (%)
		12, 10, 10, 9, 7, 6, 6, 5.	8	2	20
Tiempo Cero	Ratones no Inyectados	29, 27, 5, 5, 2, 1.	12	13	100
4 días de Incubación Ratones Inyectados 16 horas.	MCP	20, 19, 11, 6, 6, 4.	11	7	60
	MCH	27, 26, 23, 14, 13, 7.	18	8	40
	Cont.	18, 14, 5, 4, 3.	9	6	60

TABLA 6. DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE ROSETAS EA EN
 MEDULA DESPROVISTA DE CELULAS MADURAS DE LA CEP
 C-I. ENSAYOS A TIEMPO CERO Y A 4 DIAS DE INCUBA-
 CION EN PRESENCIA DE MEDIO INDUCTOR.

Medios	% de Rosetas EA	\bar{x}	d.e.	c.v. (%)
SE	29, 20, 20, 19, 18, 18, 16, 9, 9, 9, 5.	16	7	40
MCM	25, 22, 20, 20, 18, 18, 10, 9.	18	6	30
Cont.	19, 16, 14, 10, 10, 9, 9, 8, 8, 5, 4, 2.	10	5	50
	# de Rosetas x 10^4			
SE	610, 600, 440, 410, 280, 252, 220, 220, 170, 105, 105.	310	180	58
MCM	300, 300, 230, 200, 160, 154, 90, 90.	190	83	43
Cont.	185, 112, 81, 72, 45, 44, 30, 20, 20, 19, 13, 13.	55	52	90

TABLA 7. INDUCCION A LA FORMACION DE RECEPTORES PARA Fc EN CELULAS DE MEDULA OSEA DESPROVISTA DE CELULAS MADURAS, MEDIANTE LA INOCULACION INTRAPERITONEAL DE CASEINATO DE SODIO DURANTE 16 HORAS.

INDUCCION A LA FORMACION DE RECEPTORES Fc EN CELULAS DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATONES INYECTADOS CON CASEINATO DE SODIO.

Por último, con la finalidad de determinar si las células maduras que migran a la cavidad peritoneal desde la médula ósea, son susceptibles de ser activadas por el FcRI, se incubaron estas en presencia de MCM y MCP durante 4 días. Los resultados indican que en general las células no son inducibles, pues obtuvimos promedios muy elevados con d.e. grandes y semejantes a los encontrados en ausencia de medio inductor (tabla 8).

CINETICA DE FORMACION DE ROSETAS EA E INMUNOFAGOCITOSIS EN MACROFAGOS MURINOS RESIDENTES DE LA CAVIDAD PERITONEAL.

Siendo que a lo largo de este trabajo, se ha encontrado que el MCM es un buen inductor de receptores para la Fc en células mieloides, se pensó que puede existir un fenómeno de autoinducción mediado por los monocito-macrófagos. Para estudiar el fenómeno de formación de receptores Fc en función del tiempo, se cultivaron 5×10^6 macrófagos residentes de la cavidad peritoneal y el porcentaje de células formadoras de rosetas EA fué evaluado a los 0, 1, 2, 4 y 8 días. Se encontró que el porcentaje de células que formaban rosetas EA aumentaba a medida que transcurría el tiempo de cultivo, llegando a saturación aproximadamente a los 4 días con un promedio de 73% de células con receptores (tabla 9).

Cabe hacer notar que en tiempo cero, ya había células que portaban receptores para Fc (7%) y que a los 8 días hubo un experimento en el cual se encontró un 90% de células capaces de formar rosetas.

MEDIO	MCP	MCM	CONTROL
Rosetas (%)	44	38	34
	20	36	28
		27	12
Promedio	32	34	25

TABLA 8. INDUCCION A LA FORMACION DE RECEPTORES Fc EN CELULAS DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATONES INYECTADOS CON CASEINATO DE SODIO.

TIEMPO (días)	Exp.	Rosetas (%)		Fagocitosis (%)		% Total		\bar{x}	d.e.	C.V. (%)
		A	B	A	B	A	B			
0		10	0	0	4	10	4	7	4.2	60
1		19	20	0	5	19	5	22	4.2	19
2		22	22	30	10	52	10	42	14.1	30
4		10	46	67	24	77	24	73	4.9	6
8		41	89	29	1	70	1	80	14.1	17

TABLA 9. CINÉTICA DE FORMACIÓN DE ROSETAS EA E INMUNOFAGOCITOSIS EN MACROFAGOS MURINOS RESIDENTES DE LA CAVIDAD PERITONEAL.

Se advirtió en el transcurso de los experimentos, que en ocasiones las células que formaban rosetas efectuaban una fagocitosis de los eritrocitos. Para evaluar el fenómeno de inmunofagocitosis en función del tiempo de cultivo, se determinó por separado el número de macrófagos que únicamente hicieron rosetas de aquellos que efectuaron fagocitosis.

Obtuvimos que existió muy poca actividad inmunofagocítica antes del segundo día de cultivo, llegando a no detectarse en algunos experimentos. La inmunofagocitosis aumentó hasta el cuarto día de cultivo en donde se llegó a detectar hasta un 67% de células con al menos un eritrocito fagocitado (tabla 9). Sin embargo la fagocitosis disminuyó importantemente al octavo día de cultivo, llegando en una ocasión a desaparecer completamente.

Es interesante hacer notar que al efectuar la suma de los porcentajes de macrófagos formadores de rosetas con aquellos que inmunofagocitaron, los valores seguían una cinética ascendente, lo cual parece indicar que aunque existía una variabilidad en las células que podían fagocitar, había homogeneidad en el total de células con receptores para Fc (Figura 3).

CINETICA DE FORMACION DE RECEPTORES C3 E INMUNOFAGOCITOSIS EN MACROFAGOS RESIDENTES DE LA CAVIDAD PERITONEAL.

Como los receptores para C3 en macrófagos juegan también un papel muy importante en la defensa del organismo contra cuerpos extraños, se consideró interesante efectuar experimentos similares a los realizados para los receptores para Fc, utilizando macrófagos residentes y evaluando la aparición de receptores para C3 a los 0, 1, 2, 4, y 8 días de cultivo.

Para llevar a cabo la evaluación de la actividad, se consideró la suma del porcentaje de células que formaron rosetas, con aquellas que fagocitaron a los eritrocitos. Se observa que a tiempo -

