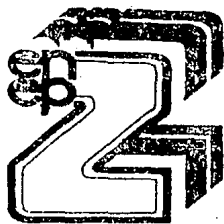


17  
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
" Z A R A G O Z A "

"EFECTO DE LINFOCITOS Y MONOCITOS  
DE MEDULA OSEA EN EL CONTROL DE  
LA PROLIFERACION DE CELULAS MIELOIDES"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A N:

MA. DE LOURDES MORA GARCIA

EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

MEXICO, D. F.

1987



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.

# INDICE

RESUMEN .....	1
ABREVIATURAS .....	2
INTRODUCCION	
Tejido Hematopoiético .....	4
Organos Linfáticos .....	6
Linfocitos .....	8
Macrófagos .....	14
Reguladores de la Hematopoesis .....	16
MATERIAL Y METODO .....	20
RESULTADOS .....	26
DISCUSION .....	53
APENDICES .....	59
BIBLIOGRAFIA .....	61

## RESUMEN

A partir de los estudios de Pluznik y Sachs en 1966 (1), se sabe de la existencia de un factor responsable de la inducción a la proliferación y diferenciación de células mieloides. Esta molécula llamada Inductor de Macrófagos y Granulocitos (MGI) ha sido ampliamente estudiada, de tal forma, que actualmente se conocen sus propiedades bioquímicas y se ha tenido éxito parcial en su purificación. Asimismo, se han encontrado muchas fuentes distintas de MGI, sin embargo, se sabe muy poco acerca de reguladores negativos de la proliferación de precursores mieloides. Recientemente, se han presentado evidencias del papel regulador inhibitorio de una serie de linfocitos T en médula ósea sobre la proliferación mieloides, principalmente en pacientes con anemia aplásica. Aquí reportamos evidencias experimentales del efecto inhibitorio por parte de estas células en médula ósea normal murina, así como el doble papel que desempeñan los monocitos en la regulación de la proliferación mieloides.

Se utilizó la técnica de cultivo en bicapa de agar para detectar el efecto de linfocitos T y monocitos sobre la proliferación en presencia y ausencia de MCP. La inhibición quedó de manifiesto en todos los casos ensayados al eliminar linfocitos T, ya que la proliferación se vio incrementada; en consecuencia, este resultado nos hace suponer que el linfocito T en médula ósea normal posee un efecto inhibitorio.

Por otra parte, también es interesante señalar el hecho de que al eliminar células con receptores Fc, las células precursoras de médula ósea respondieron mejor al MGI, siendo superior la proliferación que en los ensayos donde únicamente se eliminaron linfocitos T; en cambio al eliminar células adherentes y células con receptores Fc la respuesta fue menor en comparación a la mostrada por aquellos cultivos en donde únicamente se eliminaron linfocitos T y células adherentes. Pensamos que estos resultados revelan el doble papel que desempeñan los monocitos y macrófagos en el control de la proliferación mieloides.

Finalmente, se analiza la posible existencia de un factor de adherencia en el MCP, el cual facilita la fijación de células con esta característica en un lapso de media hora.

## ABREVIATURAS

CFU	=	Unidad Formadora de Colonias.
CFU-S	=	Unidad Formadora de Colonias de Células del Bazo.
CFU-GEMM	=	Unidad Formadora de Colonias de Granulocitos, Eritrocitos, Macrófagos y Megacariocitos.
CFU-GM	=	Unidad Formadora de Colonias de Granulocitos y Macrófagos.
CFU-EM	=	Unidad Formadora de Colonias de Eritrocitos y Megacariocitos.
Ig	=	Inmunoglobulina.
IgG, IgM, IgE	=	Inmunoglobulinas G, M, E, A y D.
IgA e IgD	=	
Fc	=	Fracción Cristalizable de la Ig.
Fab	=	Fracción Fijadora de Antígenos de la Ig.
H	=	Cadena Pesada de la Ig.
L	=	Cadena ligera de la Ig.
V	=	Fracción Variable de las Cadenas H y L.
C	=	Fracción Constante de las Cadenas H y L.
C3	=	Fracción 3 del Sistema del Complemento.
C3b	=	Fracción C3b del Sistema de Complemento.
Ta	=	Linfocitos T Amplificadores.
Th	=	Linfocitos T Auxiliares.
Tc	=	Linfocitos T Citotóxicos.
Td	=	Linfocitos T Desencadenadores de la Hiper-sensibilidad.
Ts	=	Linfocitos T Supresores de la Respuesta Inmune.
NK	=	Células Naturales Asesinas.
DNA	=	Acido Desoxiribonucleico.
MGI	=	Inductor a la Proliferación de Macrófagos y Granulocitos.
CSF	=	Factor Estimulador de Colonias.
CSA	=	Actividad Estimuladora de Colonias.
LPS	=	Lipopolisacárido.
MGI-1	=	Inductor a la Proliferación de Macrófagos y Granulocitos.
MGI-2	=	Inductor a la Diferenciación de Macrófagos y Granulocitos.
MGI-1M	=	Inductor a la Proliferación de Macrófagos.
MGI-1G	=	Inductor a la Proliferación de Granulocitos.
MGI-1MG	=	Inductor a la Proliferación de Macrófagos y Granulocitos.
PGE	=	Prostaglandina E.
ME	=	Medio Mínimo Esencial de Eagle.
ME 2X	=	Medio Mínimo Esencial de Eagle Doblemente Concentrado.
SAF	=	Solución Amortiguadora de Fosfatos.
SC	=	Suero de Caballo.
EC	=	Eritrocitos de Carnero.
MCP	=	Medio Condicionado de Pulmón.
T	=	Células Totales de Médula Osea.
L	=	Células Mononucleadas de Médula Osea.
E	=	Células Mononucleadas sin Linfocitos T de Médula Osea.
EA	=	Células Mononucleadas sin Células con Receptores para la Fc de la IgG.
EAC	=	Células Mononucleadas sin Células con Receptores

- para C3b.
- L+Lt = Co-cultivo de Células Mononucleadas más Linfocitos T, Eritrocitos de Carnero y Células Precursoras.
- L+LtI = Co-cultivo de Células Mononucleadas más Linfocitos T y Células Precursoras.
- LtI = Linfocitos T en Interfase.
- EN = Co-cultivo de Células Mononucleadas sin Linfocitos T más Células de Nódulos Linfáticos.
- EI = Co-cultivo de Células Mononucleadas sin Linfocitos T más Células de Timo.
- EB = Co-cultivo de Células Mononucleadas sin Linfocitos T más Células de Bazo.
- ES = Co-cultivo de Células Mononucleadas sin Linfocitos T más Células Mononucleadas de Sangre Periférica.
- T-Ø = Células Totales de Médula Ósea sin Células Adherentes (Monocitos).
- L-Ø = Células Mononucleadas sin Células Adherentes.
- E-Ø = Células Mononucleadas sin Linfocitos T y sin Células Adherentes.
- EA-Ø = Células Mononucleadas sin Células con Receptores Fc y sin Células Adherentes.

## INTRODUCCION

### TEJIDO HEMATOPOIETICO

La sangre es un tejido constituido por 45 % de células y 55 % de plasma, el plasma es el líquido intercelular y sirve de vehículo a los factores que regulan el mecanismo homeostático del organismo a través de la distribución de calor, gases, minerales, vitaminas, proteínas séricas y azúcares; asimismo regula el pH, tensión osmótica, temperatura y niveles hormonales (2, 3).

Las células circulantes en la sangre son los eritrocitos cuya función consiste en el transporte de oxígeno y dióxido de carbono, y los leucocitos que constituyen una línea de defensa del organismo contra agentes patógenos (4).

Las células sanguíneas se originan en la etapa embrionaria en el saco vitelino, posteriormente migran al hígado y bazo embrionario y finalmente se establecen en la médula ósea (2).

En la médula ósea se localiza el tejido hematopoiético (que es definitivo en la edad adulta) y está constituido por vasos sanguíneos, nervios, células libres y un trama celular (estroma) en toda la extensión de la médula, siendo en este medio estromal donde se localizan las células mesenquimatosas que darán origen a las diferentes líneas celulares. Por tanto, se considera que la médula ósea es un órgano linfo-reticulo-endotelial que interviene en la inmunidad celular y humoral (4, 5).

Una de las características de las células hematopoiéticas maduras es su continua generación y muerte subsecuente. Así, para

el mantenimiento de los niveles celulares normales es necesaria la existencia de un sistema de rápida generación y que la población regenerante permanezca a lo largo de la vida del organismo (6). La teoría más aceptada acerca del origen de las células es la teoría monofilética, la cual sostiene que sólo un tipo celular da origen a todas las líneas celulares maduras (7, 8).

Till y McCulloch (9), descubrieron que al transplantar células de médula ósea o de bazo de ratones sanos singénicos a otros letalmente irradiados o dañados con agentes tóxicos, algunas de estas células eran capaces de autoduplicarse y formar nódulos celulares en el bazo, constituidos por eritrocitos, granulocitos, monocitos, megacariocitos y células indiferenciadas. A las células con la capacidad de proliferación se le llamó CFU-S (del inglés Colony-Forming United-Spleen). De esta forma se pudo determinar las características de las células primordiales: autorrenovación, producción de progenie diferenciada, alta capacidad de proliferación y capacidad de autorregulación (6, 10).

Los trabajos posteriores sobre repoblación celular (10, 11), reportaron una distribución heterogénea de la CFU-S dependiendo del tiempo de incubación. De estos resultados se llegó a plantear la existencia de jerarquías en la CFU-S, en donde existe un sólo grupo de células con la capacidad de autorrenovación llamadas Celula Tallo o Célula Madre Pluripotencial, que puede diferenciarse a CFU-GEMM (CFU-Granulocitos, Eritrocitos, Monocitos y Megacariocitos), y dependiendo de los factores que estimulen a este grupo celular, se dará origen a colonias de macrófagos y granulocitos (CFU-GM), eritrocitos y megacariocitos (CFU-EM),



teniendo que cada paso en su diferenciación estará en relación inversa a su potencialidad de originar diferentes líneas celulares, hasta llegar a tener únicamente progenitores monopotentes como los pronormoblastos, promegacariocitos, mieloblastos y promonocitos, que llegarán a dar origen a las células eritroides, a los megacariocitos, a los granulocitos y monocitos respectivamente (12 , 13 , 14 , 15). En cuanto al origen de los linfocitos se ha planteado, que su línea se separa directamente de la célula madre pluripotencial (13), pero trabajos más recientes indican que pueden provenir de la CFU-GEMM (16).

Se han obtenido grandes avances en los conocimientos de los fenómenos que caracterizan a la hematopoiésis gracias al desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos y en especial de las técnicas de cultivo de médula ósea en agar introducidos por Fluznik y Sachs en 1965 (17) y Bradly y Metcalf en 1966 (18), las cuales han permitido la investigación acerca de los factores que intervienen en la regulación del proceso hematopoiético, ayudando también a comprender la biología básica de la diferenciación celular, la patogénesis de las enfermedades hematológicas y la biología del trasplante medular (6 , 19 , 20).

## ORGANOS LINFATICOS

El sistema linfático es un sistema de circulación cerrada, su función es la de auxiliar al torrente sanguíneo en la evacuación del líquido histico. Además, es un medio por el cual salen a la circulación sanguínea los linfocitos, que son unidades del sistema inmunitario y están diseminadas por todo el organismo, como células aisladas y como agregados difusos en el interior de

los órganos linfoides (3). Dadas sus características el sistema linfático se puede dividir en dos grupos: los órganos linfoides centrales que incluye a la médula ósea y el timo, donde por mecanismos completamente ajenos a la estimulación antigénica, las células precursoras proliferan y se diferencian en linfocitos, y los tejidos linfáticos periféricos que comprenden a los nódulos linfáticos y el bazo, donde el desarrollo linfoide es dependiente del antígeno (21).

Como se mencionó anteriormente la médula ósea es el sitio de origen de las células hematopoiéticas. Por otra parte, crea un microambiente protector en el que las células inmunes pasan por la etapa proliferativa (21).

El timo es un órgano formado por dos lóbulos localizados en la región ventral de la cavidad torácica y en la parte inferior del cuello (3, 4). Los lóbulos están constituidos de una corteza y la médula, demarcación que establece diferentes porciones de linfocitos en cada una (21). Al parecer los linfocitos que se producen por mitosis en los lóbulos pasan a la médula en donde se diferencian aún más y luego migran del timo (22).

En la mayoría de las especies de mamíferos, el timo se desarrolla casi por completo antes del nacimiento (3, 21), siendo su principal función la producción de linfocitos T inmunocompetentes por modificación y proliferación de los linfocitos básicos producidos durante la linfopoesis (4, 23).

Por su lado, los nódulos o ganglios linfáticos son estructuras encapsuladas de forma oval que están intercalados como filtros biológicos, su tamaño varía desde 1 mm hasta aproximadamente 1 cm de diámetro (8). Los ganglios linfáticos se encuentran rodeados de tejido conectivo y son atravesados por los

vasos linfáticos aferentes y eferentes. En el interior de los ganglios linfáticos se localiza una red de fibras reticulares que forman un soporte para los linfocitos, los cuales se encuentran agrupados y forman prolongaciones llamadas cordones medulares (24). La principal función de los ganglios linfáticos es la de actuar como filtros biológicos inespecíficos gracias a la actividad fagocitaria de los macrófagos (22 , 24).

En relación al bazo, es un órgano localizado debajo del diafragma, detrás y a la izquierda del estómago, recibiendo una buena vascularización a través de una arteria esplénica y la drena por medio de la vena esplénica hacia el sistema porta-hepático (25). El bazo está cubierto de tejido conectivo, el cual forma trabéculas y entre los espacios de estas se encuentran incluidas la pulpa blanca que está formada por corpúsculos de Malpighi, que son folículos linfáticos, y la pulpa roja que está constituida por un amplio seno poscapilar (4 , 8). El bazo realiza las siguientes funciones: producción de linfocitos, almacenamiento de plaquetas y filtración de la sangre (3 , 4).

