

23
2-cj



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

"INDUCCION A LA APARICION DE RECEPTORES Fc
EN MONOCITOS MACROFAGOS DE MEDULA OSEA
Y CAVIDAD PERITONEAL MEDIANTE LA UTILIZA-
CION DE MEDIOS CONDICIONADOS POR
MACROFAGOS Y FIBROBLASTOS
MURINOS"

T R A B A J O
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
LETICIA LOPEZ VICENTE



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

INTRODUCCION	2
METODOLOGIA	20
RESULTADOS	27
DISCUSION	44
APENDICE	50
BIBLIOGRAFIA	56

RESUMEN

Los macrófagos son células altamente especializadas y entre sus funciones más importantes destacan la defensa del organismo contra cuerpos extraños y la secreción de factores que regulan diversas funciones fisiológicas. Durante muchos años se le atribuyó al factor inductor de macrófagos y granulocitos (MGI), la responsabilidad de la proliferación y diferenciación completa de tales tipos celulares. Sin embargo, recientemente se han descrito otros factores que tienen la propiedad exclusiva de inducir a la diferenciación. Entre ellos se encuentra el inductor a la aparición de receptores para Fc (FcRI). Este factor es secretado por macrófagos, por lo cual se presenta un interesante proceso de autoinducción a la aparición de tales receptores.

Normalmente, al realizar estudios con células mieloides se cultiva la médula ósea completa, lo cual permite a los diferentes fagocitos adherirse al sustrato de cultivo, dejando a las demás células en suspensión. Estas células adherentes resultaron ser un material excelente para estudios de inducción por FcRI, pues se encontró que el número de receptores Fc aumentaba significativamente en función del tiempo de incubación en presencia de este factor. Sin embargo, este aumento no se presentó en ausencia de las células en suspensión, o del medio condicionado (MC) por estas, por lo que se sospecha de la existencia de algún otro factor para que la inducción de dichos receptores se lleve a cabo. Para detectar el origen de este cofactor, se cultivaron por separado tanto a las células en suspensión, como al MC, con células adherentes de médula ósea tanto en presencia de MGI, de FcRI, o de una combinación de ambos. Nuestros resultados indican que sí existe un cofactor, y que es secretado durante el proceso de inducción a la proliferación para colaborar con el FcRI y el MGI en la formación de células inmunológicamente maduras. Esta compleja interacción entre los factores y las células de médula ósea abre un amplio campo de investigación sobre los mecanismos normales de diferenciación hematológica.

Por último, se discute la posibilidad de identificar a este cofactor para contribuir al entendimiento de los procesos de diferenciación celular normal, así como para poder aplicarlo en la terapia de patologías donde este tipo celular se encuentre involucrado. Es evidente que aumentando el número de células con receptores para Fc, se puede ayudar al individuo en su defensa contra cuerpos extraños.

INTRODUCCION

La sangre es uno de los mecanismos homeostáticos del cuerpo. Distribuye calor, acarrea gases respiratorios, nutrientes y desechos; fluye a través de sensores específicos capaces de regular a factores tales como la tensión osmótica, el pH, la temperatura y los niveles de ciertas hormonas. La sangre provee transporte celular entre tejidos hematopoiético, conectivo y otros tejidos y órganos. La sangre contiene los agentes celulares y humorales que controlan los efectos de tumores e infecciones en el cuerpo (1)

Aproximadamente el 45% del volumen sanguíneo consiste de eritrocitos o células sanguíneas rojas. Alrededor del 1% está formado por plaquetas y leucocitos, o células sanguíneas blancas, de las cuales existen tres tipos : linfocitos, monocitos y granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos); el resto del volumen sanguíneo lo constituye el plasma, el cual es una sustancia rica en proteínas y se considera como el líquido intercelular (1).