CINETICA DE RECEPTORES Fc

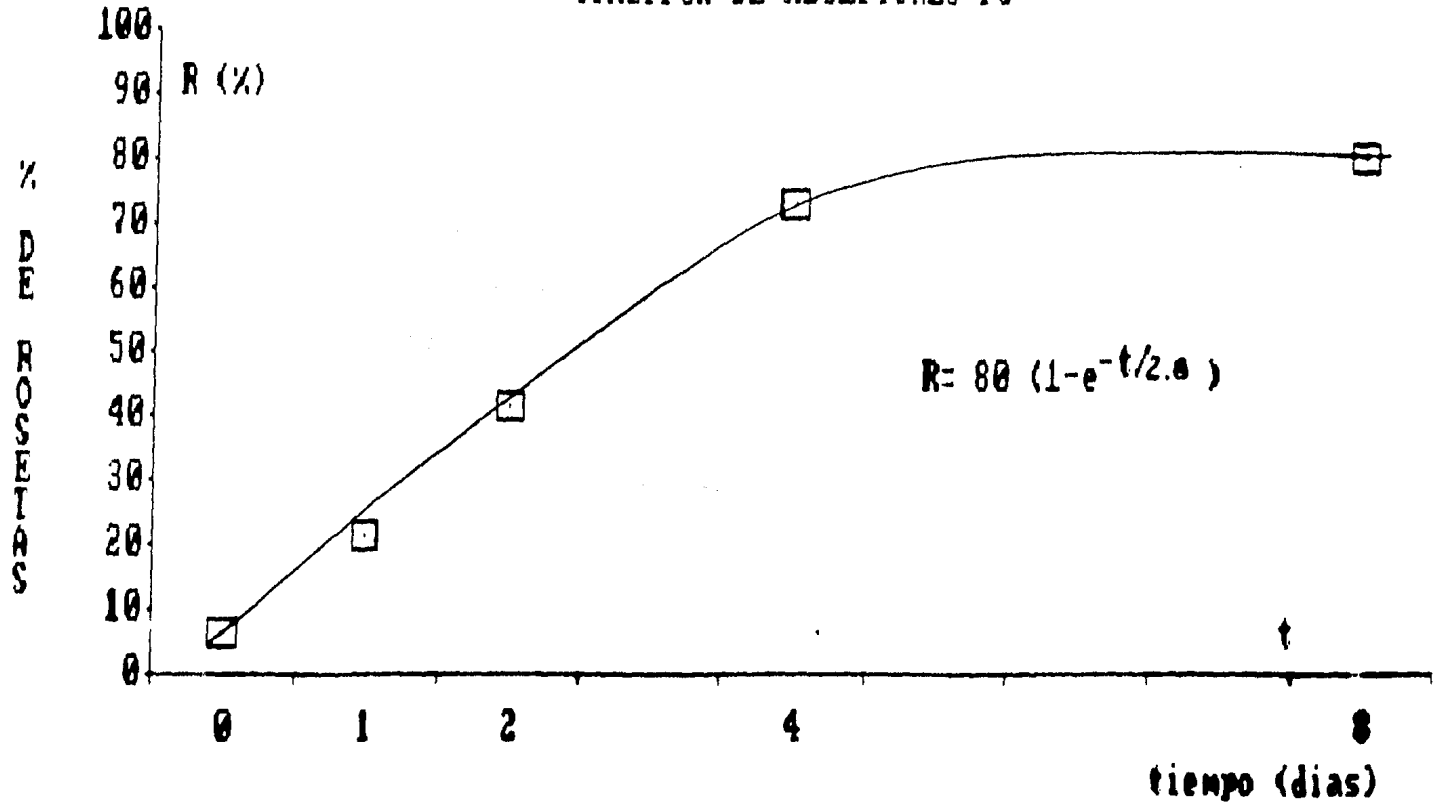


FIGURA 3. CINETICA DE AUTOINDUCCION A LA FORMACION DE ROSETAS EA EN CELULAS DE MEDULA OSEA.

TIEMPO (DIAS).	ROSETAS C3 (%)			FAGOCITOSIS (%)			% TOTAL			
	EXP.	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0		74	1	24	0	13	23	74	14	47
1		12	12	21	44	26	17	56	38	38
2		9	6	61	70	13	7	79	19	68
4		15	38	44	68	8	10	83	46	54
8		9	91		82	3		91	94	

TABLA 10. CINETICA DE FORMACION DE RECEPTORES PARA C3 E IN-
MUNOFAGOCITOSIS EN MACROFACOS MURINOS RESIDENTES DE
LA CAVIDAD PERITONEAL.

cero las células presentan una gran heterogeneidad de receptores para C3, siendo en un caso de 74% y en otro de 1% (tabla 10). No se observó uniformidad en el incremento a la formación de receptores para C3 en función del tiempo, al octavo día de cultivo se encuentra en uno de los experimentos 91% de células con receptores para C3 y en el otro únicamente 9%. La inmunofagocitosis tampoco resultó ser homogénea, ya que a medida que transcurre el tiempo de cultivo se ven valores tan altos como 70% al tercer día y 82% al octavo día, o bien, muy bajos de 3% al octavo día (tabla 10).

Al haber observado que en dos experimentos independientes el porcentaje de receptores para C3 de macrófagos peritoneales era altamente heterogéneo, se procedió a realizar un tercer experimento en el que la formación de rosetas y la inmunofagocitosis resultaron ser nuevamente sumamente variables en el tiempo de cultivo. El comportamiento tan variable de la inducción de receptores para C3 en macrófagos de cavidad peritoneal, no nos permite efectuar un promedio para establecer un patrón de inducción bien definido tal y como se hizo para la inducción de receptores para Fc (Fig. 4).

INCAPACIDAD DE LOS MACROFAGOS ALVEOLARES PARA PRODUCIR MGI Y PARA AUTOINDUCIRSE A LA FORMACION DE RECEPTORES PARA Fc Y C3.

Una vez determinado que los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal eran capaces de autoinducirse en casi un 100% in vitro a la formación de receptores tanto para Fc como para C3, se procedió a cultivar macrófagos alveolares para determinar si este comportamiento es compartido por este tipo de fagocitos. Sin embargo en nuestras condiciones de cultivo no se observó ningún fenómeno de autoinducción pues aún después de 4 días de incubación, los macrófagos alveolares carecían de receptores Fc.

En trabajos anteriores se encontró que existía una heterogeneidad en la producción de factores inductores dentro de los macrófagos, pues solo los residentes de la cavidad peritoneal secretaban al medio de cultivo FcRI y C3RI y no MGI, mientras que los induci-