## LINFOCITOS

Los mamíferos han desarrollado tres mecanismos de defensa contra los agentes patógenos: la piel y mucosas, las cuales son barreras pasivas; un sistema de defensa activo inespecífico dado por los macrófagos y los granulocitos y finalmente un sistema de defensa específico que es realizado por el llamado sistema inmunológico (26).

Los linfocitos son las células funcionales del sistema inmunológico. El tamaño celular es variable y se clasifican en

tres grupos: los linfocitos pequeños, de 8 a 10 micras de diámetro, se caracterizan al ser teñidas con colorante Giemsa por tener un núcleo redondo u ovalado con ligeras indentaciones y cromatina densa, el citoplasma es escaso y apenas sobresale del núcleo por uno de los bordes de un color azul oscuro. El linfocito mediano, que mide de 10 a 12 micras de diámetro, el núcleo es menos denso y tiene mayor cantidad de citoplasma el cual se tiñe de un color azul pálido. Finalmente el linfocito grande mide de 12 a 16 micras de diámetro, su citoplasma es abundante de color azul grisáceo con finos gránulos azurófilos y el núcleo es mucho menos denso a los anteriores y puede ser localizado excéntricamente (2, 25).

Los linfocitos tienen su origen en la médula ósea al igual que las demás células sanguíneas, originándose en forma de células pre-B o pre-T (27).

Las células pre-B adquieren las características de linfocitos B en la médula ósea y las pre-T migran al timo en donde adquieren características de linfocitos T maduros independientemente de estímulos antigénicos. Posteriormente los linfocitos B y T abandonan estos tejidos para poblar a los órganos linfáticos secundarios en los cuales entrarán en contacto con los estimulantes antigénicos, diferenciándose hacia células efectoras (25, 26).

El linfocito B en presencia de un antígeno, se diferencia hacia una célula plasmática que se caracteriza por la secreción de inmunoglobulinas (Ig), dando con ello una respuesta humoral. Existen cinco clases de inmunoglobulinas y cada una de ellas es producida por un grupo o clon específico de células plasmáticas que se derivan de linfocitos estimulados exclusivamente para

ello. De esta forma existen cuatro subtipos de linfocitos B antígeno-dependiente: los linfocitos  $B_{\mu}$ ,  $B_{\gamma}$ ,  $B_{\epsilon}$  y  $B_{\alpha}$  que presentan en su membrana IgM, IgG, IgE e IgA respectivamente. Todas estas células provienen de un linfocito B más indiferenciado el cual se caracteriza por presentar IgM e IgD en su membrana (26).

Los linfocitos T localizados en el timo adquieren madurez reconocida por la aparición de diversos receptores de superficie, como los receptores de eritrocitos (rosetas E) y receptores de la Fc de la IgG (28, 29, 30). De esta forma se han caracterizado funcionalmente cinco tipos de linfocitos T: los linfocitos T amplificadores ( $T_a$ ), linfocitos T auxiliares ( $T_h$ ), linfocitos T citotóxicos ( $T_c$ ), linfocitos T desencadenadores de la hipersensibilidad retardada ( $T_d$ ) y los linfocitos T supresores de la respuesta inmune ( $T_s$ ) (26, 29).

Cabe mencionar que dentro de las poblaciones de los linfocitos T se han incluido también a las células asesinas naturales (NK) (31, 32).

La respuesta inmunológica se desencadena cuando las células accesorias como los macrófagos detectan y presentan los antígenos a los linfocitos T, específicamente a  $T_h$  y  $T_a$ , quienes bajo esta influencia proliferan y se diferencian en sus formas efectoras. Así, los linfocitos  $T_h$  activados interactúan con los linfocitos B en presencia del antígeno induciéndoles a proliferar y diferenciarse a células plasmáticas. Los linfocitos  $T_a$ , de la misma manera activan y estimulan la proliferación y diferenciación de los linfocitos  $T_c$ , quienes destruyen a las células que engloban a los antígenos a través de una interacción célula-célula. Por su parte los linfocitos  $T_d$  ayudan a mantener a

los antígenos en el sitio de la invasión y desencadenan la respuesta inflamatoria (26 , 32).

Los productos secretados por las poblaciones linfoides que median las respuestas inflamatorias son: factores quimiotácticos de macrófagos, factores inhibidores de la migración de macrófagos, factores de proliferación tanto de linfocitos como de precursores de médula ósea, linfoquinas, gama-interferón, factores de transferencia además de las inmunoglobulinas (26 , 30, 33).

Las inmunoglobulinas son moléculas que se unen específicamente al antígeno que propició su síntesis, de esta forma precipitan o son detectadas por las células encargadas de la destrucción del agente extraño.

Esta molécula tiene una unidad estructural básica formada por cuatro cadenas polipeptídicas (Figura 1). Dos cadenas pesadas (H) unidas por dos puentes disulfuro y dos cadenas ligeras (L). Las cadenas L se unen a la porción amino terminal de las dos cadenas H, dando origen a una fracción fijadora de antígenos (Fab) y el resto de la cadena H es la fracción cristalizante (Fc). El extremo de las cadenas L y H se dividen en dos secciones: una fracción variable (V) y una constante (C). La fracción variable tiene una secuencia diferente de aminoácidos dependiendo de la clase de anticuerpo y del sitio de combinación con el antígeno. La fracción Fc de la cadena H también tiene regiones C, y en base a las diferencias antigénicas de estas regiones se dan las cinco clases de Ig ya mencionadas (34).

Aparte de las Ig, existe un grupo de proteínas séricas que intervienen en la respuesta inmune, llamado el sistema del complemento. Este sistema lo constituyen aproximadamente 15

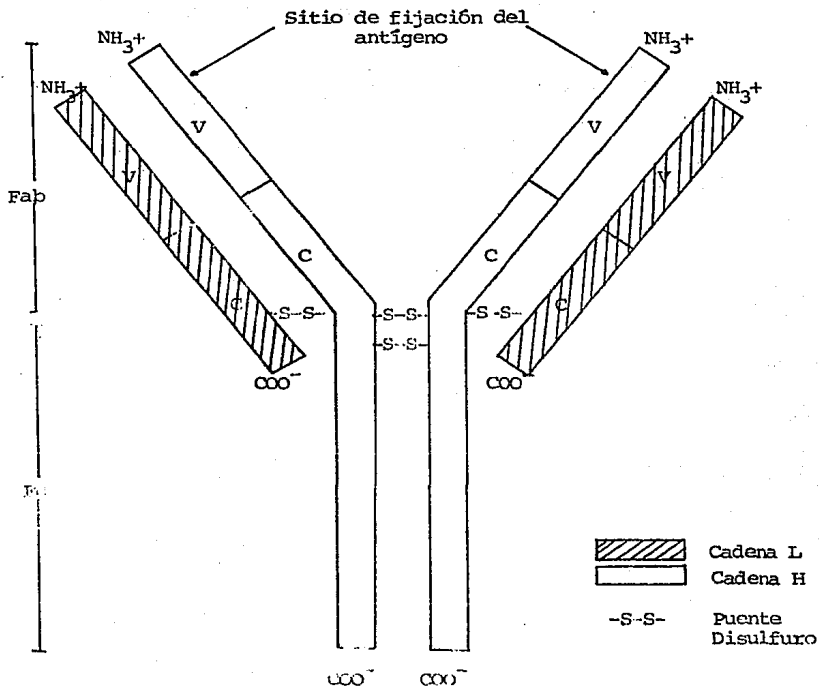


Fig. 1. Unidad básica de una inmunoglobulina. Las cadenas H unidas por dos puentes disulfuro (región de la bisagra) y consta de una región -- variable (V) y una constante (C). Las cadenas L se unen a las H --- por un puente disulfuro, también cuentan con una región V y una C. Fab (fracción fijadora de antígenos). FC (fracción cristalizante).

proteínas química e inmunológicamente diferentes, las cuales actúan de manera recíproca unas con otras, con el anticuerpo y con las membranas celulares. Las moléculas del complemento circulan en la sangre en forma inactiva, se les designa con un número: C1, C2, C3,... C9 o con nombres triviales como Properdina, Factor B, Factor D, Factor A y B1H (32). A partir del tercer componente (Fracción C3), se adhiere de forma secuencial los productos del complemento, constituyendo una cadena sobre algún agente infectante, generando un sitio reactivo que tiene afinidad para algunos receptores sobre los macrófagos y así torna al microorganismo más susceptible de ser fagocitado (35). Existen dos vías de activación del complemento, la vía clásica y la alternativa o vía de la properdina. La vía clásica puede ser activada por complejos antígeno-anticuerpo o inmunoglobulinas agregadas de la clase IgG e IgM, también la pueden iniciar el DNA, membranas celulares y enzimas semejantes a la tripsina (13, 32). La vía de la properdina se activa inmunológicamente por la IgA, IgG e IgE o por estímulos como los complejos polisacáridos, lipopolisacáridos y enzimas semejantes a la tripsina (13, 32, 36).

En la actualidad la presencia de receptores Fc de la IgG es evaluada principalmente por el ensayo de rosetas, en donde eritrocitos xenogénicos son cubiertos con anticuerpos (EA) (37, 38, 39). La actividad del receptor Fc se manifiesta por la adhesión de eritrocitos a la superficie de la membrana de las células que presentan estos receptores (linfocitos T y B, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares), formando una configuración llamada roseta (26, 40, 41).

En forma análoga se pueden evaluar receptores para C3b en



diferentes células mediante la técnica de rosetado, la cual se realiza en forma sencilla empleando eritrocitos sensibilizados con inmunoglobulina y posteriormente suero para favorecer la incorporación de la fracción C3b del componente al EA formando EAC (42). Las células que se han caracterizado por poseer los receptores C3b son los eritrocitos, leucocitos polimorfonucleares, linfocitos B y macrófagos (43).

#### MACROFAGOS

Como anteriorente se mencionó, las células madres pluripotenciales son las precursoras de todas las líneas celulares hematopoiéticas que se originan en la médula ósea, estas células dan origen a las células madres comprometidas, que en su oportunidad originarán a los monocitos (44).

Los monocitos y macrófagos son células que se encargan de la defensa inmunológica inespecífica del organismo, a través de la fagocitosis (45), e intervienen como células accesorias en la respuesta inmune mediada por los linfocitos T y B (25, 46).

La célula más inmadura de esta línea celular que es reconocible morfológicamente son los promonocitos, los cuales tienen un diámetro de 10 a 18 micras y su capacidad fagocitaria esta escasamente desarrollada. Los monocitos son los elementos circulantes de los fagocitos mononucleares, tienen un diámetro aproximado de 12 a 20 micras, son muy móviles y fagocíticos (47). Una vez que los monocitos salen del torrente sanguíneo y entran al tejido, si permanecen viables, entonces madurarán hacia macrófagos (48, 49). Estas células pueden alcanzar un tamaño de 100 micras de diámetro, siendo muy eficientes en la fagocitosis y

bastante móviles (47).

En preparaciones teñidas con Giemsa, se ha podido encontrar que el monoblasto es difícil de diferenciarlo de los mieloblastos y de las células más primitivas, posee un citoplasma pequeño ligeramente basófilo y contiene escasos gránulos azurófilos. El núcleo es redondo u ovalado con pequeñas indentaciones con uno o dos nucleólos. El promonocito tiene características semejantes, pero con núcleo irregular, usualmente concaovalado y no se observan nucleólos. El monocito tiene un núcleo por lo general en una posición central de forma arriñonada con ligeras indentaciones, puede también presentar dobleces sobre si mismo y no tiene nucleólos visibles. El citoplasma se tiñe de azul grisáceo con finos gránulos azurófilos y en algunos pueden aparecer vacuolas (2, 7). El macrófago es más grande que el monocito, el núcleo puede ser oval o indentado y los nucleólos pueden ser visibles. El citoplasma muestra muchas vacuolas y gránulos densos localizados principalmente alrededor del núcleo. Los macrófagos muestran numerosos pseudopodios y en ellos muchas mitocondrias (2, 44).

Los fagocitos mononucleares en respuesta a su ambiente pericelular secretan enzimas hidrolíticas, ácido araquidónico y productos de oxigenación (prostaglandina E y F), moduladores del comportamiento celular (CFS, factores estimuladores e inhibidores de linfocitos y leucocitos polimorfonucleares), sustancias citotóxicas como el interferón y compuestos del complemento (50).

Debido a la existencia de ciertos receptores localizados en la membrana celular de los fagocitos mononucleares es posible que se fijen y se puedan ingerir partículas opsonizadas y complejos macromoleculares. Así, los receptores de superficie se han

determinado que son exclusivamente para proteínas inmunológicas: IgG, IgE, IgA e IgM (receptores Fc) y componentes del complemento (receptores C). La eficiencia de la mediación de los receptores Fc se ve incrementada por la participación de los receptores del complemento (51, 52).

#### REGULADORES DE LA HEMATOPOIESIS

El cultivo de las células hematopoiéticas in vitro, ha hecho posible el estudio de los reguladores positivos y negativos que intervienen en la proliferación y diferenciación de las células mieloides (13, 53). Dentro de los controles positivos se encuentra el MGI (por sus siglas en inglés, Macrophage and Granulocyte Inducer) (54), que estimula la proliferación de precursores hematopoiéticos a la formación de macrófagos y granulocitos (20). A esta proteína se le ha denominado de diferentes formas: CSF (Colony Stimulating Factor) (55) y CSA (Colony Stimulating Activity) (56). Los MGI pueden ser proteínas o glicoproteínas, dependiendo de las células en que se hayan producido (15, 57), asimismo es elaborado y secretado por células malignas y normales, tanto in vivo como in vitro; además su producción puede ser inducida por agentes tales como Lipopolisacárido bacterianos (LPS), así como por endotoxinas como el zymosan, glucan, derivados proteínicos purificados, Mycobacterium Bacillus Calmette-Guerin, tuberculina y forbol miristato, entre otros (21, 58, 59). Por otro lado, se ha encontrado que existen MGI con pesos moleculares desde 20 000 hasta más de 200 000 daltones pasando por una gran cantidad de valores intermedios; al parecer dependiendo del órgano del cual

se obtenga (52 , 60 , 61 , 62).