El tejido hematopoiético, presenta un ancestro común o célula madre, la cual durante el camino de la proliferación y diferenciación in vivo se encuentra bajo la influencia de muchos factores del ambiente local, entre los cuales podemos incluir los aspectos hormonales y ontogenéticos, la concentración de vitaminas y otras sustancias biológicamente activas, así como la interacción con células semejantes o de otro tipo (2). Se conocen como actúan parcialmente algunos de estos factores, pero solamente podemos

suponer por analogía la acción de los otros ya que es un sistema tan complejo como lo es un organismo vivo, es difícil, y ha sido casi imposible evaluar y determinar cuantitativamente el papel de cada factor en la histogénesis de los tejidos hematopoiético y linfoide (3).

Las células sanguíneas humanas tienen su origen en las primeras semanas de la vida intrauterina, la hematopoesis comienza en la segunda semana en el mesénquima embrionario y por medio de segmentos mesenquimatosos se desarrolla una red confluyente de vasos sanguíneos que se anastomosan y se dirigen hacia el saco vitelino, donde también existe hematopoesis extraembrionaria. A partir de la sexta semana de vida intrauterina, se forma un endotelio que rodea todo el sistema hematopoiético y aparecen focos germinativos en el bazo y en el hígado, que es el centro de la hematopoesis, predominando la eritropoesis, seguida por la mielopoesis y las plaquetas y por último los macrófagos. A partir de la segunda semana de vida fetal, aparece en la clavícula la médula ósea que es el centro mayor de la hematopoesis en la segunda mitad de la gestación y de la vida posnatal. La hematopoesis linfática por su lado se lleva a cabo en el timo donde se producen los linfocitos T y las células Tcadas. Después del nacimiento, decae la colonización hematopoiética del hígado y del bazo y conforme el individuo se desarrolla, la cavidad medular del esqueleto aumenta y la grasa sustituye a la mayor parte de la médula ósea activa en el esqueleto periférico (4,5,6).

Ehrlich, considerado como el padre de la Hematología moderna, ya desde 1910 hacía referencia sobre la génesis de los diferentes

tipos celulares y su relación con la médula ósea. Existen evidencias de la formación de colonias hematopoiéticas in vivo que incluyen tipos celulares múltiples provenientes de clonas las cuales derivan de una sola célula pluripotencial llamada Unidad Formadora de Colonias (UFC). Estas células dan origen a los diferentes tipos celulares existentes en el tejido hematopoiético (7,8,9,10,11).

Los leucocitos polimorfonucleares, provienen de la misma UFC e inician su diferenciación en el estroma de la médula ósea, en donde se producen los mieloblastos, derivando posteriormente a promielocitos basófilos, eosinófilos y neutrófilos, células de banda y por último polimorfonucleados. Los polimorfonucleados forman sus diferentes granulaciones probablemente bajo estímulos lisosomales (10,12,13,14,15,).

El monocito se origina en la médula ósea a partir de los promonocitos (16,17). Estas células en la médula forman una acumulación de precursores que se dividen rápidamente formando los monocitos de la sangre, en donde es frecuente (especialmente en la infección) encontrárseles en fases inmaduras (18,19). Después de pasar de uno a tres días en la sangre los monocitos se mueven hacia los tejidos en donde se transforman en macrófagos y pueden vivir semanas, o meses (19,20).

Con respecto al origen de los macrófagos existe controversia ya que por un lado la mayoría de los investigadores consideran que todos los macrófagos independientemente del sitio en el que se localicen, provienen del monocito formado en la médula ósea; por el otro lado, se han aportado evidencias de la existencia de un precursor local en cada uno de los lugares en donde se encuentren

(21).

Los macrófagos son un constituyente importante del microambiente hematopoiético. En la médula se encuentran con islas eritroblásticas, islotes linfoblásticos y en asociación con eosinófilos desarrollados y otros leucocitos, aplicados a senos vasculares y ocasionalmente libres en el lumen de un seno (22).

Los macrófagos en la superficie de los senos venosos pueden ejercer supervivencia sobre el pasaje de materiales hacia o desde los vasos para sus capilares. Los macrófagos en varias especies presentan pseudópodos e ingieren en la circulación células rojas (23); sin embargo, hay evidencia de que el papel de los macrófagos es más significativo que el de la fagocitosis. Ellos pueden estimular granulopoesis por elaboración del factor estimulador de colonias e influir en la eritropoesis para producir PBA (24). Además los macrófagos presentan isoferretinas ácidas que pueden regular granulopoesis (25,26).