CINETICA DE RECEPTORES C3

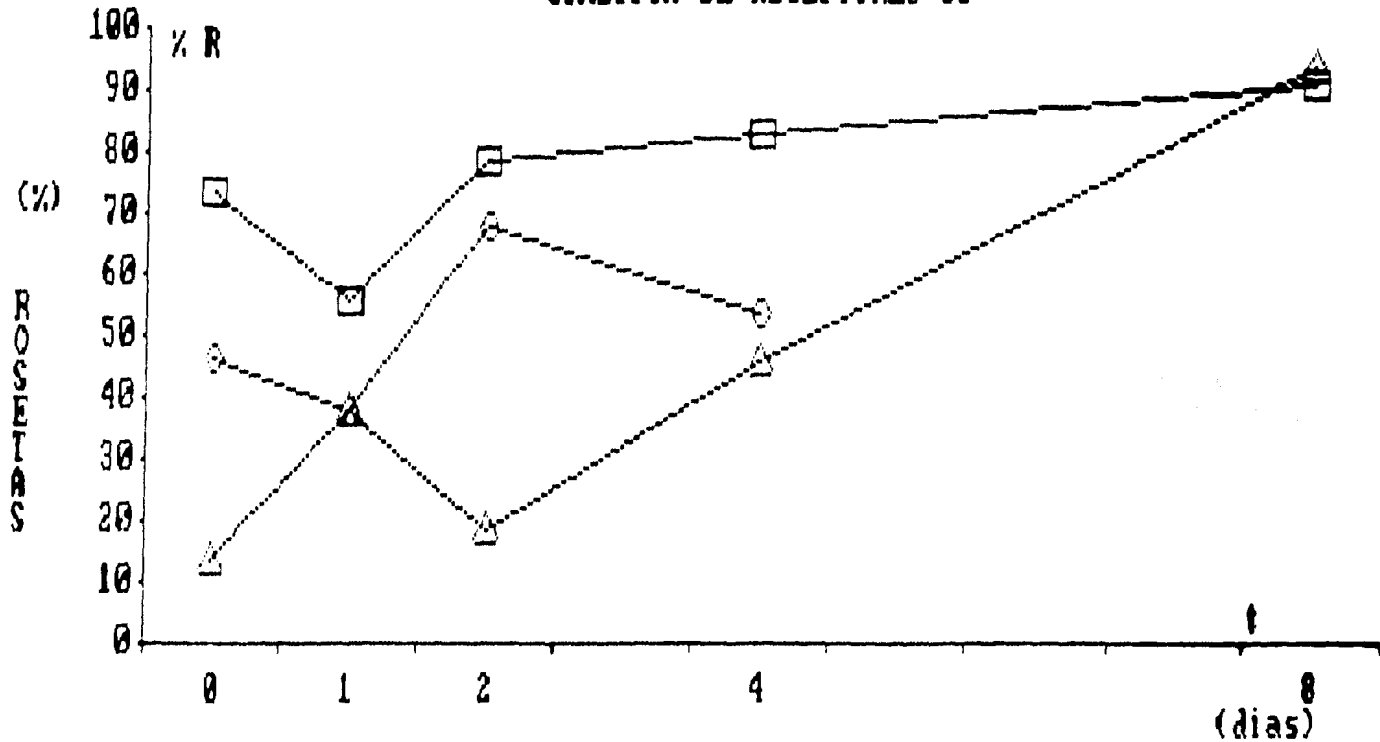


FIGURA 4. CINETICA DE FORMACION DE RECEPTORES PARA C3 EN 3 EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.

TIEMPO
□ A △ B ○ C

dos a dicha cavidad secretaban MGI y no FcRI y C3RI.

Con el objeto de determinar si el MGI que se encuentra abundantemente en el MCP, procedía de estos fagocitos incapaces de autoinducirse a la formación de rosetas EA, se produjo medio condicionado por estas células (MCMA) y tanto por pulmones endotóxicos enteros, como depletados de macrófagos alveolares.

Nuestros resultados muestran que, mientras el MCP es un fuerte inductor a la proliferación al igual que el MCP depletado de macrófagos alveolares, el MCMA no indujo aumento celular dando un resultado muy semejante al control sin medio condicionado (tabla II).

Aunque el promedio de activación a la proliferación celular del MCP fué mayor al del MCP depletado de macrófagos alveolares, hay que advertir que en la mitad de los experimentos los valores son muy semejantes y que la otra mitad fué un poco menor, probablemente debido al efecto retardado y traumático en la extracción de los pulmones depletados de fagocitos, para la producción del medio condicionado respectivo.

Medios	# de Celulas ($\times 10^4$)	\bar{x}	d.e.	c.v.
MCP+	243, 225, 191, 175, 112, 108.	176	56	30
MCP-	249, 190, 110, 103, 80, 80.	135	69	50
MCMA	55, 50, 38, 30.	43	11	25
Cont.	79, 77, 63, 38, 35, 20, 30, 10.	39	21	50

TABLA 11. INDUCCION A LA PROLIFERACION DE CELULAS MIELOIDES MEDIANTE LA ADICION DE MEDIO CONDICIONADO DE PULMON ENTERO (MCP+), MEDIO CONDICIONADO DE PULMON DESPROVISTO DE MACROFAGOS ALVEOLARES (MCP-) Y MEDIO CONDICIONADO DE MACROFAGOS ALVEOLARES (MCMA).

4. DISCUSION.

En el proceso de la diferenciación de los macrófagos, estos van adquiriendo características que no presentan en estados más inmaduros. En los pasos de diferenciación de promonocito a macrófago maduro, la presencia de receptores para la porción Fc de la IgG en la membrana celular, va aumentando significativamente desde los estados de promonocito y monocito, hasta las etapas de macrófago inmaduro y maduro. Otra de las facultades que se incrementan en el proceso de diferenciación de esta línea celular es la de fagocitosis, siendo asimismo máxima en etapa de macrófago maduro (107).

La membrana de células de la serie de los monocito-macrófago tiene la capacidad de reconocer y unir el fragmento Fc y C3 de ciertos complejos inmunes. Bajo condiciones in vitro, esta unión, aún con pequeñas cantidades de anticuerpos, puede activar importantes funciones celulares incluyendo la fagocitosis y lisis de células blancas cubiertas con anticuerpos (108).

Es de llamar la atención que los mismos macrófagos participan tanto en la inducción de receptores para Fc y C3 en los monocitos, como en su proliferación (69) dando origen a un mecanismo de auto-inducción. Se consideró en consecuencia para este trabajo el estudio de los mecanismos de autorregulación, para ello, con la finalidad de averiguar el comportamiento que siguen las células de la médula ósea en la formación de receptores Fc y C3, ante la acción de moléculas como lo son el FcRI y C3RI, se hicieron experimentos empleando la médula de ratones provenientes de diferentes cepas como la NMR-1, NIH y CD-1.

Para la inducción a este tipo de receptores se emplearon medios ricos en estos factores como lo son el suero de ratones sometidos a la acción de endotoxinas, así como el medio condicionado por los pulmones de estos ratones, medio condicionado por macrófagos residentes de la cavidad peritoneal, estimulados in vitro con lipopolisacáridos.

sacáridos. Además, tomando en consideración que en la médula ósea - existe un gran número de células diferenciadas potencialmente portadoras de receptores Fc y C3 (107), se creyó pertinente tratar de eliminarlos para efectuar los estudios de inducción con una población altamente enriquecida de precursores indiferenciados. Para ello se utilizaron dos técnicas, una in vivo al depletar a la médula ósea de su reserva leucocitaria mediante la previa inoculación de un irritante en la cavidad peritoneal y otra in vitro al eliminar del ensayo toda célula que se adhería al sustrato de cultivo - durante la primera hora de incubación.

Otra célula portadora de receptores Fc y C3 es el granulocito, - siendo también una célula muy abundante en la médula ósea (109), razón por la que se decidió aislarla para averiguar si es capaz de ser inducida para estos receptores y de esa manera enmascarar la actividad del monocito. También se creyó pertinente averiguar sobre el fenómeno de autoinducción a la formación de receptores Fc y C3 - en macrófagos. Se utilizaron los fagocitos residentes de la cavidad peritoneal dada su fácil colecta así como su capacidad de inducción a la formación de receptores Fc y C3. Los parámetros para la - realización de estos experimentos fueron el tiempo como variable - independiente y el porcentaje de rosetas EA y EAC como variable de - pendiente, obteniéndose de esta manera la cinética de autoinducción.

Por otro lado, siendo que en nuestros resultados de inducción de receptores Fc y C3, entre otros medios se utilizó el MCP, el cual - además de PSEI contiene importantes cantidades de MGI y como el macrófago también es una célula secretora de MGI y se encuentra abundantemente en el pulmón, se decidió determinar si el macrófago alveolar estaba implicado en la producción de esta molécula en forma semejante a lo encontrado con macrófagos inducidos a la cavidad peritoneal (11).

Se consideró que al realizar los experimentos hasta aquí descritos se podría contribuir al estudio de los mecanismos de inducción y autoinducción tanto de proliferación como de formación de receptores inmunológicos en células del sistema mononuclear fagocítico.