Aparte de la gran heterogeneidad encontrada para los pesos moleculares del MGI, las funciones que se le han asignado a estas moléculas son muy variadas, por ejemplo (53), se supone que hay MGI que induce a la formación de colonias de macrófagos y granulocitos llamada MGI-1 y el que induce a la diferenciación de células precursoras mieloides llamada MGI-2. Además se supone que hay tres formas de MGI-1: MGI-1M que induce la formación de macrófagos, MGI-1G induce la formación de granulocitos y MGI-1MG que induce la formación de macrófagos y granulocitos (15 , 21).

Como se ha descrito, el MGI es un factor de activación de la hematopoiésis y su efecto esta regulado por factores inhibidores, se han detectado que algunos de ellos son lipopolisacáridos localizados en los sueros de humano y ratón, tanto en estado normal como patológico (63).

También se ha encontrado que algunas células hematopoiéticas maduras inhiben la generación de más células maduras. Tal es el caso de los granulocitos que son capaces de inhibir la proliferación de la CFU de sangre periférica (64). Los productos de estas células como la lactoferrina y algunos derivados semejantes a las chalconas, afectan la producción y liberación de MGI (20 , 65 , 66).

Algunos autores (67 , 68 , 69 , 70), han encontrado que los linfocitos T de médula ósea suprimen la proliferación de los precursores hematopoiéticos en pacientes con anemia aplástica. Estos resultados se han confirmado, ya que al tratar a pacientes con agentes inmunosupresores muestran una parcial o total recuperación (71 , 72 , 73 , 74). En individuos normales se ha detectado la presencia de linfocitos T supresores de la

hematopoesis, pero aún existe controversia acerca de la activación de estas células. Spitzer y Verna (29) y Barr y Stevens (75), reportan que se presenta naturalmente mientras que Bacigalupo et al. (76) encuentran que necesitan de la estimulación de agentes mitogénicos para que se manifieste su actividad.

Se cree que los linfocitos T supresores juegan un papel muy importante en la hematopoesis como un factor regulador (75, 76). Estas células se han caracterizado fenotípicamente por presentar receptores para anticuerpos monoclonales Leu-2a+ (28), OMT8+ (77), receptores para eritrocitos (E+) y receptores para la Fc de la IgG (67, 75).

Por otro lado, se ha reportado que los macrófagos regulan únicamente la producción de células eritroides (78). Otros autores (79, 80, 81), indican que inhiben su propia producción a través de la elaboración y secreción de prostaglandina E (PGE).

Tal como se ha descrito, es notoria la discrepancia acerca del papel que juegan las células maduras en la regulación negativa de la hematopoesis. Por ello se creyó conveniente evaluar el papel regulador de los linfocitos T y de los macrófagos en la hematopoesis en células de médula ósea murina, con la intención de contribuir al esclarecimiento de los mecanismos que regulan la proliferación de las células mieloides.

Para lo cual fue necesario en primer lugar, optimizar la técnica de cultivo en agar con la finalidad de homogenizar resultados. Posteriormente se detectó la presencia de linfocitos T supresores en la proliferación celular utilizando un sólo ratón por experimento, de igual forma mezclando las células de la

médula de varios ratones. Por otra parte, también consideramos conveniente determinar si en otros órganos linfáticos se encuentran linfocitos T supresores. Finalmente, se evaluó la inducción a la proliferación de precursores de médula ósea por el MGI, en ausencia de células con receptores para E, EA, EAC, así como de células adherentes.

## MATERIAL Y METODO

MATERIAL BIOLÓGICO.- Para la realización de este trabajo se utilizaron ratones hembra de la cepa CN-1 de 6 a 12 semanas de edad.

CONDICIONES DE CULTIVO.- Se trabajó en una campana de cultivo que previamente había sido limpiada con alcohol al 70 % ó isodine (Norwich Co. Méx.) y esterilizada durante 20 min con luz ultravioleta, asimismo, todo el material de cristalería se esterilizó previamente en autoclave.

Para el cultivo in vitro de las células de médula ósea se utilizaron cajas petri de vidrio (Pyrex, USA) y de plástico (Durango Vela, Méx.) de 60 x 15 mm, las células sembradas se mantuvieron en una incubadora con una temperatura de 37°C y una atmósfera de 10 % de CO<sub>2</sub> en aire y humedad saturante. El medio que se utilizó fue el Medio Mínimo Esencial de Eagle (ME) (Gibco, USA) (Apéndice 1), al que se le agregó 3.7 g/l de Carbonato de Sodio y antibiótico (Penicilina G 100 UI/ml y Estreptomocina 100 mg/ml), ajustado a un pH de 7.2 y filtrado para fines de esterilidad con filtros de membrana (Millipore, USA) con un poro de 0.22 micras de diámetro. El medio estéril se mantuvo en el refrigerador a 4°C hasta el momento de su uso. Para el cultivo de células se empleó ME suplementado con 10 ó 20 % de suero de caballo (SC) (Gibco, USA. y Microlab, Méx.), previamente desactivado a 56°C por 30 min, y almacenado a -20°C.

Para mantener a las células en condiciones fisiológicas

estables por periodos cortos de tiempo, se utilizó una Solución Amortiguadora de Fosfatos (SAF) (Apéndice 2). Esta solución se ajustó a un pH de 7.2 y se esterilizó con un filtro de membrana con poros de 0.22 micras de diámetro y se almacenó a 4°C .

Con un microscopio invertido (American Optical, USA) se observó el estado de las células así como la proliferación de las mismas en base a grupos y colonias formadas.

**PRUEBAS DE ESTERILIDAD.** - Para probar la esterilidad de los medios y soluciones empleados en nuestros cultivos, se colocó una gota en un tubo de ensaye conteniendo 2 ml de Caldo de Soya Trypticaseína al 3 %, o caldo de Sabouraud (Bioxon, Méx.) (previamente esterilizados en autoclave) agitándose e incubándose por 48 hr a 37°C, al término de las cuales se observó la posible existencia de microorganismos contaminantes.

**OBTENCION DE CELULAS DE MEDULA OSEA .-** Se sacrificaron los ratones por descervicación, se extrajeron los fémures los cuales se colocaron en una caja de petri con ME. A los fémures se les perforó ambas epifisis y con la ayuda de una jeringa de 1 ml, se les hizo fluir ME de un extremo a otro para extraer todas las células de la médula, se colectaron las células en tubos de ensaye para posteriormente lavarlas tres veces con SAF mediante centrifugación a 800 gravedades (G) por 3 min. La cantidad de células obtenidas se determinó por conteo en un hemocitómetro (American Optical, USA), obteniéndose las células Totales (T).

Para obtener las células mononucleadas (L), se utilizó un medio de separación de leucocitos, en este caso se usó un gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical, USA) con densidad de



1.077 g/ml, se colocó la muestra en este gradiente y después de centrifugarse por 30 min a 500G, se recuperaron únicamente las células de la interfase, las cuales se lavaron con ME. El número de células obtenidas se determinó por conteo en un hemocitómetro.

TECNICA DE ROSETAS E .- Se obtuvieron eritrocitos de carnero (EC) en Solución de Alsever (Apéndice 3) en proporción 1:1, los cuales son mantenidos por 7 días a 4° C antes de su uso, no deben emplearse en esta técnica EC después de 5 semanas de extraídos. Para activar los EC, se lavaron 3 veces por centrifugación a 800G por 3 min en SAF, se les agregó 1 /ml de neuraminidasa (Sigma Chemical, USA) y se incubaron a 37° C por 30 min, finalmente se procedió a lavarlas con SAF otras 3 veces. A las células blancas a ser ensayadas se les agregó 0.2 ml de los EC activados, se centrifugaron a 800G por 3 min y se incubó el botón a 37° C durante 30 min. Posteriormente, se resuspendió suavemente el botón de células, se colocó la muestra en un gradiente de Ficoll-Hypaque con densidad de 1.077 g/ml y después de centrifugar a 500G por 30 min, se recuperaron únicamente las células de la interfase, obteniéndose de esta manera solamente células mononucleadas sin linfocitos T (E). Por último, se lavaron con SAF centrifugándose a 500G por 10 min y el número de células obtenidas se evaluó en un hemocitómetro.

PREPARACION DE LA DILUCION DE INMUNOGLOBULINA G (IgG).- Se diluyó inmunoglobulina G (7s, IgG, Cordis Labs, USA) en SAF a 1 : 1600. Se almacenó esta solución en tubos de ensaye colocando 2 ml por cada tubo y manteniéndose en congelación hasta el momento de su uso. La dilución de IgG una vez descongelada no se utilizó

posteriormente por lo cual se desecho el excedente.

**PREPARACION DE ERITROCITOS OPSONIZADOS CON ANTICUERPO (EA).**  
Para opsonizar los EC, primero se lavaron con SAF 3 veces centrifugándose cada vez a 800G durante 3 min, después por cada ml de eritrocitos se agregaron 4 ml de SAF añadiéndose un volumen igual de IgG. Esta mezcla se resuspendió y se incubó a 37°C por 30 min. Pasado este tiempo se lavaron 3 veces con SAF y se resuspendió el botón en 4 ml de SAF almacenándose a 4°C.

**ORTENCION DEL SUERO DE RATON.-** Se sacrificó el ratón dejando al descubierto la cavidad cardíaca, se seccionó el corazón y se procedió a colectar toda la sangre en un tubo de ensaye con la ayuda de una pipeta de 2ml. La sangre colectada se mantuvo a temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente se mantuvo una hora en el refrigerador en un vaso de precipitado con agua. Pasado este tiempo, se despegó con mucho cuidado el coágulo de las paredes del tubo y se centrifugó a 1000G por 15 min. Finalmente el suero se recolectó en otro tubo. El suero obtenido de esta manera y diluido 10 veces en SAF (1:10) se usó para la preparación de eritrocitos opsonizados con anticuerpo y complemento.

**PREPARACION DE ERITROCITOS OPSONIZADOS CON ANTICUERPO Y COMPLEMENTO (EAC).-** Se mezclaron partes iguales de eritrocitos sensibilizados con anticuerpo y suero de ratón al 10 %, se resuspendieron y se incubaron a 37°C por 30 min. Después se lavaron 3 veces con SAF a 800G. Por último se resuspendió el botón en un tubo de ensaye con 2 ml de SAF, almacenándose en el

refrigerador a 4 °C introduciendo el tubo en un vaso de precipitado con agua.

TECNICA DE ROSETADO EA Y EAC.- Después de haber obtenido células mononucleadas, se dividieron en partes iguales en dos tubos y se les agregó 0.2 ml de EA y EAC respectivamente, se formó un botón centrifugándose a 800G durante 3 min, incubándose a 37 °C por 30 min. Después de transcurrido este tiempo, se resuspendió suavemente el botón de cada tubo y se pusieron por separado en un gradiente de Ficoll-Hypaque centrifugándose a 500G por 30 min, se colectaron únicamente las células de la interfase, obteniéndose células no formadoras de rosetas EA y EAC. Finalmente se lavaron con SAF centrifugándose a 500G por 10 min, para ser contadas posteriormente en un hemocitómetro.

MEDIO CONDICIONADO DE PULMON.- Para su obtención se inyectaron ratones con un volumen de 0.1 ml de SAF conteniendo 5 microgramos de lipopolisacáridos (LPS) de Salmonella typhimurium (Sigma Chemical, USA) por vía intravenosa. Después de 3 horas se sacrificaron por descervicación, se les extrajeron los pulmones y se colocaron en tubos cónicos de plástico con 7 ml de ME, dejándose incubar por 48 hr. Para obtener el MCP, se centrifugó a 1000G por 15 min y se extrajo el sobrenadante que se sabe es rico en MGI (B2), almacenándose a -20° C. Rutinariamente se efectuaron pruebas de esterilidad.

TECNICA EN RICAPA DE AGAR.- Esta técnica consta de dos capas de agar sobrepuestas en una caja de cultivo. Para la primera capa se preparó agar (Bacto Agar, USA) al 3 % en agua bidestilada, y

se esterilizó en autoclave durante 15 min, posteriormente se mantuvo a una temperatura de 52 °C, se mezcló con 20% de ME, 20% SC, 20% MCP y 20% ME doblemente concentrado (2X), obteniendo un e volumen final de 5 ml en cada Caja de Petri. Se esperó que transcurrieran 20 min para facilitar la gelificación antes de agregar la segunda capa de agar. La segunda capa se preparó utilizando agar al 1.83 % en agua bidestilada, se colocaron 300 mil células de médula ósea en ME, en esta capa se utilizó 10% de SC, 50% de ME conteniendo las células hematopoiéticas, 20 % de ME 2X y 20 % de agar. Después de colocar la segunda capa se esperaron 20 min para que se gelificara. Posteriormente, se incubaron por un periodo de 7 días. Se consideró como colonia cuando estaba formada de más de 30 células, y grupos cuando existían de 8 a 29 células.

CONTROL POSITIVO Y NEGATIVO.- Para cada experimento se sembró un control sin MCP que se le denominó control negativo. Igualmente se sembró un control positivo que contenía un 20 % de MCP. Los experimentos se realizaron un mínimo de dos veces y cada uno de ellos por duplicado.