Los macrófagos son células que normalmente permanecen en el tejido laxo, ingieren diversos tipos de bacterias infecciosas y también ayudan a este tejido a liberar productos resultantes de la desintegración de células o desechos de estas (4). El macrófago típico es de aproximadamente 12 μ de diámetro y tiene pequeñas proyecciones citoplásmicas periféricas (27), el centro celular puede ser eosinófilo. Además contiene una gran variedad de enzimas hidrolíticas y el citoplasma presenta fuerte evidencia de la actividad secretora con el retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi bien desarrollados. Poseen una gran cantidad de vacuolas de diversos tamaños; algunas de estas células contienen en los canales del retículo endoplásmico, la zona de Golgi y en el

espacio perinuclear estas últimas probablemente representen células residentes de la cavidad peritoneal u otras regiones (28). Los microtúbulos son particularmente evidentes cerca de la zona de Golgi, en el citoplasma existen microfilamentos de dos tipos unos de función incierta y otros que forman complejos en forma de flechas como meromiocina pesada y representan a la actina, que es la proteína contráctil del macrófago (29).

Los macrófagos constituyen un grupo diverso de monocitos involucrados en muchos papeles de la inmunidad, tanto específicos como no específicos. Numerosas investigaciones han demostrado que la interacción de los macrófagos con los linfocitos es un evento importante en la inducción y regulación de la respuesta inmune in vivo e in vitro (30).

Los macrófagos son necesarios como mediadores para la activación antígeno-específico de los linfocitos T, así como para su proliferación y es claro que el reconocimiento de antígenos proteicos solubles en el linfocito T esta usualmente precedido por un consumo inicial del antígeno por los macrófagos (31). La relación macrófago-linfocito puede ocurrir directamente por interacción célula-célula o vía secreción del complejo-antígeno o productos citofílicos solubles del macrófago para el linfocito (32,33).

Se ha enfatizado también la importancia del macrófago en la inmunovigilancia; en algunas circunstancias, los macrófagos y monocitos pueden actuar como células supresoras, o como células accesorias; los macrófagos activados tienen la capacidad de destruir células tumorales in vitro (34). Los macrófagos humanos han demostrado repetidas veces ser mediadores anticuerpo-

dependientes de la toxicidad celular para varias células blanco de la sangre (35).

Los macrófagos secretan un producto de 35 000 a 40 000 daltones que induce a la maduración funcional de timocitos in vitro, molécula que es llamada Factor Diferenciador de Timocitos. Este factor actúa sobre timocitos maduros induciéndoles algunas características estructurales y funcionales in vitro (36).

Otras funciones de los macrófagos no directamente relacionadas a la respuesta inmune son: su importante papel en el metabolismo del hierro, así como su actividad bactericida y bacteriostática in vivo e in vitro.

Los macrófagos son células secretoras de diversos factores como es el factor inductor a la proliferación de macrófagos y granulocitos (MGI), eritropoyetina, estimulantes de células B y de células T, lisozima, factor estimulador de la migración de polimorfos e interferón, entre otros (37). A través de sus secreciones y receptores, el macrófago participa en complejas interacciones implicando componentes celulares y humorales de las redes inflamatorias e inmunológicas, así como también sustancias no muy bien caracterizadas que pueden mediar o modular el tejido dañado y repararlo (38,39).

Estudios recientes han evidenciado la existencia de un factor inductor a la aparición de receptores Fc (FcRI); el cual se obtuvo a partir de una línea celular de tipo macrófágico mantenida in vitro y activada por lipopolisacáridos de la pared celular de Salmonella typhimurium (LPS). Además se encontró que este factor pierde su actividad biológica al ser sometido al tratamiento proteolítico y al calor, lo cual indica que es de naturaleza

proteica (40,41).

La diferenciación y proliferación de ciertas células hematopoiéticas depende de glicoproteínas específicas. Una de estas glicoproteínas es el MGI, también conocido como factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF).