Al determinar el nivel de células con receptores para Fc y C3 en médula ósea, se obtuvo una gran variabilidad, aunque en promedio el porcentaje de células formadoras de rosetas fué bajo, siendo un poco más elevado para C3 (9%) en comparación de Fc (6%). Sin embargo, hay que notar que la desviación estándar en ambos casos fué - de aproximadamente la mitad del valor promedio, lo cual parece indicar una gran heterogeneidad funcional en las células de la médula ósea de los ratones empleados. Esta variación nos hizo pensar ya - sea que el estado general de los ratones no era óptimo, o bien, que esta variación fuera una característica particular de la cepa con la que trabajamos. Para aclarar esto se hicieron experimentos empleando distintas cepas de ratones. Se encontró que los ratones de la cepa C-II eran aquellos que presentaban una d.e. menor en los diferentes experimentos, probablemente debido a los cuidados intensivos con los que se les mantenía a estos ratones, siendo en consecuencia evidente la importancia que representa el seleccionar cuidadosamente la cepa de ensayo.

Debido a la diferencia en resultados observados con dos cepas - CD-1 idénticas en donde se tuvo una mayor d.e. con la C-I que con la C-II, siendo esta última mantenida con mayores cuidados, podemos interpretar que la baja d.e. se puede atribuir al mejor estado de - salud de estos ratones. Si este fuera el caso entonces se ha desarrollado un método, mediante el cual, se puede en forma sencilla - averiguar el estado de salud en que se encuentre alguna cepa de ratones y de esta manera ayudar a elegir los animales idóneos en experimentación de tipo inmunológico.

En los experimentos de inducción a la formación de receptores para Fc, en células de médula ósea, el medio condicionado que provocó el mayor porcentaje de rosetas EA fué el MCM. Resalta el hecho de que el testigo sin inductor tuvo un porcentaje de inducción más elevado que el obtenido con SE, esto haría a primera vista pensar que el SE carece de actividad inductora, sin embargo, este suero contiene MGI y por lo tanto a la vez que induce a la formación de receptores Fc, provoca la proliferación de macrófagos y granulociti-

tos, por tanto se pensó en la posibilidad de que el efecto del FcRI pudiera emascaramado por la acción del MGI. Se procedió entonces a evaluar el número total de rosetas formadas y no el porcentaje, para así tener una idea más clara del fenómeno de inducción cuando está en combinación con el de proliferación celular. De este modo se obtuvo un valor del doble de rosetas respecto al testigo, se guido por el MGI.

Aunque en trabajos anteriores (110) se demostró que el macrófago residente de la cavidad peritoneal no produce MGI, y que por tanto no puede inducir a la proliferación celular, en nuestros resultados se encontraron más células que en los testigos. La posible explicación se basaría en el hecho de que el MCM al contener además de -- FcRI diversos metabolitos producidos por los macrófagos de la cavidad peritoneal, evite el deterioro celular que se observa en el -- testigo.

Al depletar la médula ósea de monocitos maduros al preincubarla durante una hora y utilizando en los ensayos solo las células no adherentes, se encontró un descenso en el porcentaje de rosetas para EA y EAC respecto a la médula total, sin embargo al cultivarla por 4 días tanto en presencia como ausencia de FcRI, los porcentajes obtenidos fueron similares. Probablemente este efecto sea debido a que ocurre muerte de células de tipo granulocítico, lo cual haría aumentar más lentamente el porcentaje de células con receptores Fc, o simplemente al hecho de que la depleción in vitro elimine a otro tipo de células importantes que puedan intervenir en el proceso de diferenciación estudiado.

La segunda técnica intentada para depletar a la médula ósea de células maduras y evitar alterar su composición fué mediante la expulsión de la reserva de células maduras al inyectar previamente un irritante en la cavidad peritoneal. En trabajos anteriores (112) se encontró que a las 16 horas de haber inoculado el irritante ya habían migrado la mayoría de granulocitos de la médula ósea a la cavidad peritoneal, con lo cual se esperaba que la médula quedara totalmente desprovista de células maduras potencialmente por-

tadoras de receptores Fc. Al evaluar el porcentaje de rosetas EA en médula ósea de ratones tratados 16 horas con caseinato de sodio, se observó que si bien el porcentaje de rosetas es similar al encontrado en médula de ratones sin tratamiento, la d.e. es mucho menor siendo en este caso de la cuarta parte del promedio en comparación de casi la mitad en médula total. Estos resultados indican que la variabilidad tan grande encontrada entre los experimentos realizados con diferentes ratones, está asociada más directamente a las células maduras las cuales al migrar dejan en la médula una población más homogénea.

Para tener una mayor eliminación de células maduras, se hicieron experimentos en los que se colectaron las células de la médula 48 horas después de la inyección de caseinato de sodio intraperitoneal, pensando en que con este tiempo también se depletaba de la médula un número importante de monocitos maduros. Los resultados fueron muy semejantes a los hallados con 16 horas, lo cual hace pensar que la célula que provoca las fluctuaciones en los valores de rosetas en médula ósea total sea el granulocito. Entonces para estudiar la posible heterogeneidad de los granulocitos se utilizaron aquellos que migraron a la cavidad peritoneal después del estímulo con caseinato de sodio, siendo sometidos a ensayos de inducción a la formación de receptores para Fc. Se encontró que estas células no eran inducibles por el FCRI. Lo anterior se puede explicar si se considera que las células que migran son maduras y portadoras de receptores para Fc y que además carecen, por su núcleo aberrante, de la capacidad de síntesis de receptores membranales.

Ahora bien, si al depletar las células maduras de médula ósea portadoras de receptores Fc obtuvimos una población homogénea respecto a la inducción de receptores Fc, entonces al utilizar a los ratones de las C-I y C-II, depletarlos de células maduras y someterlos a ensayos de inducción por acción del FCRI, se esperaría encontrar resultados muy semejantes, en efecto se obtuvieron resultados similares, lo cual nos da la posibilidad de trabajar con médula ósea aún en ratones mantenidos con poco cuidado. Al medir el porcen

taje de células peritoneales tanto con receptores para Fc, como aptas para inmunofagocitar, se observó que la suma de estos fenómenos fué ascendente en función del tiempo de cultivo en ausencia de medio inductor, lo cual indica la existencia de un fenómeno de autoinducción. El hecho de haber obtenido un 7% de receptores para Fc en los macrófagos residentes antes de su incubación, puede significar que el ratón no estaba en óptimas condiciones de salud, o bien, ser debido a un fenómeno normal de vigilancia inmunológica. ya que puede ser que estas células presenten receptores fc para el caso de suscitarse un ataque a la integridad del animal. Es evidente que el fenómeno de autoinducción a la formación de receptores Fc puede ser muy útil, ya que en caso de haber una infección se contará con una población de macrófagos inmunológicamente activos.

Como el macrófago es el responsable de la producción de los componentes del sistema del complemento, y a la vez desarrolla receptores para el componente C3b de este sistema, se creyó conveniente realizar experimentos similares a los anteriormente descritos para detectar la posible autoinducción a la formación de receptores para C3. En este caso, se encontró también una cinética ascendente al realizar la suma de fagocitosis con el porcentaje de rosetas formadas, sin embargo, en los 3 experimentos realizados por separado, no hubo cinéticas de autoinducción semejantes. Nuevamente cabe la posibilidad de que esta variaciones tan amplias fueran debidas a la heterogeneidad en receptores de las células de cavidad peritoneal, posiblemente asociado a las condiciones en que se mantuvieron a los ratones.