## RESULTADOS

## OPTIMIZACION DE LA TECNICA DE CULTIVO EN BICAPA DE AGAR A LAS CONDICIONES DE LABORATORIO.

Con la finalidad de determinar las condiciones óptimas para llevar a cabo la técnica de cultivo en bicapa de agar, se procedió en primer término a comparar la respuesta de proliferación presentada por dos tipos de suero de caballo, uno nacional y otro importado. Para ello se utilizaron células Totales (T) de médula ósea murina cultivadas en presencia de MGI. Se encontró que en los cultivos con suero nacional, la proliferación fue semejante e incluso mayor a los cultivos con suero importado, sobresaliendo el lote BB nacional en relación al suero importado con 432 , 455 y 396 , 296 col/caja respectivamente [tabla 1].

Por otro lado, también consideramos conveniente determinar la cantidad de medio condicionado de pulmón (MCP) necesario emplear para inducir a la proliferación celular de tal forma que se obtuviera una buena respuesta, y que no resultara insuficiente ni tampoco tóxico para las células. Para ello se emplearon 0.25, 0.5 y 1 ml (cantidades determinadas en ensayos previos) de MCP en cultivo de células T de médula ósea. Los resultados obtenidos indican una elevada heterogeneidad entre los distintos ensayos, sin embargo, se observa que con 1.0 ml de MCP se obtuvo en un ensayo 980 y en el otro 458 en tanto que con 0.25 ml, 542 y 202 col/caja en el primer y segundo ensayo respectivamente [tabla 2].

TABLA 1

Ensayos Tipo de Suero	1		2	
	(+)	(-)	(+)	(-)
SC Importado	396	0	296	0
SC BB País	432	0	455	0
SC AA País	500	0	244	0
SC País Refiltrado	430	0	211	0

Cultivo de células de médula ósea total (T) para determinar la eficiencia del SC importado y del país en la proliferación celular.

(+), número de colonias en experimentos con MGI  
 (-), número de colonias en experimentos control

TABLA 2

Ensayos MCP (ml)	1		2	
	(+)	(-)	(+)	(-)
0.25	542	0	202	0
0.50	841	0	120	0
1.00	980	0	458	0

Cultivo de células T de médula ósea para determinar el efecto de diferentes cantidades de MGI en la proliferación mielóide.

(cultivos sin MGI).

Una vez determinado el tipo de suero de caballo y la cantidad óptima de MCF a usar, se consideró conveniente determinar el número de células de médula ósea que se tenían que sembrar por cada caja, de tal forma que permitiera una buena proliferación y que no fuera difícil llevar a cabo la evaluación. Con este propósito se utilizaron células E, ya que estudios realizados por distintos autores (29,67,75) demuestran que al eliminar linfocitos T de médula ósea se obtiene mayor proliferación que la presentada por células T y L. En ensayos previos, el empleo de 300 mil cél/caja presentaron una buena proliferación, pero consideramos conveniente ensayar con: 100, 200 y 300 mil por caja. Los resultados muestran que con 300 mil cél/caja, se obtiene la mayor proliferación: de 1086 a 942 col/caja en el primero y segundo ensayo contra 560 y 562 col/caja con 200 mil células [tabla 3], además fue posible evaluarlas con facilidad, por consiguiente este fue el número de células que se usó a lo largo del trabajo, a menos que se indique otra cosa.

Para llevar a cabo los experimentos subsecuentes, se eliminaron los linfocitos T de médula ósea por medio de la técnica de rosetas E, ya que se deseaba averiguar si variando alguno de los pasos de esta técnica, se podía eliminar una mayor cantidad de linfocitos T, para esto fue necesario emplear la técnica tradicional y compararla con las innovaciones introducidas, las cuales consistieron en: tratar las células L junto con los EC en tres tubos de ensayo numerados como 1, 2 y 3 e incubarlos en suspensión a 37°C por 30 min; transcurrido este tiempo, las células del tubo 1 se resuspendieron y se pasaron por un gradiente de Ficoll para eliminar linfocitos T, y las células de la interfase se cultivaron en presencia y ausencia de MGI, los

tubos 2 y 3 se centrifugaron para formar un botón de células, ambos tubos se incubaron a 4 °C, el tubo 2 durante 2 hr (E 2h) y el tubo 3 durante 24 hr (E 24h), para posteriormente eliminar mediante gradiente de densidad linfocitos T y proceder al cultivo de las células mononucleadas sin linfocitos T (E). Dentro de la heterogeneidad ya mostrada, se puede observar [tabla 4] que E resuspendido se vió más activada, 1216 y 1975 col/caja con respecto a E botón y E 2h, quienes mostraron una proliferación ligeramente menor 731 y 1518, 803 y 1638 col/caja respectivamente. En cuanto a los valores de E 24h fueron mucho más pequeños que los anteriores: 164, 556 col/caja en el primer y segundo ensayo respectivamente. Por consiguiente la técnica empleada para eliminar linfocitos T fue la de E resuspendido.

#### EVALUACION DE LA HETEROGENEIDAD EN LA ACTIVACION DE CELULAS DE MEDULA OSEA DE RATONES DE LA MISMA CEPA, AL SER ELIMINADOS LINFOCITOS T.

En los ensayos ya descritos, se observó que existía una amplia heterogeneidad en los resultados de un ensayo a otro. Por tanto, con la finalidad de determinar si esta variabilidad se presentaba por la interacción celular entre células de individuos diferentes, se procedió a realizar cultivos de células L de médula ósea y células E en presencia y ausencia de MGI, utilizando células de 6 ratones de manera independiente. Se encontró que aún en ratones de la misma cepa, edad, camada y mantenidos en forma singénica, existe una amplia heterogeneidad en la respuesta celular a la activación a la proliferación entre cada uno de los ratones. De los 6 casos analizados, uno resultó ser inhibitorio al eliminar linfocitos T (ratón B) reduciendo el



TABLA 3

Ensayos Núm. Cél. ( $\times 10^3$ )	1		2	
	(+)	(-)	(+)	(-)
100	424	0	135	0
200	564	0	562	0
300	1086	0	942	0

Cultivo de células mononucleadas sin linfocitos T (E) probando diferentes -- cantidades de células por caja.

(+), número de colonias en experimentos con MGI.  
 (-), número de colonias en experimentos control.

TABLA 4

Ensayos Tratamiento	1		2	
	(+)	(-)	(+)	(-)
E Botón	731	0	1518	0
E Resuspendido	1216	0	1975	0
E 2hr	803	0	1638	0
E 24hr	164	0	556	0

Cultivo de células E de médula ósea probando diferentes técnicas de roseado E.

número de col/caja de 807 en L a 503 en E. En los demás casos fueron activadas en diferente grado, obteniéndose el mayor incremento en el ratón A de 769 (L) a 1446 (E) y el menor en el ratón F de 384 (L) a 736 (E) [tabla 5].

Una vez que se observó que por separado existe heterogeneidad en la respuesta a la activación de las células a la proliferación, se deseaba saber si la mezcla de las células de ratones de la misma cepa y edad afecta de algún modo la proliferación, para ello se utilizaron células de médula ósea T, L y E con y sin inductor. Se encontró que existe variabilidad en la respuesta en cada uno de los ensayos, pero se mantuvo la misma cinética. Obteniéndose 610, 985, 2428 en el primer ensayo y 458, 1310 y 2056 col/caja en el segundo ensayo para T, L y E respectivamente [tabla 6].

#### DETERMINACION DE LA EFICIENCIA DE LA TECNICA DE SEPARACION DE TIPOS CELULARES POR GRADIENTE DE DENSIDAD CON FICOLL-HYPaque EN LA ELIMINACION DE LOS LINFOCITOS T.

Al emplear la técnica de separación de linfocitos T mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque con una densidad de 1.077, se observó que se perdían células mononucleadas. Era de interés averiguar si en ese grupo de células se encontraban células precursoras hematopoiéticas, para lo cual se co-cultivaron (cultivo de dos tipos celulares en una misma caja) células L más las células eliminadas con los linfocitos T (L+Lt), y la proliferación mostrada se comparó con la presentada por únicamente células L, de esta forma, si los linfocitos iban con células precursoras el co-cultivo tendría mayor respuesta que L. En esta parte del experimento, L+Lt se involucran los

TABLA 5

Ensayos Tratamiento	A		B		C		D		E		F		$\bar{X}$ (+)	DS
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)		
L	769	75	807	150	895	77	281	25	235	41	384	62	562	294
E	1446	172	530	181	1206	212	1106	66	874	58	736	38	983	334

Cultivo de células mononucleadas (L) y células mononucleadas sin linfocitos T (E) provenientes de ratones individuales.  
 (+), número de colonias en experimentos con MGI.  
 (-), número de grupos en experimentos control.

TABLA 6

Ensayos Tratamiento	1		2	
	(+)	(-)	(+)	(-)
T	618	185	458	79
L	985	260	1318	256
E	2428	350	2656	175

Respuesta *in vitro* de una mezcla de células progenitoras hematopoiéticas provenientes de diferentes ratones. Células totales (T), células mononucleadas (L) y células mononucleadas sin linfocitos T (E).

(+), número de colonias en experimentos con MGI.

(-), número de grupos en experimentos control.

linfocitos T y los EC. La cantidad de linfocitos T obtenidos por la técnica de rosetas E se dividió entre el número de cajas empleadas en cada co-cultivo, en el primer ensayo se sembraron 450 mil y en el segundo y el tercero 300 mil cél/caja. De acuerdo a nuestros resultados cuando se separan linfocitos T por la técnica ya citada, no sólo se eliminan linfocitos T sino también algunos precursores mieloides ya que en aquellos cultivos a los que se les agregaron células que contenía el botón que se obtiene de la separación por gradiente y que debe eliminarse presentaron un incremento de alrededor de 1.5 veces con respecto a L, siendo en el caso del primer ensayo 1423 para L+Lt y 902 para L [tabla 7].

Ahora bien, sabiendo que al depletar linfocitos T también se eliminan algunas células precursoras, se supuso que estas últimas tenían una densidad más elevada que la de los linfocitos T, por lo que se procedió a deshacer las rosetas y pasar a estas células nuevamente por Ficoll. Las células hematopoiéticas debido a su mayor densidad precipitarían al fondo, en tanto que los linfocitos se situarían en la interfase. Entonces al co-cultivar células de la interfase con células L (L+LtI) la activación sería reducida en comparación a L. La cantidad de células LtI recuperadas se redujo de 1.2 millones en el botón total a 458 mil células en la interfase en el primero y en el segundo ensayo. El efecto supresor no fue notorio ya que L+LtI con respecto a L en ambos ensayos se incrementó de 553 y 315 en L a 759 y 639 en L+LtI respectivamente [tabla 8], manteniendo una cinética similar a la de la tabla 7.

TABLA 7

Ensayos Tratamiento	1		2		3	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
L	902	260	962	177	1339	130
L+Lt	1423	391	1447	290	1973	334

Cultivo de células L y co-cultivo de L más linfocitos T y eritrocitos de carnero (L+Lt).

(+), número de colonias en experimentos con MGI.

(-), número de grupos en experimentos control.

TABLA 8

Ensayos Tratamiento	1		2	
	(+)	(-)	(+)	(-)
L	553	216	315	14
L+L <sub>t</sub> I	759	248	639	15

Cultivo de células L y co-cultivo de L más linfocitos T tratados nuevamente con Ficoll para eliminar EC y precursores hematopoiéticos (L+L<sub>t</sub>I).

(+), número de colonias en experimentos con MGI.

(-), número de grupos en experimentos control.

DETERMINACION DE LA EXISTENCIA DE LINFOCITOS INHIBIDORES EN ORGANOS LINFATICOS.

Después de comprobar la existencia de linfocitos T supresores en médula ósea (tabla 6), se desesba determinar si en órganos linfáticos como el bazo, timo y nódulos linfáticos existen linfocitos T inhibidores, para lo cual se emplearon en los cultivos 250 mil células L y E de médula ósea, además se co-cultivaron células E de médula ósea con 50 mil células de órganos linfáticos: timo, bazo y nódulo linfático en presencia y ausencia de MGI. Dentro de la heterogeneidad ya establecida, se obtuvo que L presentó menor activación reflejada en el número de colonias siendo estas de  $1289 \pm 349$  con respecto a E cuyo valor fue de  $2258 \pm 650$ . Los cultivos de E más células de Nódulos Linfáticos (EN), células E con células de Timo (ET) y células E con células de Bazo (EB) presentaron una activación ligeramente menor a E, siendo sus valores promedio respectivos de  $2062 \pm 650$ ,  $2074 \pm 550$  y  $1885 \pm 620$  [tabla 9 y fig. 2].

Con el propósito de corroborar los anteriores resultados, se repitió el experimento incluyendo un co-cultivo de células mononucleadas de Sangre Periférica (ES), en este ensayo nuevamente se emplearon 300 mil cél/caja de médula ósea más 50 mil cél/caja de los diferentes órganos linfáticos. En general los resultados indican que la respuesta a la activación de las células en los diferentes tratamientos fue menor a las de la tabla 9, sin embargo la cinética fue semejante, de esta forma tenemos que L en el primero y segundo ensayo presentó valores de 770 y 209, E de 1128 y 793, EN de 871 y 525, ET de 1151 y 719, EB de 1154 y 633, finalmente ES de 1062 y 390 [tabla 10 y fig. 3].