Este factor se ha encontrado en orina humana, suero animal, muchos tejidos diferentes (42-53), líneas celulares y tumores (54-64). Recientemente se encontró que al establecer una línea celular de carcinoma escamoso de la glándula tiroides, se obtuvo una gran cantidad de GM-CSF (61).

Cabe hacer notar que entre las células más utilizadas para la producción de MGI in vitro se encuentran los macrófagos y los fibroblastos. Por otra parte el medio condicionado por fibroblastos en cultivo ha sido frecuentemente utilizado para el estudio de las propiedades moleculares de este factor, así como de su posible función fisiológica (42-64).

Hay evidencia de que el factor estimulador de macrófagos y granulocitos influye en la regulación de la granulopoesis, no solo in vitro (54,55), sino también in vivo (56,65-74).

Recientemente se encontró que al purificar MG-CSF de orina humana, no estimulaba la formación de macrófagos y granulocitos in vitro, pero al ser inyectado intravenosamente a pacientes leucocitopénicos, se observó que su nivel se incrementa en el suero. Además se vió que este factor no tiene efectos severos (75). Este dato ofrece la posibilidad de usar GM-CSF como un agente farmacológico en tratamientos de los mismos desordenes hematológicos después de la terapia de cáncer. El uso práctico depende de poseer una buena fuente para la obtención de GM-CSF.

Con respecto a la actividad de este factor existe una gran variación, ya que se obtiene de diferentes fuentes. Se ha encontrado un rango de actividad específica que va de 75 colonias/mg de proteína en orina humana (76) y 890 colonias/mg de proteína en suero de ratón tratado con endotoxinas a 60 000 colonias/mg de proteína en medio condicionado de pulmón de ratón.

Dentro de las características de este factor se encuentra que es termólabil, resistente a la acción del éter, a la desoxirribonucleasa y ribonucleasa, y en la electroforesis migra junto con la fracción de las gamma globulinas, inmediatamente después de la albumina (43).

Otro aspecto de gran importancia es su peso molecular, el cual varía de acuerdo a las fuentes de obtención, encontrando MGI con PM de 5 000 daltones, o, en el caso más extremo con PM de 200 000 daltones.

Los fibroblastos forman parte del tejido conectivo laxo, este nace de un tipo primitivo de tejido conectivo que se desarrolla en el embrión y que ha recibido el nombre de mesénquima (mesos, medio; enchyma, infusión), anteriormente se creía que todo el tejido conectivo nacía del mesodermo y gran parte así lo hace, pero otra parte, sobre todo a nivel de la cabeza, se desarrolla desde el ectodermo. El mesénquima está constituido principalmente por un tipo amorfo de sustancia intercelular con células mesenquimatosas distribuidas en toda la estructura. Cuando el embrión se va desarrollando, en los lugares donde aparecerá el tejido conectivo, las células se diferencian en diversos tipos celulares (fig 1) (4).