Este fenómeno de autoinducción a la formación de receptores en macrófagos parece no ser compartido por todo tipo de fagocito, ya que en este trabajo no se detectó ningún fenómeno de este tipo cuando se utilizaron macrófagos alveolares. En trabajos anteriores se había mostrado que existe una especie de colaboración entre los diversos tipos de fagocitos que se encontraban en los tejidos, por ejemplo los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal producen los factores FCRI y C3RI, pero eran incapaces de secretar MGI. Por

otro lado, los macrófagos elicidados a dicha cavidad secretaban MGI pero carecían de la capacidad de producir FCRI y C3RI (110). Esta cualidad nos hizo pensar que probablemente el macrófago alveolar pudiese tener la propiedad de producir MGI y ser en consecuencia la fuente de este factor encontrado en el MCP. Sin embargo, nuestros resultados indicaron que el medio condicionado de macrófagos alveolares no contenía MGI, así como el pulmón desprovisto mediante lavado de estos macrófagos continuaba produciendo tal molécula. No obstante, no podemos estar seguros de que el macrófago no es el responsable de la producción de MGI en el pulmón, ya que tan sólo se usaron macrófagos alveolares y sería conveniente el determinar este fenómeno en otros fagocitos existentes en el tejido pulmonar. Se ha llegado a postular (113) que el macrófago alveolar sea de distinto origen al resto de los macrófagos del organismo, aunque es claro que se requiere de mayor experimentación para aclarar este problema; el comportamiento diferente de este fagocito descrito en el presente trabajo, puede ser debido a este origen distinto.

5. CONCLUSIONES.

A lo largo de este trabajo se encontró que el porcentaje de células con receptores para Fc, en la médula ósea murina variaba no únicamente entre ratones de cepas diferentes, sino ya sea en animales de cepas similares procedentes de diferentes bioterios, o entre ratones de la misma cepa del mismo bioterio. Sin embargo, la variabilidad encontrada entre ratones de la misma cepa, parece disminuir en animales mantenidos con estrictas medidas de higiene. En consecuencia se puede pensar que a mayor variabilidad del porcentaje de células con receptores para Fc en médula de ratones de una cepa dada, el estado de salud de estos es más deficiente. Es obvio que más experimentación es necesaria para poder generalizar esta conclusión, pero en caso de ser cierta se contaría con una técnica mediante la cual al determinar el porcentaje de células con receptores para Fc en médula ósea, se podría evaluar el estado de salud de los ratones de experimentación.

No obstante que se logran tener menos variaciones en los porcentajes al emplear ratones en buen estado de salud, se diseñaron 2 ensayos para tratar de reducir lo más posible esta variación. Así se emplearon 2 técnicas, una in vivo y otra in vitro, para tratar de obtener cultivos ricos en precursores mieloides y de esta manera poder contar con una población celular más homogénea capaz de ser inducida a su diferenciación. La técnica in vitro, en la que se separan las células altamente diferenciadas debido a su propiedad de adherirse al sustrato de cultivo (81), permitió reducir significativamente los porcentajes de células con rosetas, mas al proceder a cultivarlas por 4 días en presencia del inductor, ya no hubo diferencias en los porcentajes de rosetas con respecto a los cultivos de médula total. En consecuencia consideramos que esta técnica no es adecuada para una experimentación en la que se desee la inducción a la formación de receptores Fc y C3 empleando la técnica de rosetas. En cuanto a la técnica de depleción in vivo de la reserva medular, se encontraron porcentajes más homogéneos de formación de rosetas entre los diferentes experimentos realizados, de tal forma -

que la desviación estandard disminuyó notablemente. Podemos darnos cuenta entonces que esta técnica logra una población celular más homogénea en su estado de diferenciación y capaz de ser inducida a la formación de receptores Fc.

Siendo que la depleción de la médula ósea aumentó la homogeneidad de células respecto a receptores para Fc y teniendo en cuenta que por lo general el granulocito es aquel que migra a la cavidad peritoneal en experimentos de depleción de la médula, se asoció a este tipo celular la gran heterogeneidad normalmente encontrada en la médula ósea murina. Esta suposición fué corroborada al encontrar en este trabajo que los granulocitos encontrados durante el proceso inflamatorio de depleción en la cavidad peritoneal, tenían una gran heterogeneidad respecto a la formación de rosetas EA.

Por otra parte, los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal al ser incubados, mostraron porcentajes ascendentes en la formación de rosetas EA y EAC en función del tiempo, lo cual es indicio de un fenómeno de autoinducción a la formación de receptores para Fc y C3. Suponemos que tal inducción es provocada por la producción in vitro de FcRI y C3RI por parte de los mismos macrófagos.

Esta suposición es apoyada por el hecho de que los macrófagos residentes han sido identificados como productores de estos factores (69). Es claro que la producción en grandes cantidades de estas moléculas podría llevar a la aplicación terapéutica en individuos que necesitaran de un aumento de FcRI y C3RI para un mejor funcionamiento de su sistema inmune.

Como en este trabajo también era de interés el establecer si existe heterogeneidad funcional entre fagocitos residentes en diferentes tejidos, se evaluó la capacidad de los macrófagos alveolares para producir MGI, teniendo como antecedente que los residentes de la cavidad peritoneal producen FcRI y C3RI y no MGI, mientras que los inducidos a dicha cavidad producen MGI y no FcRI y C3RI. Se encontró que los macrófagos alveolares no producían MGI, lo cual hace

hace suponer que estas células pueden tener un origen diferente al de los demás macrófagos. Sin embargo es necesario realizar estudios para averiguar el origen de esta célula, así como cual es la responsable de la producción de MGI en el pulmón, e indagar el papel que desempeña el macrófago alveolar en la regulación de la respuesta inmune.

Este trabajo aporta conocimientos sobre el proceso de diferenciación de las células del sistema mononuclear fagocítico, sin embargo no se cuenta con la suficiente información para comprender los mecanismos que originan las diferencias funcionales entre los fagocitos, en cuanto a la producción de factores como el MGI, FcRI y -C3RI, así como su significado biológico.

6. 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 normales in vitro. El medio está constituido de los siguientes componentes químicos.

AMINOACIDOS	CONCENTRACION (mg/l)
L-Arginina	84.0
L-Cistina	62.57
L-Glutamina	584.0
Glicina	30.0
L-Histidina HCl.H ₂ O	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-Triptófano	16.0
L-Tirosina (Sal Disódica)	104.2
L-Valina	94.0
VITAMINAS	
D-Ca Pantotenato	4.0
Cloruro de Colina	4.0
Acido Fólico	7.2

Inositol	7.2
Nicotinamida	4.0
Piridoxal.HCl	4.0
Riboflavina	0.4
Tiamina	4.0

SALES INORGANICAS

Cloruro de Calcio Anhidro	200.0
Nitrato de Hierro III Nonhidratado	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

L-Glucosa	4500.0
Rojo Fenol	15.0

Mediante agitación se diluye el medio en polvo, se adicionan -- 3.7 g/l de bicarbonato de sodio. Asimismo se agregan antibióticos: Penicilina G 100 U/ml y Estreptomicina 100 mcg/ml. Posteriormente se afora a un volumen de 1000 ml y se agita hasta disolver el polvo procurando no sobreagitar. El pH del medio se ajusta a 6.9 y se filtra con filtros Millipore (Millipore, U. S. A.) con un tamaño de poro de 22 micras. Finalmente el medio se almacena 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 periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato.