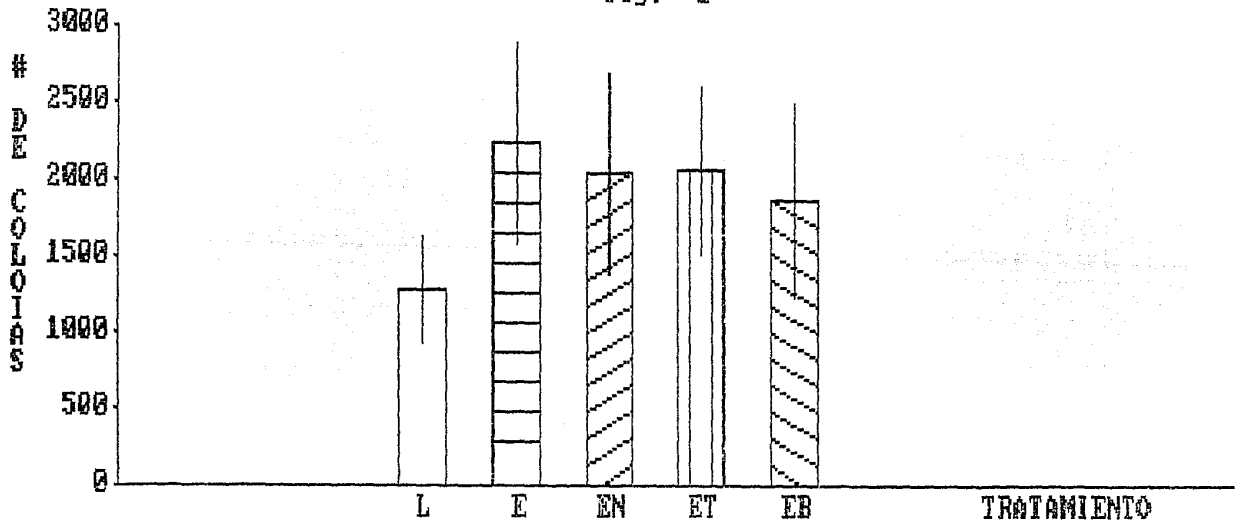
TABLA 9

Ensayos Trata- miento	1.		2.		3.		4.		5.		6.		$\bar{X}$	DS (+)
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)		
L	1516	190	1543	245	944	103	751	82	1527	462	1458	265	1289	349
E	2210	283	3444	1380	2470	531	1707	36	2000	63	1719	257	2258	650
EN	2930	491	2314	482	2606	488	1312	555	1483	39	1732	396	2062	650
ET	2672	404	2766	472	2174	479	1493	9	1634	24	1708	225	2074	550
EB	2379	373	2271	545	2443	159	819	11	1610	28	1790	274	1885	620

Cultivo de células L, E, E más células de nódulos linfáticos (EN), de Timo (ET) y de Bazo (EB).

(+), número de colonias en experimentos con activador (WGI).  
 (-), número de grupos en experimentos controles sin WGI.

Fig. 2



Efecto de linfocitos de órganos linfoides sobre la proliferación de células precursoras mieloides. Datos de la tabla 9.

TABLA 10

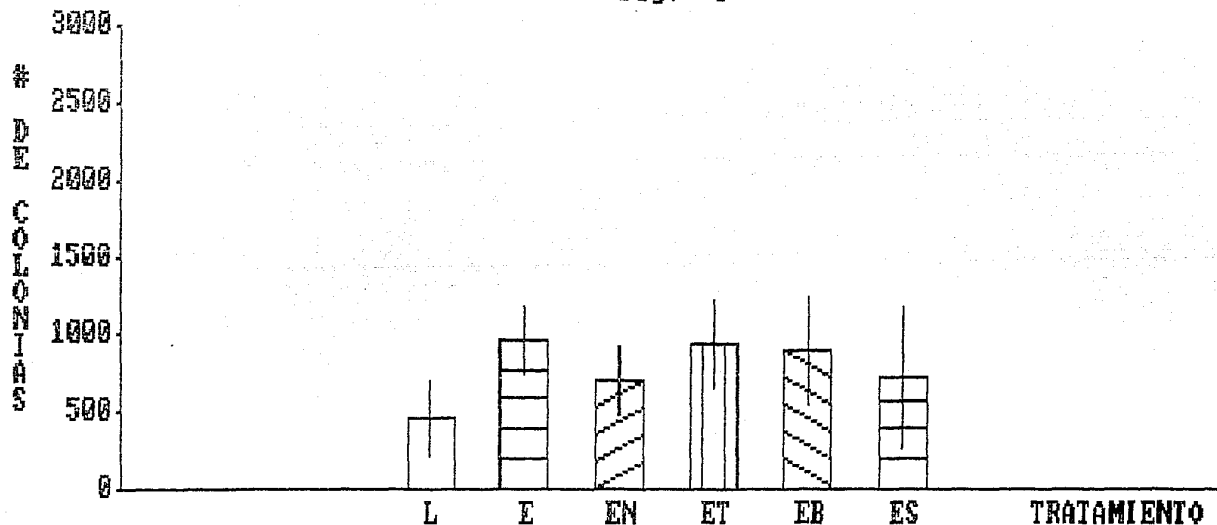
Ensayos Tratamiento	1		2		$\bar{X}$	DS
	(+)	(-)	(+)	(-)		
L	770	117	289	24	464	361
E	1128	137	793	92	960	236
EM	871	154	525	132	698	244
ET	1151	157	719	117	935	305
EB	1154	172	633	127	893	368
ES	1062	171	390	100	726	475

Cultivo de células L, E, EM, ET, EB, y ES (E más células mononucleadas - de sangre periférica).

(+), número de colonias en experimentos con MGI.

(-), número de grupos en experimentos control.

Fig. 3



Efecto de linfocitos de órganos linfoides sobre la proliferación de células precursoras mieloides, incluyendo linfocitos de sangre periférica. Datos de la tabla 10.

## INDUCCION A LA PROLIFERACION DE CELULAS MIELOIDES POR MGI EN AUSENCIA DE CELULAS CON RECEPTORES PARA E, Fc Y C3.

Una vez demostrado que los linfocitos T tienen una actividad supresora en la médula ósea, era de interés averiguar el efecto de la eliminación de otras células maduras en la proliferación de las células precursoras, para ello se utilizaron diferentes técnicas de formación de rosetas, las cuales fueron E, EA (para eliminar linfocitos T, linfocitos B y monocitos) y EAC (para eliminar linfocitos B y monocitos). Nuevamente se encontró variabilidad en la respuesta en cada ensayo. Un hecho que llamó la atención en este experimento es la activación en EA, en donde los ensayos 1, 3, 4 y 5 fueron de alrededor de 1.3 veces mayor que E; en el ensayo 1 E tuvo 2569 en tanto que en EA se vió incrementado a 3273 col/caja. En la media también se nota este ligero incremento; para E fue de  $2047 \pm 615$  en tanto que para EA fue de  $2204 \pm 732$  [tabla 11, fig. 4]. En los cultivos sin células con receptores para C3 la respuesta fue mucho más heterogénea ya que los ensayos 1, 2 y 3, la proliferación fue mayor que E. Tenemos en el caso del primer ensayo, 2669 para EAC y 2569 para E, en tanto que en los demás ensayos, la activación fue semejante o menor, de tal forma que la media y desviación estandar de todos los valores resultaron semejantes, para E de  $2047 \pm 615$  y para EAC de  $1961 \pm 726$  [tabla 11].

## DETERMINACION DEL TIPO DE CELULAS DE MEDULA OSEA QUE SE ADHIEREN AL SUSTRATO DE CULTIVO EN FUNCION DEL TIEMPO Y DEL EFECTO QUE TIENE EL SUERO Y EL MEDIO CONDICIONADO CONTENIENDO MGI.

En anteriores resultados se muestra que al eliminar células con receptores para la Fc de la IgG se incrementa la respuesta de

TABLA 11

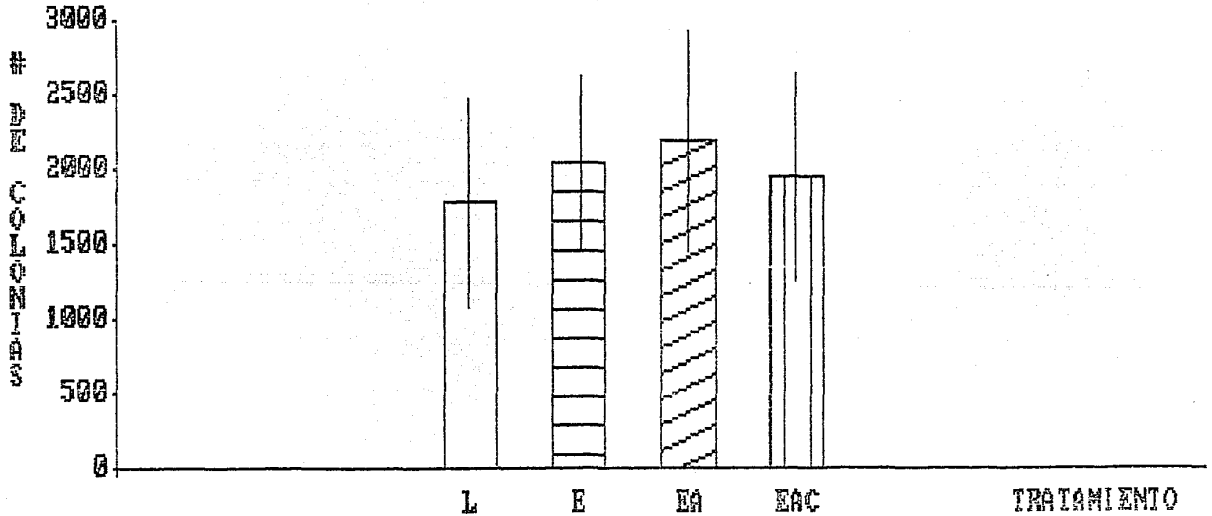
Ensayos Trata- miento	1		2		3		4		5		6		$\bar{X}$ (+)	DS
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)		
L	2150	183	1478	469	2134	256	1195	14	2828	910	986	26	1795	696
E	2569	433	1866	315	2064	302	1529	69	1320	105	2937	56	2047	615
EA	3273	924	1605	252	2532	217	2682	408	1694	190	1439	46	2204	732
EAC	2669	805	2536	313	2087	211	2348	126	947	40	1180	21	1961	726

Cultivo de células L, E, EA (mononucleadas sin células con receptores para la Fc de la IgG) y EAC (mononucleadas sin células con receptores Fc de la IgG - más C3).

(+), número de colonias en experimentos con MGI.

(-), número de grupos en experimentos control.

Fig. 4



Efecto de la eliminación de células con receptores Fc de la IgG e IgG más complemento en la proliferación de células precursoras mieloides.

la proliferación ante el inductor. Para determinar si el monocito juega un papel supresor en la hematopoyesis, fue necesario eliminarlo aprovechando sus características de adherencia al sustrato, determinando el tiempo y bajo que condiciones se adhiere un mayor número de estas células, además de verificar que las células flotantes se encuentren en buenas condiciones.

Para ello fue necesario probar diferentes tiempos de incubación (0.5, 2, 8 y 32 hr), efecto de diferentes sustratos de cultivo (cajas de vidrio y plástico nacional) además de observar el efecto que tiene la presencia del Suero de Caballo (SC) y del MGI.

Al incubar células de médula ósea sin SC en cajas de vidrio se tuvo que al transcurrir 1/2 hr, el 90% de células adheridas fueron granulocitos, a las 8 hr se encontró que seguían prevaleciendo con un 74%, sin embargo a las 32 hr el 91% de células adheridas eran monocitos. No obstante la densidad de monocitos en las dos primeras hr fue de 118 células (las cuales se contaron en dos transectos que cruzaban por el centro de la caja) y fue disminuyendo al transcurrir el tiempo. En cajas de plástico, el comportamiento de la adherencia fue semejante al de vidrio, sólo que la densidad/área máxima de macrófagos fue de 70 células [tabla 12].

Cuando se incubaron las células con suero (0.5 ml/caja) en cajas de vidrio se obtuvieron porcentajes de adherencia de monocitos desde un 54% en 1/2 hr hasta un 93% a las 32 hr, en tanto que los granulocitos presentaron a las 2 hr un 25% y los linfocitos en 1/2 hr un 29% como valores máximos. La densidad de monocitos fue de 11 y 53 células en 1/2 y 32 hr respectivamente. El comportamiento de adherencia en las cajas de



TABLA 12

Incubación (hr)	Sin Suero (%)			Con Suero (%)				Con Suero y MGI (%)			
	Mº	Gra	D Mº	Mº	Gra	Linf	D Mº	Mº	Gra	Linf	D Mº
1/2	20	80	58	56	20	24	5				
2	21	79	70	60	17	23	3				
8	40	57	29	72	13	15	4				
32	80	20	2	84	3	13	26				
<b>Vidrio</b>											
1/2	10	90	102	54	17	29	11	60	27	10	204
2	17	83	118	79	25	16	8	48	34	23	164
8	26	74	51	72	11	17	20	70	17	13	104
32	91	9	55	93	2	5	53	86	2	12	24

Determinación del porcentaje de adherencia de células de médula ósea al sustrato de cultivo en función del tiempo y del efecto que tienen el suero y el MGI.

plástico fue semejante a las de vidrio, sólo que la densidad/área de monocitos fue mucho menor, siendo el máximo valor de 26 células obtenidas a las 32 hr, por tal motivo se decidió utilizar únicamente cajas de vidrio en el siguiente experimento.

Al incubar células con SC y MGI (0.5 ml/caja de cada uno) durante media hora se obtuvo hasta un 63% de adherencia de monocitos con una densidad de 204 cél/transecto, en tanto que a las 32 hr fue de 86 % de adherencia y una densidad de 24 cél/transecto. Por otra parte el máximo porcentaje de granulocitos y linfocitos se tuvo a las 2 hr de incubación con 34 y 23% respectivamente [tabla 12]. En consecuencia, se consideró que la incubación por 1/2 h de las células de médula ósea bajo estas condiciones fue la mejor técnica para depletar una mayor cantidad de monocitos.