Por otro lado, Ross y colaboradores (4), utilizando ratas

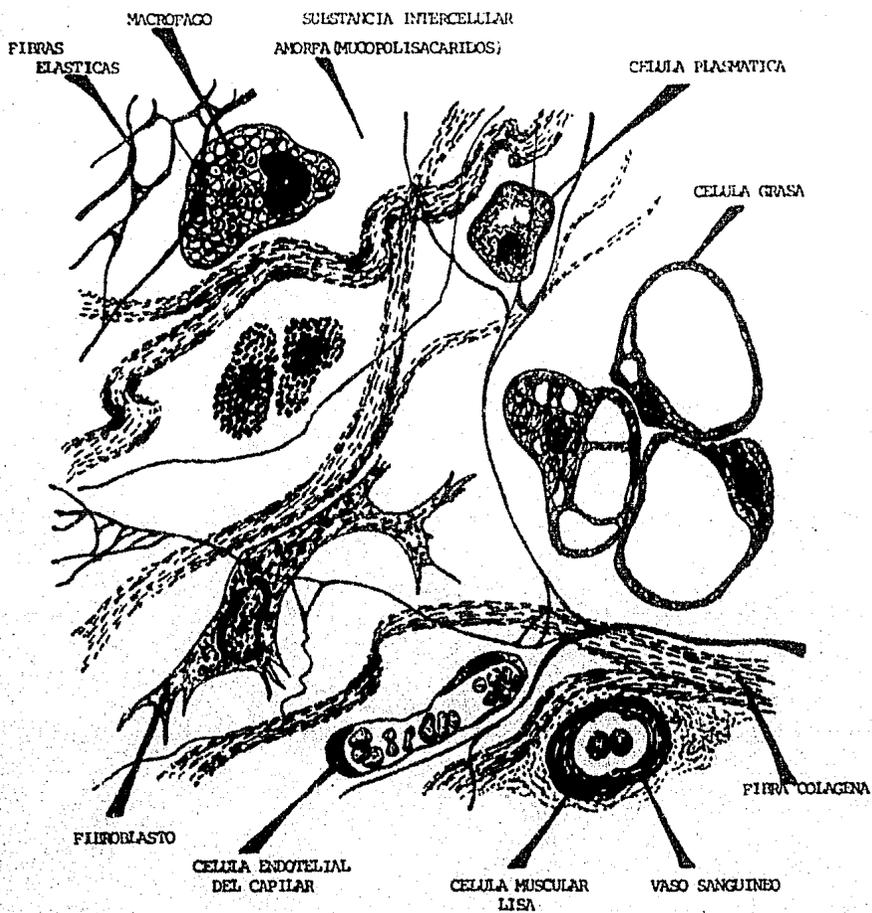


FIG. 1 REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LAS CELULAS QUE PUEDEN OBSERVARSE EN EL TEJIDO CON-
 NECTIVO LISO. LAS CELULAS SE HALLAN EN LA SUBSTANCIA INTERCELULAR .

parabióticas (ratas unidas de manera que comparten el riego sanguíneo común) han demostrado, en una experiencia muy ingeniosa, que los monocitos o cualquier otra célula de la sangre marcada con timidina, no se transforma en fibroblastos al repararse una herida. Estos autores consideran que los fibroblastos que reparan una herida son de origen local; que nacieron principalmente de células perivasculares, células algo menos diferenciadas que los fibroblastos y que pueden ser precursoras de ellos .

De los fibroblastos como su nombre sugiere, depende la formación de fibras de las que se piensan elaboran la mayor parte, o la totalidad, del componente amorfo de la matriz. Son células grandes, planas, ramificadas de aspecto fusiforme en perfil. Las prolongaciones ramificantes son delgadas. El núcleo es oval y alargado, tiene una membrana nuclear fina, uno o dos nucleolos y una cantidad pequeña de cromatina granulosa fina. En los frotis de tejido conectivo, el aspecto del núcleo es pálido, pero en el material de cortes suele aparecer contraído y teñido intensamente con colorantes básicos. En la mayor parte de las preparaciones histológicas los bordes de las células son imprecisos, y los caracteres nucleares tienen valor importante para la identificación. En los fibroblastos jóvenes, que participan activamente en la síntesis de la proteína para la producción de sustancia intercelular, el citoplasma se observa relativamente homogéneo y es basófilo, por la elevada concentración de retículo endoplásmico granuloso. Después de coloración adecuada, las mitocondrias aparecen como cilindros delgados y son numerosas cerca del núcleo, en donde también se sitúa el aparato de Golgi. En fibroblastos viejos y relativamente inactivos, el citoplasma

esta disperso y solo es débilmente basófilo, porque tiene muy poco retículo endoplásmico. A los fibroblastos maduros a veces se les denomina fibrocitos (77).

Los fibroblastos se consideran células fijas del tejido conectivo, pero pueden observar hasta su vida adulta la capacidad de crecimiento y regeneración. Cuando se estimulan, por ejemplo, en la periferia de las heridas en cicatrización o en los tejidos quemados, pueden mostrar movimiento lento de desplazamiento. El número elevado de fibroblastos que existen en una herida puede depender de que los propios fibroblastos son capaces de actuar como células madres. Sin embargo la mayor parte de los autores creen que en tales circunstancias, si bien los fibroblastos son de origen local, nacen de células algo menos diferenciadas que ellos (77).