SALES	CONCENTRACION (g/l)
Cloruro de Sodio	8.0
Cloruro de Potasio	0.2
Fosfato Monoácido de Sodio	2.16
Fosfato Diácido de Potasio	0.2

Se diluyen las sales en 900 ml de agua bidestilada; en seguida se aforó a un volumen final de 1000 ml y esta solución se ajustó a un pH de 7.2 a 7.4. Se procedió a esterilizar la solución utilizándose filtros de membrana (Millipore, U. S. A.) 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 es una modificación de la fórmula original de Alsever.

Compuestos	Concentración (g/l)
Dextrosa	20.5
Citrato de Sodio Dihidratado	8.0
Acido Cítrico Monohidratado	0.55
Cloruro de Sodio	4.2

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.

7, BIBLIOGRAFIA

- 1.- Petit C. y Prevost G. 1970. Genética y Evolución. Ed. Omega. Barcelona.
- 2.- Fischberg M. y Blackler A. W. 1961. Como se especializan las células. En: La Célula Viva. 2^a edición. Ed. Blume. Barcelona.
- 3.- Dexter T. M., Spooncer E., Hendry J. and Lajtha L.G. 1978. Stem cells in vitro. En: Hematopoietic Cell Differentiation. Vol X. Academic Press.
- 4.- Evans W. H., Wilson S. M. and Alvarez V. 1984. A new assay for factor that regulate the synthesis of granulocyte differentiation proteins in vitro. J. Cellular Physiology. 118: 161-168.
- 5.- Wintrobe M. M. 1974. Clinical Hematology. Part II. The normal hematopoietic system. 7^a edición. Lea and Febiger. Philadelphia. USA.
- 6.- Chervenick P, A. et al. 1968. Quantitative studies of blood and bone marrow neutrophils in normal mice. Am. J. Physiol. 215: 353.
- 7.- Crick F. H. C. 1966. The Genetic Code. Sci. Am. 215: 55
- 8.- Dean A. C. R. and Hinshelwood C. 1964. Some basic aspects of cell regulation. Nature. 201: 232.
- 9.- Blackler A. W. 1966. The role of a "germinal plasm" in the formation of primordial germ cells in Rana pipiens. Dev. Biol. 14: 330-347.
- 10.- Collier J. R. and McCarthy M. E. 1981. Regulation of polypeptide synthesis during early embryogenesis of Ilyanassa obsoleta. Differentiation 19: 31-46.
- 11.- Illmensee K and Mahowald a. P. 1974. Transplantation of posterior polar plasm in Drosophila. Induction of germ cells at the anterior pole of the egg. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 1016-1020.

- 12.- Post J. and Hoffman J. 1968. Cell renewal patterns. New Engl. J. Med. 279: 248.
- 13.- Winkelstein A. and Boggs D. R. 1971. White Cell Manual. Seattle, University of Washington, Press
- 14.- Boggs D. R., Chervenick P. A. 1970. Hematopoietic stem cells. In: Formation and Destruction of Blood Cells. Eds T. J. Greenwalt G. A. Jamieson. Philadelphia: J. B. Lippincott Co.
- 15.-Till J. E. and McCulloch E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat Res. 14: 213. 1961
- 16.- Bradley T, R. 1968. Aspects of stimulation of bone marrow colony growth in vitro. Aust J. Exp. Biol Med. Sci. 46: 335.
- 17.- Chervenick P. A. and Boggs D. R. 1971. In vitro growth of granulocyte and mononuclear cells colonies from blood of normal individuals. Blood. 37: 131.
- 18.- Pike B. and Robinson W. A. 1970. Human bone marrow culture in agar Gel. J. Cell Physiol 76: 77.
- 19.- Boyum A. and Borgstrom R. 1970. The concentration of granulocyte stem cells in mouse bone marrow determined with diffusion chamber technique. Scand. J. Haemat. 7: 294.
- 20.- Becker A. J. et al 1963. Cytological Demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse bone marrow cells. Nature. 197: 452.
- 21.- Nowell P. C. and Cole L. J. 1967. Clonal repopulation in reticular tissues of X-irradiated mice: Effect of dose and limb shielding. J. Cell Physiol 70: 37.
- 22.- Philips R. A., Jones E. V., Miller R. G. 1978. Different potential of hematopoietic stem cells. In: Hematopoietic cell differentiation. Vol X. (Golde D. W.; Cline M.; Metcalf D.; Moore M. A.; eds.) p 129-131. Academic Press. New York.

- 23.- Bach J. F. 1978. Immunology. First edition. Wiley Medical, New York. p 72-76.
- 24.- Luriya E. 1979. Hematopoietic and Lymphoid Tissue in Culture. Bureaw, New York. p 44-61.
- 25.- Po"nka P., Cin'atl J. and Ne"cas E. 1978. A contribution to the technique of mouse bone marrow cell culture in semisolid agar. Folia Biol. (Praha) 24: 68-77.
- 26.- Sachs L. 1970. In vitro control of growth and development of hematopoietic cell clones. In: Regulation of Hematopoiesis. Cap. 10. Ed. Albert S. Gordon Appleton-Century-Crofts, New York. p. 217-230.
- 27.- Bol S, Engb G. V. D. and Visser J. 1977. A technique for staining hemopoietic colonies in agar cultures, Munksgaard, Copenhagen, Denmark, 75:551-553.
- 28.- Salmon F. S. and Buick N. R. 1979. Preparation of permanent slides of intact soft-agar colony cultures of hematopoietic and tumor stem cells. Cancer Res. 39: 1133- 1136.
- 29.- Pluznick D. and Sachs L. 1965. The cloning of normal - Mast cells in tissue cultures. J, Cell. Comp. 55: 319- 324.
- 30.- Bradley T. and Metcald D. 1966. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. J. Exp. Biol. Med. Sci. 44: 287- 299.
- 31.- Burges A. and Metcalf D. 1978. Purification and characterization of cell specific colony stimulating factor. In: Hematopoietic Cell Differentiation. Academic Press. New York.
- 32.- Burges A. W. and Metcalf D. 1980. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. Blood. 56: 947-958.
- 33.- Metcalf D. 1971. Acute antigen-induced elevation of se-

- rum colony stimulating factor (CSF) levels. Immun. 21: 427- 436.
- 34.- Metcalf D., Hohnson G. R. and Burges A. W. 1980. Direct stimulation by purified GM-CSF of the proliferation of multipotencial and erithroid precursor cells. Blood. 55: 138-147.
- 35.- Steward C. and Lin H. 1978. Macrophage growth factor and its relationship to colony stimulating factor. J. Reticuloendothel. Soc. 4: 269-281.
- 36.- Metcalf D. and Nicola N. A. 1983. Proliferative effects of purified granulocyte colony- stimulating-factor (G-CSF) on normal mouse hemopoietic cells. J. Cell Physiol. 116: 198-206.
- 37.- Lotem J. and Sachs L. 1984. Control of in vivo differentiation of myeloid leukemic cells. IV. Inhibition of leukemia development by myeloid differentiation-inducing protein. Int. J. Cancer. 33: 147-154.
- 38.- Shikita M. 1983. Effect of various immunomodulators on the production of granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in mouse spleen cell cultures. J. Pharmacobio. 6: 415-422.
- 39.- Metcalf D. and Foster R. 1967. Behavior on transfer of serum stimulated bone marrow colonies. Pro. Soc. Exp. Biol. New York. 126: 158.
- 40.- Stanley E., Robinson W. and Ada G. 1968. Properties of colony stimulating factors in leukemic and normal mouse serum. Exp. Biol. Med. Sci. 46: 757.
- 41.- Motoyoshi K., Takakuku F., Mizogouchi H. and Miuray Y. 1978. Purification and some properties of colony stimulating factor from normal human urine. Blood. 5: 1012.
- 42.- Cabrera P. G. 1984. Determinación de la masa molecular