#### EVALUACION DE LA INDUCCION A LA PROLIFERACION DE PRECURSORES DE MEDULA OSEA POR MGI EN AUSENCIA TANTO DE CELULAS ADHERENTES, COMO DE DIVERSOS TIPOS DE LINFOCITOS.

Siendo que en el experimento anterior se encontró que los monocitos de médula ósea se adhieren en mayor proporción y densidad a la 1/2 hr de cultivo en presencia de SC y MGI, se decidió proceder de acuerdo a este método con el propósito de evaluar la respuesta a la inducción por el MGI de las células mieloides en ausencia de células adherentes, así como de diversos tipos de linfocitos, los cuales se eliminaron por rosetas E y EA. Se cultivaron células totales (T), T sin monocitos (T- $\phi$ ), L sin monocitos (L- $\phi$ ), E sin monocitos (E- $\phi$ ) y EA sin monocitos (EA- $\phi$ ). Dentro de la heterogeneidad ya descrita, sobresale el hecho de que E- $\phi$  fué el más activado en presencia de MGI siendo la media y

desviación estandar de  $1542 \pm 359$  en tanto que T- $\emptyset$ , L- $\emptyset$  y EA- $\emptyset$  presentaron comportamientos semejantes cuyos valores fueron:  $968 \pm 293$ ,  $937 \pm 272$  y  $980 \pm 237$  respectivamente [tabla 13 y fig. 5].

Un hecho que debe considerarse es la activación presentada por T- $\emptyset$  con respecto a T debido a que en todos los ensayos el primero es mayor, alcanzando un incremento máximo en el ensayo 1 en donde se obtuvo 1108 col/caja para T- $\emptyset$  y 165 col/caja para T.

Con la finalidad de ver si la inducción a la proliferación mostrada en la tabla 13 se modifica al obtener primero células mononucleadas y posteriormente eliminar células adherentes, se realizó nuevamente el mismo experimento, pero para obtener L- $\emptyset$  primero se obtuvieron células mononucleadas y posteriormente se incubaron para eliminar células adherentes. Los resultados indican [tabla 14, fig. 6] que prácticamente no existe variación en la cinética de proliferación con respecto a los resultados de la tabla 13, como puede verse en los valores de la media y desviación estandar siendo para T  $565 \pm 73$ , T- $\emptyset$   $1016 \pm 276$ , L- $\emptyset$   $1003 \pm 34$ , E- $\emptyset$   $1980 \pm 663$  y para EA- $\emptyset$   $987 \pm 31$ .

TABLA 13

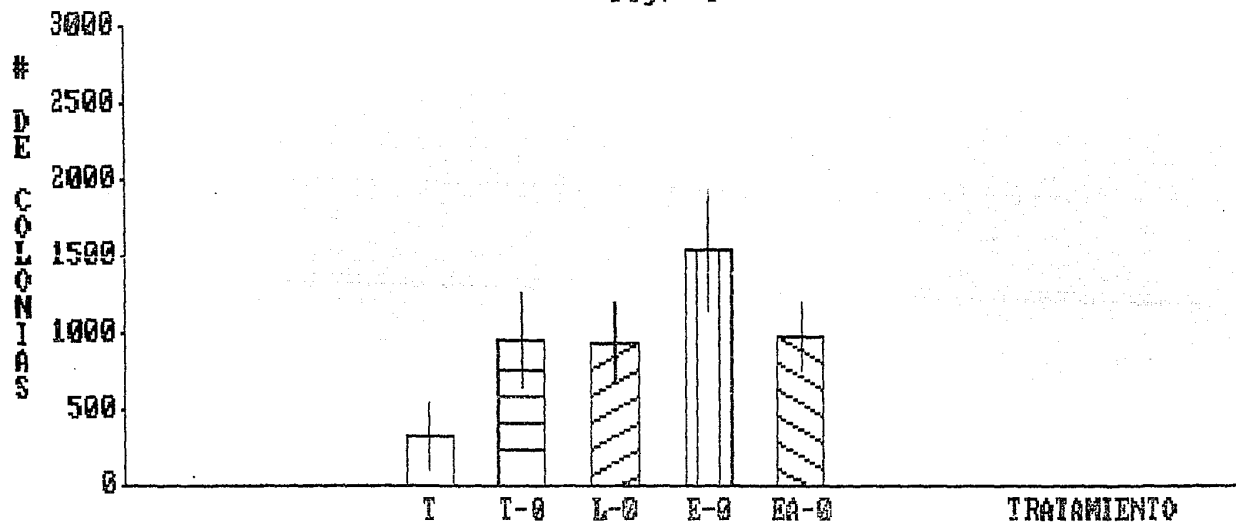
Ensayos Trata- miento	1		2		3		4		$\bar{X}$ (+)	DS
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)		
T	165	7	603	103	186	0	403	62	339	206
T-0	1100	230	780	92	1300	46	667	37	968	293
L-0	869	256	870	88	1322	31	681	12	937	272
E-0	1153	133	1389	193	1752	139	1955	366	1562	359
EA-0	774	39	942	115	1319	31	884	32	980	237

Efecto de la eliminación de células adherentes en la proliferación de células precursoras mieloides. T, células totales; T-0, L-0, E-0 y EA-0 son células T, L, E, y EA sin células adherentes.

(+), número de colonias en experimentos con MGI.

(-), número de grupos en experimentos control sin MGI.

Fig. 5



Activación de células precursoras mieloides en ausencia de células adherentes. Datos de la tabla 13.

TABLA 14

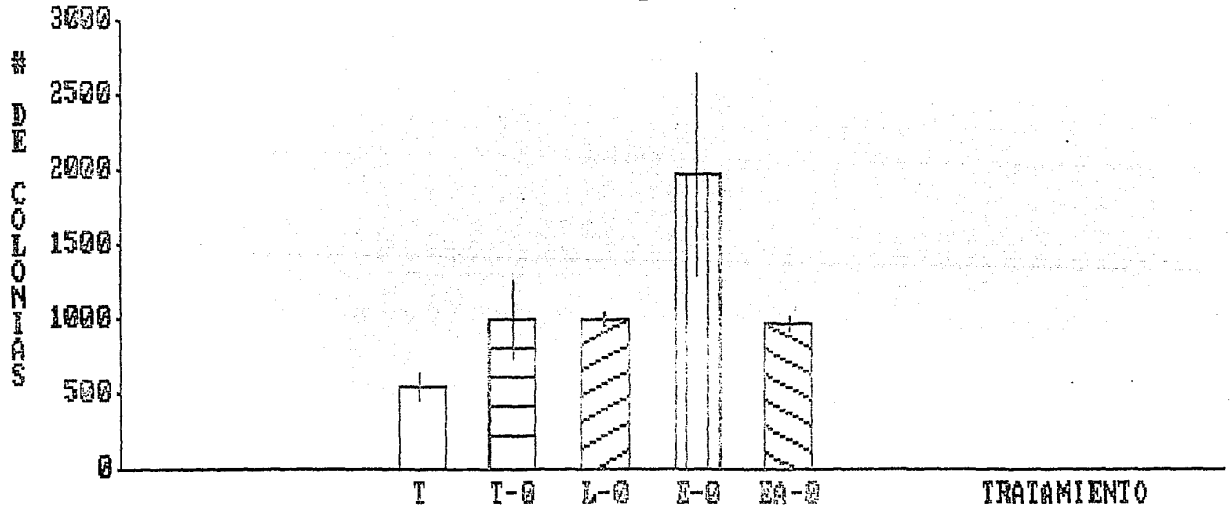
Ensayos Tratamiento	1		2		$\bar{X}$ (+)	DS
	(+)	(-)	(+)	(-)		
T	617	208	513	90	565	73
T-Ø	821	332	1212	286	1016	276
L-Ø	979	263	1028	371	1003	35
E-Ø	1511	422	2450	712	1980	664
EA-Ø	939	80	1035	48	987	31

Efecto de la eliminación de las células adherentes en la proliferación - de células progenitoras mieloides, al obtener primero células mononucleadas y posteriormente eliminar las células adherentes.

(+), número de colonias en experimentos con MGI.

(-), número de grupos en experimentos control.

Fig. 6



Activación de células precursoras mieloides en ausencia de células adherentes. Datos de la tabla 14.

## DISCUSION

La técnica de cultivo de células hematopoiéticas ha contribuido a esclarecer hasta cierto punto los mecanismos que operan en el control de la proliferación mielóide, de tal manera que en la actualidad se sabe que algunas células poseen efecto supresor: se ha determinado que los granulocitos suprimen la proliferación de la línea granulocítica-monocítica (64 , 83), los macrófagos bloquean la acción del inductor afectando únicamente su línea celular (81 , 84).

En cuanto a los linfocitos, su efecto en la proliferación mielóide es controversial; por un lado se plantea que los linfocitos T supresores son los responsables de la pancitopenia en algunos pacientes con anemia aplástica (28 , 67 , 70 , 76), pero en individuos normales pocos autores han observado el efecto supresor de estas células (29 , 75), y algunos concluyen que no tienen ningún efecto en la regulación de la hematopoesis (78) incluso en pacientes con anemia aplástica (85 , 86).

Al trabajar con material biológico siempre se tiene alguna variación entre los resultados, aceptándose hasta un 20 %, por tanto era deseable optimizar la técnica de cultivo para estandarizar resultados como por ejemplo: el tipo de suero de caballo, número de células a sembrar de médula ósea y cantidad de inductor (tablas 1, 2, 3 y 4). A pesar de ello, la variación de un ensayo a otro se siguió manifestando en nuestros resultados, creemos que es consecuencia de la diferente



activación celular presentada por cada uno de los ratones (tabla 5). Esta variabilidad puede ser explicada por el estado de salud de cada uno de los individuos lo cual implica que su sistema inmunológico puede estar activado en diferente grado, reflejándose en una mayor demanda de leucocitos, y en consecuencia las células de médula ósea se verán más estimuladas a proliferar.

Por otra parte, los resultados de las tablas 5 y 6, nos mostraron evidencias de la presencia de linfocitos T supresores de la mielopoiesis, porque al ser eliminadas de la médula ósea (E), se observó que la proliferación celular se incrementaba (562 a 983). Consideramos que este comportamiento no puede ser consecuencia de la eliminación de otro tipo de células, ya que las únicas células reportadas hasta el momento con receptores para la membrana de eritrocitos de carnero son los linfocitos T (87, 88). Además, al eliminar células maduras con capacidad de adherencia se siguió manifestando una mayor activación en E- $\phi$  (1562) con respecto a L- $\phi$  (937), comprobándose de esta forma que los linfocitos T son los responsables de la inhibición de la proliferación en estos casos.

Por otro lado, la cinética de proliferación que se muestra en la tabla 6, también nos sugiere que al trabajar con cultivos ricos en precursores mieloides, es más factible contar con una población celular más homogénea, capaz de ser inducida a proliferar.

Al eliminar células maduras, específicamente linfocitos T,

observamos que también se perdían células precursoras mieloides (tablas 7 y 8). Sin embargo, este hecho no influyó en el comportamiento de la cinética de proliferación puesto que siempre fue el mismo (tablas 9, 10 y 11). No obstante, es importante considerar esta pérdida al trabajar con médula ósea humana, ya que por lo general se consiguen muestras pequeñas y al no tener un número elevado de células, se corre el riesgo de que el experimento se haga incompleto, ya que hay que considerar que se realice por duplicado y además, de llegar a mejorar esta técnica, se podría contar con un número mayor de opciones en la experimentación que se realiza. Pensamos que lo conveniente sería una revisión de la densidad del Ficoll, de manera que nos permita la eliminación de linfocitos T pero a la vez recuperar mayor cantidad de células precursoras.

Una vez que detectamos linfocitos T inhibidores en médula ósea, fue de interés saber si en algún otro órgano linfático existía este tipo de célula. Dado que son centros proliferativos, era lógico pensar que en ellos existieran linfocitos T con actividad supresora. Sin embargo, los resultados (tablas 9 y 10 y fig. 2) nos sugieren que las células de estos órganos linfáticos no tienen una actividad supresora evidente, posiblemente debido a que los linfocitos T supresores no estén totalmente diferenciados y los pocos que existen son los responsables de la ligera caída en la activación en EN (698), ET (935), EB (893) y ES (726) con respecto a E (940). En consecuencia, no se puede llegar a una conclusión, por lo que es necesario que se realicen más ensayos al respecto. Creemos que sería conveniente depletar los linfocitos T de los diferentes órganos linfáticos para

posteriormente colectarlas y agregarlas a las células E, a fin de evitar la posible interferencia de otras células maduras que se encuentren en estos órganos

Considerando que en 4 de 6 ensayos la proliferación fue mayor en EA (2204) en relación a E (2047) y EAC (1961) (tabla 11), creemos que se debió a que además de eliminar linfocitos T también se eliminan macrófagos y monocitos, ya que se sabe que en presencia de MGI las células macrofágicas maduras producen prostaglandina E que bloquea la acción del inductor (79, 81). Este efecto también pudo ser observado al eliminar células adherentes en especial T (339 y 565) con respecto a T- $\phi$  (968 y 1016) (tablas 13 y 14).

Por otra parte, al eliminar previamente células adherentes la proliferación resultó mayor en E- $\phi$  (1562) que en EA- $\phi$  (980). Pensamos que este comportamiento es consecuencia de la eliminación de células promonocíticas, dado que ellas son células comprometidas que en presencia de MCP, fácilmente se diferenciarían aún más alcanzando una etapa en la cual su presencia o la producción de un factor no existente en el MCP, ayudaría a incrementar la proliferación de células granulocíticas y monocíticas.

Cuando se evaluaron las poblaciones celulares adheridas al sustrato de cultivo, se observaron algunas células de este tipo, por tal motivo, creemos que si sumamos la pérdida celular por adherencia con la que se tiene al efectuar las técnicas de rosetas, se entendería el porque de la disminución de la proliferación en EA- $\phi$  (980) con respecto a E- $\phi$  (1562), más aun si consideramos que cada célula en división libera pequeñas

cantidades de MGI (89).