- y pH isoeléctrico del factor inductor a la proliferación y diferenciación de macrófagos y granulocitos (MGI) contenido en medios con dicionados por una línea leucémica de tipo macrofágico. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. UNAM.
- 43.- Betz J. S. and Henson M. P. 1978, Macrophage stimulation by bacterial lipopolisacharides. II. Evidence for differentiation signal delivered by lipid A and by protein rich fraction of lipopolisacharides. J. Exp. Med. 148: 557-568.
- 44.- Lotem J., Lipton J. H. and Sachs L. 1980. Separation of different molecular forms of macrophage and granulocyte-inducing protein from normal and leukemic mieloid cells. Int. J. Cancer. 25: 763-771.
- 45.- Stanley E. 1978. Induction of macrophage production and proliferation by a purified colony stimulating factor. Nature. 274: 5667-5674.
- 46.- Broxmeyer H. E., Gentile P., Bognacki J. and Ralph P. 1983. Lactoferrin, transferrin and acidic iso ferritins regulatory molecules with potential therapeutic value in leukemia. Blood. 9: 83-105.
- 47.- Cline J. M. and Fitchen H. J. 1978. Inhibitors of granulopoiesis. In: Hematopoietic Cell Defferentiation. Ed. David W., Golde, Cline M. J., Metcalf D., C. Fred Fox. Academic Press. pp. 461-469.
- 48.- Fudenberg H. 1979. Manual de Inmunología Clínica. El Manual Moderno. México.
- 49.- Pink R. et al. 1971. Antibody variability. Ann. Rev. Med. 22: 145.
- 50.- Porter R. R. 1959. The hydrolysis of rabbit γ globulin and antibodies with crystalline papain. Biochem. J. 73: 119.
- 51.- Wintrobe M. M. 1974. Lymphocyte function. In: Clinical He-

- matology. Cap. 7th, 7th edition, Lea and Febiger. USA.
- 52.- Putnam F. W. et al. 1967. Structure and evolution of kappa and lambda light chains. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32: 9.
- 53.- Edelman G. M. et al. 1969. The covalent structure of an entire gamma G immunoglobulin molec. Proc. Nat. Acad. Sci. 63: 78.
- 54.- Fearon D. T. and Austen K. F. 1975. Properdin; initiation of the alternative complement pathway. Proc. Nat. Acad. Sci. 72: 3220
- 55.- Harpel P. C. and Cooper N. R. 1975. Studies on human plasma C1 inactivator-enzyme interactions. I. Mechanism of interaction with C1s, plasmin and trypsin. J. Clin Invest. 55: 593.
- 56.- Lachmann P. J. and Müller-Eberhard. 1968. The demonstration in human serum of "conglutinin Activating Factor" and its effect on the third component of complement. J. Immunol. 100: 691.
- 57.- Colten H. R. 1976. Biosynthesis of complement. Adv. Immunol. 22: 67.
- 58.- Lane B. C. et al. 1980. Structural evidence for distinct IgG subclass. Specific Fc receptors on mouse peritoneal macrophages. J. Exp. Med. 152: 1147.
- 59.- McKeever P. E. and Spicer S. S. 1980. Surface receptors of mononuclear phagocytes. In: The Reticuloendothelial System. Vol 1. Ed. Carr I. and Daems W. T. Plenum Press.
- 60.- Reynolds H. Y. 1982. Pulmonary host defenses in rabbits after immunization with Pseudomonas antigens: The interaction of bacteria, antibodies, macrophages and lymphocytes. J. Infect. Dis. 130: 5-134.
- 61.- Diamond B. et al. 1974. Site of binding of mouse IgG2b to the Fc receptor on mouse macrophages. J. Exp.

- Med. 150: 721.
- 62.- Knyszynski A. et al. 1977. Association and dissociation of aggregated IgG from rat peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* 145: 1368.
- 63.- Jancik J. M. and Schaver R. 1978. Sequestration of Neuraminidase-treated Erythrocytes. Studies on its topographic, morphologic and immunologic aspects. *Cell Tissue Res.* 186: 209.
- 64.- Schwartz R. H. et al. 1976. Studies of Ia antigens on murine peritoneal macrophages. *Scand. J. Immunol.* 5: 731.
- 65.- Wagner D. and Noltenius H. W. 1983. Clinical evaluation of the EA-rossette test in the early detection of cervical cancer. *Acta Cytologica.* 27: 4.
- 66.- Elner V. M., Hass A. J., Davis H. R. and Glagov Seymour. 1983. An avidin-biotin-peroxidase method for Fc receptors on macrophages isolated from and in sections of rat lung. *J. Histochemistry.* 31:9.
- 67.- Fornøsek L., Kopecek J. and Vetvicka. 1983. An advantageous method for detection of Fc-receptor and for studying Fc-receptor-mediated phagocytosis. *Immunology Letters.* 7: 29.
- 68.- Calcagno M., Pérez J. R., Waldo M. G., Cabrera G. and Weiss-Steider B. 1982. Evidence of the existence of a factor that induces Fc receptors on bone marrow cells. *Blood.* 59: 4
- 69.- Fragoso A., Arciga M. A., Calcagno M. and Weiss-Steider B. 1985. Determination of the inducers of Fc (FcRI) and C3 (C3RI) receptors on myeloid cells in several media from human and mouse origin, and the identification of the macrophage as the cell that produces these factors. *Exp. Hematol.* 13: 163-168.
- 70.- Gigli I. and Nelson Jr. R. A. 1968. Complement immune dependent Phagocytosis I. Requirements for C1, C4, C2, C3. *Exp. Cell Res.* 51: 45.

- 71.- Ward H. K. and Enders J. F. 1933. An analysis of the opsonic and tropic action of normal and immune sera based on experiments with Pneumococcus. J. Exp. Med. 57: 527.
- 72.- Bianco C., Eden A. and Cohn Z. A. 1976. The induction of macrophage spreading: role of coagulation factors and the complement system. J. Exp. Med. 144: 1531.
- 73.- Daughaday C. C. and Douglas S. D. 1976. Membrane receptors on rabbit and human alveolar macrophages. J. Reticuloendothel. Soc. 19: 37.
- 74.- Theofilopoulos A. N., Bokisch V. A. and Dixon F. J. 1974. Receptor for soluble C3 and C3b on human lymphoblastoid (Raji) cells. Properties and Biological significance. J. Exp. Med. 139: 696.
- 75.- Fearon D. T. 1980. Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leukocyte, B lymphocyte, and monocyte. L. Exp. Med. 152: 20- 30.
- 76.- Calcagno M., Ríos B., Fragoso A., Arciga M. A., Cabrera G., Torres R. and Weiss-Steider B. 1983. Evidence of the existence of a factor that induces C3 receptors on bone marrow cells. Blood. 61: 2.
- 77.- Leu R. W., Hefley S. M. and Herriott M. J. 1983. Decreased Fc and C3 receptor function in macrophage populations which are refractory to migration inhibitory factor, C3 activators, and immune complex. Cellular Immunology. 80: 31-42.
- 78.- Kávai M., Laczko J. and Csaba B. 1979. Functional heterogeneity of macrophages. Immunology. 36: 729.
- 79.- Beelen R. H. J. and Walker W. S. 1983. Dynamics of cytochemically distinct subpopulations of macrophages in elicited rat peritoneal exudates.

- Cellular Immunology. 82: 246.
- 80.- Territo M. and Cline M. J. 1976. Macrophages and their disorders in man. In: Immunobiology of the macrophage. pp. 593-616. Academic Press.
- 81.- Bennet B 1966. Isolation and cultivation in vitro of macrophages from various sources in the mouse. Am. J. Path. 48: 75-81.
- 82.- Carr I. 1973. The macrophage: a review of ultrastructure and function. Academic Press. London.
- 83.- Daems W. Th. et al. 1975. Peroxidatic activity in monocytes and macrophages. In: Immunity, Infection and Pathology. (R. van Furth, ed.) Blackwell, London.
- 84.- Allison A. C., Davies P. and dePetris S. 1971. Role of contractile microfilaments in macrophage movement and endocytosis. Nature. New Biol. 232: 153.
- 85.- Day A. J. 1964. The macrophage system, lipid metabolism and atherosclerosis. J. Atheroscler. Res. 4: 117.
- 86.- Werb Z. 1975. Macrophage membrane synthesis. In: Immunity, Infection and Pathology. (R. van Furth ed.) Blackwell London.
- 87.- Davies P. and Bonney R. J. 1979. Secretory products of mononuclear phagocytes; A brief review. J. Reticuloendothel. Soc. . 26: 1.
- 88.- Glenn K. C. and Ross R. 1981. Human monocyte-derived growth factor for mesenchymal cells; activation of secretion by endotoxin and concanavalin A. Cell. 25: 603.
- 89.- Martin B. M., Gimbrone M. A., Unanue E. R. and Cotran R. S. 1981. Stimulation of nonlymphoid mesenchymal cell proliferation by a macrophage-derived growth factor. J. Immunol. 126: 1510.
- 90.- Leslie C.C., Musson R. A. and Henson P. M. 1984. Prod-

- ction of growth factor activity for fibroblasts by human monocyte-derived macrophages. *J. Leukocyte Biology*, 36: 143.
- 91.- Padawer J. 1973. The peritoneal cavity as a site for studying cell-cell and cell-virus interactions. *J. Reticuloendothel. Soc.* 14: 462.
- 92.- Davis R. H. and McGowan L. 1968. Comparative peritoneal cellular content as related to species and sex. *Anat. Rec.* 162: 357.
- 93.- Forbes I. J. 1966. Mitosis in mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 96: 734.
- 94.- Daems W. Th. 1980. Peritoneal macrophages. In: *The Reticulo Endothelial System*. Vol 1. (Carr I., Daems W. Th. eds.) Plenum Press. USA.
- 95.- Monroy A. 1983. Activación de precursores mieloides para la producción de macrofagos y granulocitos peritoneales y la formación de receptores Fc. Tesis profesional. ENEP-Zaragoza. UNAM.
- 96.- Lin H. Peritoneal exudate cells, I Kinetics of appearance of colony-forming cells. *J. Cell. Physiol.* 84: 159.
- 97.- Daems W. Th. 1980. Pulmonary macrophages. In: *The Reticuloendothelial System*. Vol 1. (Carr I. and Daems W. Th. eds.) Plenum Press. USA.
- 98.- LaBelle C. W. and Brieger H. 1960. The fate of inhaled particles in the early postexposure period. II. The role of pulmonary phagocytosis. *Arch. Environ. Health.* 1: 423-427.
- 99.- Grant M. M., Sorokin S. P. and Brain J. D. 1976. Lysosomal enzyme activities in pulmonary macrophages from rabbits breathing iron oxide. *Am. Rev. Resp. Dis.* 113: 101.
- 100.- Adamson I. Y. R. and Bowden D. h. 1981. Dose response of the pulmonary macrophages system to various particulates and its relationship to trans-

- epithelial passage of free particles. *Exp. Lung Res.* 2: 165.
- 101.- Bowden D. H. 1973. The alveolar macrophage and its role in toxicology. *CRC. Crit. Rev. Toxicol.* 2: 95.
- 102.- Asbjørn M. N., Ottar M., Erling A. M. and Barbro M. G. 1984. Alveolar macrophages from expectorate samples: a stress signal from occupational pollution. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 32: 517.
- 103.- Brain J. D., Godlesky J. G. and Sorokin S. P. 1977. Lung biology in health and disease. Vol 5, Respiratory defense mechanisms (J. D. Brain, D. F. Proctor and L. Reid, eds.) Dekker. U.S.A.
- 104.- Novikoff P. M. et al. 1971. Golgi apparatus, Gerl, and lysosomes of neurons in rat dorsal root ganglia, studied by thick section and thin section cytochemistry. *J. Cell Biol.* 50: 859.
- 105.- Cohn Z. A. and Weiner E. 1963. The particulate hydrolases of macrophages. *J. Exp. Med.* 118: 991.
- 106a.- Ríos B. R. 1982. Estudios in vitro sobre el factor inductor a la formación de sitios receptores C3 (C3RI) en células de médula ósea. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. U.N.A.M.
- 106b.- Pérez E. R. 1981. Determinación de un factor inductor a la formación de receptores Fc en células de médula ósea. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. U.N.A.M.
- 107.- Cline M. J. 1975. Morphogenesis and production of monocytes and macrophages. In: *The White Cell*. Harvard University Press.
- 108.- Daems W. Th. 1980. Surface Receptors of mononuclear phagocytes. In: *The Reticuloendothelial System*. Plenum Press. U.S.A.
- 109.- Lay W. and Nussenzweig. 1968. Complement dependent receptor sites for antigen-antibody complex on macrophages, polymorphonuclear leukocytes and lymphocytes. *Fed. Proc.* 27: 621.
- 110.- Marín H. T. 1984. Determinación de la masa molecular de la molécula

- inductora a la diferenciación de macrófagos y granulocitos (MGI) producido in vitro por las células adherentes de la cavidad peritoneal de ratón e identificación del tipo celular que la produce. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. U.N.A.M.
- 111.- William N. and Pluznik D. 1978. Differences in the density Characteristics in murine granulocyte-Progenitor cells cloned in the presence of serum and/or hemolysate. *Exp. - Hemat.* 6: 383-396.
- 112.- Eagle H. 1955. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science.* 122: 501-504.
- 113.- Dulbecco R. and Vogt M. 1954. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* 99: 167
- 114.- Alsever J. B. and Ainslie R. B. 1941. A new method for the preparation of dilute blood plasma and the operation of a - complete transfusion service. *N. Y. State J. Med.* 41: 126.

A G R A D E C I M I E N T O S

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Benny Weiss Steider, por su asesoría y ayuda en la elaboración del presente trabajo.

Asímismo agradezco al Dr. Carlos García Moreira, al M. en C. Carlos Aguilar Ortigoza, a la Dra. Judith Márquez Guzmán y al Dr. Héctor Barbosa Nájera por la revisión de la tesis, así como por sus consejos y observaciones.

También quiero agradecer la valiosa ayuda técnica de los señores Ranulfo Pedraza y José Chavarría.