En la literatura se habla de que al dejar incubar células de médula ósea únicamente se adhieren monocitos y macrófagos (90 , 91), pero según nuestros resultados se adhieren una amplia gama de células, encontrando macrófagos, granulocitos, linfocitos y células poco diferenciadas. También observamos que cada una de ellas se adhieren al sustrato de cultivo en mayor porcentaje bajo diferentes condiciones: con y sin SC y con SC y MGI a diferentes tiempos de incubación. Por lo tanto estas pueden emplearse según el tipo de células que se desee eliminar, por ejemplo, si se desea eliminar macrófagos se debe incubar con SC y MGI por 1/2 hr, si se quiere eliminar granulocitos se recomienda incubar las células de médula ósea sin SC por el mismo tiempo (tabla 12).

El SC junto con el MGI promueven la adherencia de monocitos y macrófagos en un buen porcentaje (63 %), en consecuencia esto nos hace sospechar de la existencia de un factor de adherencia inespecífico, que no sabemos si es el MGI u otra molécula acompañante que tiene la propiedad de hacer adherir a la mayoría de las células con esta característica en media hora. En un futuro sería interesante hacer un análisis cromatográfico para determinar de que factor se trata, así como conocer sus propiedades bioquímicas, ya que puede tener gran importancia en la defensa inmunológica del organismo.

Finalmente, hemos mencionado ya la controversia existente en relación al papel regulador negativo de los linfocitos T en la hematopoesis humana, tanto en estado normal como patológico, es por ello que consideramos importante el hecho de haber detectado

actividad supresora por parte de estas células en médula ósea de ratón, ya que las investigaciones podrán hacerse con este tipo de material biológico para lograr determinar que subclase de linfocito T presenta actividad supresora y determinar su mecanismo de acción. En consecuencia, contribuiría a comprender la importancia de esta célula en enfermedades como la anemia aplástica, que pudiera conducir al establecimiento de una terapia más efectiva contra este padecimiento.

## APENDICES

### Apéndice 1.

#### MEDIO MINIMO ESENCIAL DE EAGLE.

Este medio se utilizó para mantener 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 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-Triptofano	16.0
L-Tirosina (Sal Disódica)	104.6
L-Valina	94.0
VITAMINAS	
U-Ca Pantotenato	4.0
Cloruro de Colina	4.0
Acido Fólico	7.2
Inositol	7.2
Nicotinamida	4.0
Firidoxal.HCl	4.0
Riboflavina	0.4
Tiamina	4.0
SALES INORGANICAS	
Cloruro de Calcio Anhidro	200.0
Nitrato de Hierro III Monohidratado	0.1
Cloruro de Potasio	400.0
Sulfato de Magnesio Anhidro	97.87
Cloruro de Sodio	6400.0
Fosfato Monosódico Monohidratado	125.0
OTROS COMPUESTOS	
L-Glucosa	4500.0
Rojo Fenol	15.0

Mediante agitación se diluyen en agua bidestilada 13.4 g/l del medio Eagle en polvo, se adicionan 3.4 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 esteriliza por filtración con bióxido de carbono, pasándola a través de una membrana millipore con poros de 0.22 micras. Finalmente el medio se almacena a 4°C hasta el momento de su uso.

## Apéndice 2.

### SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS.

Esta solución ayuda a mantener a las células en condiciones fisiológicas estables por un periodo de tiempo corto.

La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Las sustancias fueron diluidas en un volumen final de 1 litro de agua bidestilada.

Cloruro de Sodio	8.0 g
Cloruro de Potasio	0.2 g
Fosfato Monoácido de Sodio	2.16 g
Fosfato Diácido de Potasio	0.2 g

La solución obtenida se ajustó a un pH de 7.2 a 7.4 utilizando HCl 8N. Posteriormente se esterilizó la solución con filtros de membrana con poros de 0.22 micras de diametro, y se almacenó a una temperatura de 4°C hasta el momento de su uso.

## Apéndice 3.

### SOLUCION ALSEVER

Es una solución amortiguadora, isotónica, preservativa que permite almacenar sangre entera a una temperatura de 4°C por un periodo de 5 semanas.

Los eritrocitos de carnero se utilizan 7 días después de su extracción y nunca después de 5 semanas.

Se disuelven las sustancias sucesivamente en agua destilada, luego la solución se esteriliza en autoclave a 15 libras durante 15 minutos.

El pH de la solución estéril debe ser de 6.1.

Dextrosa	20.50 g
Citrato de Sodio Dihidratado	8.00 g
Acido Citrico Monohidratado	0.55 g
Cloruro de Sodio	4.20 g
Agua Destilada	1000.00 ml

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Pluznik D.H., y Sachs L. (1966). The Induction of Normal "Mast" Cells by a Substance from Conditioned Medium. *Exp. Cell Res.* 43:553
- 2.- Brown B.A. (1976). *Hematology: Principles and Procedures*. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia. pp 1-2, 29-70
- 3.- Weather P.R., Berhitt H.G., y Daniels U.G. (1980). *Histología Funcional*. Ed. Jims. Barcelona. pp 24-37, 145-160
- 4.- Leonhardt H. (1975). *Histología, Citología y Microanatomía Humana*. Ed. Salvat. Barcelona. pp 130-131, 145-182
- 5.- Santiago I.A. (1981). *Hematología 1: Anemia Aplástica*. Sociedad Médica del Hospital General. Monografía Núm. 6. Ed. Editores Médicos Asociados, S.A. México.
- 6.- Dexter T.M., Simmons P., Purnell R.A., Spooncer E., y Schofield R. (1984). The Regulation of Hematopoietic Cell Development by the Stromal Cell Environment and Diffusible Regulatory Molecules. In: *Progress in Clinical and Biological Research*, Vol. 148. *Aplastic Anemia Stem Cell Biology and Advances in Treatment*, ed. Young N.S., Levine A.S., y Humphries R.K. Ed. Alan R. Liss. Inc. New York. pp 13-33
- 7.- Wintrobe M.M., Lee G., Boggs D.R., Bithell T.C., Athens J., y Foerster J. (1974). *Clinical Hematology*. 7th Edition. Ed. Library of Congress Cataloging in Publication Data. USA. pp 49-53
- 8.- Beck W.S. (1977). *Fisiología Molecular, Celular Sistemática*. Ed. Publicaciones Cultural. México. pp 238-246
- 9.- Till J.E., y McCulloch E. (1961). A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cell. *Radiat. Res.* 14:213-246
- 10.- Siminovitch L., McCulloch E.A., y Till J.E. (1963). The Distribution of Colony-Forming Cell Among Spleen Colonies. *J. Cell Comp. Physiol.* 62:327-336
- 11.- Magli M.C., Iscove N.N., y Odartchenko N. (1982). Transient Nature of Early Haemopoietic Spleen Colonies. *Nature.* 295:527-529
- 12.- Leavell B.S., y Thorup O.A. Jr. (1978). *Hematología Clínica*. 4ta Edición. Ed. Interamericana. México. pp 5-20, 151-165
- 13.- Quesenberry F.M.D. y Levitt L. (1979). Hematopoietic Stem Cell. *The New England Journal of Medicine.* 301:14:755-759
- 14.- Ogawa M., Suda T., y Suda J. (1984). Differentiation and



Proliferative Kinetics of Hemopoietic Stem Cell in Culture. In: Progress in Clinical and Biological Research, Vol. 148. Aplastic Anemia Stem Cell Biology and Advances in Treatment, ed. Young N.S., Levine A.S., y Humphries R.K. Ed. Alan R. Liss, Inc. New York, pp 35-43

- 15.- Gordon M.Y., y Barrett A.J. (1985). Bone Marrow Disorders: The Biological Basis of Clinical Problems. Ed. Blackwell Scientific Publications, London, pp 20-49, 60-92
- 16.- Messner H., Lim B., y Jamal N. (1984). Myeloid and Lymphoid Repertoire of Human Pluripotent Hemopoietic Progenitors (CFU-GEMM). In: Progress in Clinical and Biological Research, Vol. 148. Aplastic Anemia Stem Cell Biology and Advances in Treatment, ed. Young N.S., Levine A.S., y Humphries R.K. Ed. Alan R. Liss, Inc. New York, pp 45-49
- 17.- Fluznik D. H., y Sachs L. (1965). The Cloning of Normal "Mast" Cells in Tissue Culture. J.Cell. Comp. Physiol. 66:319.
- 18.- Bradley T. R., y Metcalf D. (1966). The Growth of Mouse Bone Marrow Cell In Vitro. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 44:287
- 19.- Golde D.W., Cline M.J., Metcalf D., y Fox C.F. (1978). Hematopoietic Cell Differentiation. Ed. Academic Press, New York, pp IX-X
- 20.- Burgess A.W., y Metcalf D. (1980). The Nature and Action of Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factors. Blood. 56:6:947-956
- 21.- Oppenheim J.J., Rosenstreich D.L., y Pofter M. (1981). Cellular Functions in Immunity and Inflammation. Ed. Edward Arnold. USA, pp 271-274
- 22.- Fudenberg H.H., Stites D.D., Cadwell J.L., y Wells J.V. (1982). Inmunología Clínica. 3ra Edición. Ed. Manual Moderno. México. pp 98-101
- 23.- Leeson T.S., y Leeson C.R. (1970). Histología. 2da Edición. Ed. Interamericana. México. pp 123-138
- 24.- Ham A.W. (1975). Tratado de Histología. 7ma Edición. Ed. Interamericana. México. pp 303-340
- 25.- Cline N.J. (1975). The White Cell. Ed. A Commonwealth Fund Book. USA. pp 221-240
- 26.- Hood L.E., Weissman I.L., Wood W.B., y Wilson J.H. (1984). Immunology. 2da Edition. Ed. Benjamin/Cummings. USA. pp 1-14, 282-312
- 27.- Dexter T.M., Whetton A.D., Spooncer E., Heyworth C., y

- Simmons P. (1985). The Role of Stromal Cells and Growth Factors in Haemopoiesis and Modulation of their Effects by the src Oncogene. *J. Cell Sci. Suppl.* 3:83-95
- 28.- Zoumbos N.C., Gascon F., Djeu J.Y., Throst S.R., y Young N.S. (1985). Circulating Activated Suppressor T Lymphocytes in Aplastic Anemia. *The New England Journal of Medicine.* 312:5:257-265
- 29.- Spitzer G., y Verna D. (1982). Cell With Fcy Receptors from Normal Donors Suppress Granulocytic Macrophage Colony Formation. *Blood.* 60:3:758-766
- 30.- Kasahara T., Djeu J.Y., Dougherty S.F., y Oppenheim J.J. (1983). Capacity of Human Large Granular lymphocytes (LGL) to Produce Multiple Lymphokines: Interleukin 2, Interferon, and Colony Stimulating Factor. *J. Immunology.* 131:5:2379-2385
- 31.- Reynolds C.W., Rees R., Timonen T., y Herberman R.B. (1982). Identification and Characterization of the Natural Killer (NK) Cell in Rats. In: *NK Cell and other Natural Effector Cells.* Ed. Herberman Academic Press. New York. pp 17
- 32.- Stites D.P., Stobo J.D., Fudenberg H.H., y Wells J. (1985). *Inmunologia Básica y Clínica, 5ta Edición.* Ed. Manual Moderno. México. pp 15-21, 32-33, 69-84, 488-489
- 33.- Kawaguchi T., Golde D.W., Mednis A., Bersch N., Clark S., y Remold H.G. (1984). T Cell-Derived Migration-Inhibitory Factor and Colony-Stimulation Factor Share Common Structural Elements. *Blood.* 67:6:1619-1623
- 34.- Winkelhake J.L. (1978). Immunoglobulin Structure and Effector Function. *Immunochemistry.* 15:6:95-714
- 35.- Gigli I., y Nelson Jr. R.A. (1968). Complement Immune Dependent Phagocytosis I. Requirements for C1, C4, C2, C3. *Exp. Cell Res.* 51:45
- 36.- Fearon D.T., y Austen K.F. (1975). Properdin: Initiation of the Alternative Complement Pathway. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 22:3:220
- 37.- Schwartz R.H., Dickler H.B., Sachs D.H., y Schwartz B.D. (1976). Studies of Ia Antigens on Murine Peritoneal Macrophages. *Scand. J. Immunol.* 5:731
- 38.- Fragoso A., Arciga M.A., Calcagno M., y Weiss E.S. (1985). Determination of the Inducer of Fc (FcRI) and C3 (C3RI) Receptor in Myeloid Cell in Several Media from Human and Mouse Origin, and the Identification of the Macrophage as the Cell that Produces these Factors. *Exp. Hematol.* 13:1:63-168
- 39.- Water R., Ginsel L.A., Deams W.Th., y Doha M.R. (1983).

Autorradiographical Demonstration of C3b Receptor Activity on Resident Peritoneal Macrophages. *Histochemistry*, 77:289-298

- 40.- Rabellino E.M., Ross G.D., Trang H.T.K., Williams N., y Metcalf D. (1978). Membrane Receptors of Mouse Leukocytes: II. Sequential Expression of Membrane Receptor and Phagocytic Capacity During Leukocyte Differentiation. *Journal of Exp. Medicine*. 147:437-445
- 41.- Fridman W.H., Neuport C.S., Dearon M., Judoi J., Lowy I., Brezin C., Vaquero C., Gelabert M.J., y Theze J. (1984). Induction of Fc Receptors and Immunoglobulin-Binding Factors in T-Cell Clones. *Molecular Immunology*. 21:12:1243-1251
- 42.- Doughaday C.C., y Douglas S.D. (1976). Membrane Receptor on Rabbit and Human Alveolar Macrophages. *J. Reticuloendothel. Soc.* 19:37
- 43.- Fearon D.T. (1980). Identification of the Membrane Glycoprotein that is the C3b Receptor of the Human Erythrocyte, Polymorphonuclear Leukocyte, B Lymphocyte, and Monocyte. *J. Exp. Med.* 152:20-30
- 44.- Van-Furth R., Langevoort H.L., y Schaberg A. (1975). Mononuclear Phagocytes in Human Pathology-Proposal for an Approach to Improved Classification. In: *Mononuclear Phagocytes in Immunity Infection and Pathology*, ed. Van-Furth R. Ed. Blackwell Sci. Publication, London. pp 1-6
- 45.- Dulk D., y Van-Furth R. (1981). Characteristics of Mononuclear Phagocytes from Different Tissues. In: *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes*, ed. Adams D.O., Edelson P.J., y Koren H. Ed. Acad. Press. New York. pp 253-272
- 46.- Dickler H.B., Cowing C., Ahmann G.B., Hathcock K.S., Sharrow S.O., Hodes R.J., y Singer A. (1980). Characterization of the Accessory Cell Required in T Lymphocyte Dependent Antigen-Specific Immune Responses. In: *Macrophage Regulation of Immunity*, ed. Unanue E.R., y Rosenthal A.S. Ed. Acad. Press. New York. pp 265-276
- 47.- Golde D.W., y Hocking W.G. (1982). Monocytes and Macrophages Development. In: *Phagocytic Cell, Vol.1. Advances in Host Defense Mechanisms*, ed. Gallin J.I., y Fauci A.S. Ed. Ravens Press. New York. pp 13-30
- 48.- Van-Furth R. (1981). Identification of Mononuclear Phagocytes: Overview and Definition. In: *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes*, ed. Adams D.O., Edelson P.J., y Koren H. Ed. Acad. Press. New York. pp 243-251
- 49.- Suda J., Suda T., y Ogawa M. (1984). Analysis of

Differentiation of Mouse Hemopoietic Stem Cell in Culture by Sequential Replating of Paired Progenitors. *Blood*. 64:393-399

- 50.- Davies P. (1981). Secretory Function of Mononuclear Phagocytes: Overview and Methods for Preparing Conditioned Supernatants. In: *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes*, ed. Adams D.O., Edelson P.J., y Koren H. Ed. Acad. Press. New York. pp 549-559
- 51.- Bianco C., y Pytowski B. (1981). Fc and C3 Receptors. In: *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes*, ed. Adams D.O., Edelson P.J., y Koren H. Ed. Acad. Press. New York. pp 273-282
- 52.- Water R. (1984). Cell-Surface Heterogeneity in Macrophages: A Quantitative Electronmicroscopical Study. Ed. Drukkerij J.H. Pasmans B.V., s-Gravenhage. pp I-1 a I-16
- 53.- Sachs L. (1983). Constitutive Gene Expression and the Uncoupling of Controls in Leukemia: Regulatory Proteins that Control Growth and Differentiation in Normal and Leukemic Myeloid Cell. Normal and Neoplastic Hematopoiesis. Ed. Alan R. Liss Inc. New York. pp 57-85
- 54.- Param M., Sachs L., Barak Y., y Resnitzky P. (1970). In Vitro Induction of Granulocyte Differentiation in Hematopoietic Cell from Leukemic and non-Leukemic Patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 67:1542-1544
- 55.- Metcalf D. (1969). Studies on Colony Formation In Vitro by Mouse Bone Marrow Cell. I. Continuous Cluster Formation and Relation of Clusters to Colonies. *J. Cell Physiol*. 74:325-332
- 56.- Austin P.E., McCullock E.A., y Till J.E. (1971). Characterization of the Factor in L Cell Conditioned Medium Capable of Stimulating Colony Formation by Mouse Marrow Cell in Culture. *J. Cell Physiol*. 77:121-123
- 57.- Lipton J., y Sachs L. (1981). Characterization of Macrophage and Granulocyte Inducing Proteins for Normal and Leukemic Myeloid Cell Produced by the Krebs Ascites Tumor. *Biochim-Biophys Acta*. 673:552-554
- 58.- Ralph P., Broxmeyer H.E., y Nakoinz I. (1977). Immunostimulators Induce Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Activity and Block Proliferation in a Monocyte Tumor Cell Line. *J. Exp. Med*. 146:2:611
- 59.- Falk A., y Sachs L. (1980). Clonal Regulation of the Induction of Macrophage and Granulocyte Inducing Proteins for Normal and Leukemic Myeloid Cells. *Int. J. Cancer*. 26:595

- 60.- Luriya E.A. (1977). Hematopoietic and Lymphoid Tissue in Culture. Ed. Consultants Bureau, New York and London, USA. pp 5-11, 13-35
- 61.- Metcalf D. (1986). The Molecular Biology and Function of the Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factors. Blood. 67:2:257-267
- 62.- Cabrera G.F. (1984). Determinación del Peso Molecular y del pH Isoeléctrico del Factor Inductor a la Proliferación y Diferenciación de Macrófagos y Granulocitos (MGI) Contenido en Medio Condicionado por una Línea Celular Leucémica de Tipo Macrófagico. Tesis. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- 63.- Cline M.J., y Fitchen J.H. (1978). Inhibitors of Granulopoiesis. In: ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology Vol. X., Hematopoietic Cell Differentiation, ed. Golde D.W., Cline M.J., Metcalf D., y Fox C.F. Ed. Acad. Press. USA. pp 461-469
- 64.- Ejorson B.H., Pincus S.H., Di Napoli A.M., y Desforges J.F. (1984). Inhibition of CFU-NM on CFU-EOS by Mature Granulocytes. Blood. 63:2:376-379
- 65.- Moore A.S. (1978). Regulation of Granulopoiesis In Vitro. In: ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology Vol. X., Hematopoietic Cell Differentiation, ed. Golde D.W., Cline M.J., Metcalf D., y Fox C.F. Ed. Acad. Press. USA. 461-469
- 66.- Gentile F.S. y Broxmeyer H.E. (1981). The Suppressive Influence of Lactoferrin on Myelopoiesis In Vivo. Blood. 58:5:109a, Supplement 1.
- 67.- Bacigalupo A., Podesta M., Van Lint M., Vimercati R., Cerri R., Rossi E., Rizzo M., Carella A., Santini G., Damasio E., Giordano D., y Marmont A.M. (1981). Severe Aplastic Anemia: Correlation of in vitro Tests with Clinical. Response to Immunosuppression in 20 Patients. British Journal of Haematology. 47:423-433
- 68.- Torok-Storb B., y Hansen J.A. (1982). Modulation of In Vitro BFU-E Growth by Normal Ia-Positive T Cell is Restricted by HLA-DR. Nature. 298:473-474
- 69.- Abdou N.I., Verdirame J.C., Amare M., y Abdou N.L. (1981). Heterogeneity of Pathogenetic Mechanism in Aplastic Anaemia. Annals of Internal Medicine. USA. 95:1:43-50
- 70.- Cabrera G., y Weiss B. (1985). Los Cultivos en Medio Líquido como una Herramienta para la Evaluación Rápida de la Proliferación de Precursores Hematopoyéticos Provenientes de Pacientes con Anemia Aplástica. Rev. Fac. Med. UNAM. México. 28:5-10
- 71.- Lomen P.L., Lamborn K.R., y Loughman E.E. (1984). Treatment of Aplastic Anaemia with ATEGAM

(Antithymocyte Globulin [Equine]). *Drugs. Exptl. Clin. Res.* X(12):915-920

- 72.- Champlin R., Winston H., y Gale R.F. (1983). Antithymocyte Globulin Treatment in Patients with Aplastic Anemia. *New England Journal of Medicine.* 308:03:113-118
- 73.- Nissen C., Moser Y., Speck B., y Bendy J. (1983). Haemopoietic Stimulators and Inhibitor in Aplastic Anemia Serum. *British Journal of Haematology.* 54:519-530
- 74.- Marmont A.M., Bacigalupo A., Van Lin M.T., Frassoni F., Podesta M., Reali G., y Piaggio G. (1984). Treatment of Severe Aplastic Anemia with High-Dose Methylprednisolone and Antilymphocyte Globulin. In: *Progress in Clinical and Biological Research, Vol. 148. Aplastic Anemia Stem Cell Biology and Advances in Treatment,* ed. Young N.S., Levine A.S., y Humphries R.K. Ed. Alan R. Liss. Inc. New York. pp 271-287
- 75.- Barr R.D., y Stevens C.A. (1982). The Role of Autologous Helper and Suppressor T Cell in the Regulation of Human Granulopoiesis. *American Journal of Hematology. USA.* 12:323-326
- 76.- Bacigalupo A., Podesta M., Frassoni F., Piaggio G., Ruffo M.R., Repetto M., Van Lin M.T., y Marmont A.M. (1984). T-Derived-Colony-Activity (Td/CIA) in Aplastic Anemia (SAA) and in Normal Donors. In: *Progress in Clinical and Biological Research, Vol. 148. Aplastic Anemia Stem Cell Biology and Advances in Treatment,* ed. Young N.S., Levine A.S., y Humphries R.K. Ed. Alan R. Liss. Inc. New York. pp 173-183
- 77.- Nakoa S., Harada M., Kondo K., OdaKo D., Ueda M., Matsue K., Mori T., y Hottori K-i. (1984). Effect of Activated Lymphocytes on the Regulation of Hematopoiesis: Suppression of In Vitro Granulopoiesis by OMT8+ Ia+ T Cell Induced by Alloantigen Stimulation. *J. Immunol.* 132:160-164
- 78.- Levitt L., Kipps T.J., Englaman E.G., y Greenberg P.L. (1985). Human Bone Marrow and Peripheral Blood T Lymphocyte Depletion: Efficacy and Effects of Both T Cell and Monocytes on Growth of Hematopoietic Progenitors. *Blood.* 65:3:663-679
- 79.- Miller A.M., Russell T.R., Gross M.A., y Yunis A.A. (1978). Modulation of Granulopoiesis: Opposing Roles of Prostaglandins F and E. *J. Lab. Clin. Med.* 92:6:983-990
- 80.- Kurland J., y Eockman R. (1978). Prostaglandin E Production by Human Blood Monocytes and Mouse Peritoneal Macrophages. *J. Exp. Med.* 147:952-957

- 81.- Kriegler A.B., Bradley T.R., y Hodgson G.S. (1984). The Effect of Prostaglandins E1 and E2 on Macrophage Progenitor Cells with High Proliferative Potential in Mouse Bone Marrow In Vitro. Blood, 63:6:1348-1352
- 82.- Burgess A., Camakaris J., y Metcalf D. (1977). Purification and Properties of Colony Stimulating Factor from Mouse Lung Conditioned Medium. J. Biol. Chem. 262:1998-2003
- 83.- Broxmeyer H.E., Smithyman A., Eger R.R., Myers P.A., y Sousa M. (1978). Identification of Lactoferrin as the Granulocyte-Derived Inhibitor of Colony Stimulating Activity Production. J. Exp. Med. 148:1052
- 84.- Broxmeyer H.E. (1984). Negative Regulators of Hematopoiesis. Long-Term Bone Marrow Culture. Ed. Alan R. Liss, Inc. pp 363-397
- 85.- Singer J.W., Brown J.E., James M.C., Doney K., Warren R.P., Storb R., y Thomas E.D. (1978). Effect of Peripheral Blood Lymphocytes from Patients with Aplastic Anemia on Granulocytic Colony Growth from HLA-Matched and -Mismatched Marrows: Effect of Transfusion Sensitization. Blood. 52:37
- 86.- Sullivan R., Quesenberry P., Parkman R., Zuckerman K., Levey R., Rappaport J., y Ryan M. (1980). Aplastic Anemia: Lack of Inhibitory Effect of Bone Marrow Lymphocytes on In Vitro Granulopoiesis. Blood. 56:4
- 87.- Robb-Smith A.H.T., y Taylor C. R. (1981). Lymph Node Biopsy. Ed. Oxford University Press. New York. pp 17
- 88.- Benacerraf B., y Pananue E. (1986). Inmunología. 2a. Edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. pp 87-89
- 89.- Mendoza J., y Cáceres J. (1986). Evidencias de que al Estimular a Fibroblastos y Células Epiteliales Murinas Producen el Inductor de Macrófagos y Granulocitos (MGI). Determinación del Peso Molecular de este Factor, así como del Producido por Macrófagos y Células Mieloides Estimuladas por el Medio Condicionado de Fibroblastos. Tesis. ENEP-Zaragoza. UNAM. México.
- 90.- Stewart C.C. (1981). Obtaining and Culturing Murine Monocytes. In: Methods for Studying Mononuclear Phagocytes, ed. Adams D.O., Edelson P.J., y Koren H. Ed. Acad. Press. New York. pp 21-32
- 91.- Mosier D.E. (1981). Separation of Murine Macrophages by Adherence to Solid Substrates. In: Methods for Studying Mononuclear Phagocytes, ed. Adams D.O., Edelson P.J., y Koren H. Ed. Acad. Press. New York. pp 179-186

### AGRADECIMIENTOS

Deseamos manifestar nuestro agradecimiento al Dr. Benny Weiss Steider, por la excelente asesoría brindada para la realización de este trabajo.

Asimismo, agradecemos a la Biol. Gloria Cabrera Pimentel, a la C.D.M.O. Julia Urdiales Ramos, al Biol. Isaac R. Zambrano Ramirez, al Biol. Ramiro Rios Gómez y al M.C. Mario Altamirano Lozano por la revisión crítica del manuscrito y sus acertadas observaciones, para mejorar la presentación de este trabajo.

Finalmente, expresamos nuestro agradecimiento a Sr. Renulfo Pedraza y al Sr. Jose Chavarria por su colaboración técnica.