Los fibroblastos son células secretoras y entre sus productos de secreción se encuentran dos principales: procolágena y mucopolisacáridos, algunos también proveen elastina, secretando sus productos hacia la sustancia corporal, y probablemente por diversas zonas a todo alrededor de su superficie (4).

Desde principios de 1950 cuando la actividad del anticuerpo fue por primera vez asociada con la fracción de la globulina gamma del suero, los inmunólogos han tratado continuamente de entender mejor estas moléculas enigmáticas que son el eje central en la defensa del huésped (78).

Las inmunoglobulinas son las moléculas proteicas que portan actividad de anticuerpos, es decir la propiedad de combinarse específicamente con la sustancia que provocó su formación (antígeno). Se originan como respuesta a las sustancias extrañas

introducidas en el cuerpo (79).

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas compuestas de 82-96% de polipéptidos y de 4-18% de carbohidratos. El componente polipeptídico posee casi todas las propiedades biológicas asociadas con las moléculas de los anticuerpos. Los anticuerpos son moléculas bifuncionales que se ligan de manera específica con el antígeno e inician también todo una gama de fenómenos secundarios como la fijación del complemento y la liberación de histamina por las células cebadas, que son independientes de su especificidad por el antígeno. Estas dos clases de actividad pueden localizarse por separado en alguna parte específica de la molécula: el eslabonamiento del antígeno a la acción combinada de las regiones variables (V) de las cadenas pesadas (H) y ligeras (L), y las otras actividades a las regiones constantes (C) de las cadenas H (79).

La unidad básica de la estructura de la inmunoglobulina es un complejo de cuatro polipéptidos, dos cadenas L idénticas y dos cadenas H idénticas unidas por enlaces disulfuro. La porción del amino terminal (N-terminal) de las cadenas altas y bajas difieren sustancialmente en la secuencia de aminoácidos entre especies individuales de anticuerpo. Esta región variable de la cadena alta y baja se combina para formar el sitio de unión del antígeno de una molécula de anticuerpo (80).

La porción del carboxilo terminal (C-terminal) de la cadena pesada y ligera, determinan la región constante, son idénticas o casi idénticas para anticuerpos de la misma clase. Las regiones constantes de anticuerpos circulantes son responsables de la variedad de funciones efectoras que son involucradas en la

eliminación de antígenos. Las inmunoglobulinas en el suero de los mamíferos pueden ser divididas en cinco clases en base a que la secuencia de aminoácidos difiere en la región constante de su cadena pesada. Estas clases son designadas IgM, IgA, IgG, IgD e IgE y corresponden a anticuerpos con funciones efectoras diferentes. Un ejemplo de la diversa función efectora especificada por las regiones constantes de la cadena pesada es el transporte diferencial de anticuerpos a través del tejido. Las moléculas IgA solo pueden ser transportadas a través del revestimiento intestinal en el lumen, mientras que la IgG solo a través de la placenta al feto (80).

Los componentes de la membrana celular que son capaces de combinarse con la porción Fc de las moléculas de inmunoglobulina son definidos como receptores Fc (81). Los receptores que reconocen y unen la porción Fc de la IgG han sido detectados en una amplia variedad de células incluyendo linfocitos y leucocitos polimorfonucleares. Se dice que el receptor para Fc es una propiedad adquirida por células mieloides durante su diferenciación (40,41)

Los macrófagos además, portan en su superficie receptores para el complemento y receptores no específicos para sustancias extrañas, todos estos de gran importancia biológica. Existen datos sobre la existencia de receptores para la insulina, fibrina, lacto-ferrina, linfoquinas, carbohidratos y lípidos (82).

Se sabe que el recubrimiento de bacterias con inmunoglobulinas, facilita la adherencia y fagocitosis y asimismo la acción bactericida de los macrófagos (83). El papel del anticuerpo en la mediación de la fagocitosis selectiva depende de

la unión de una región del anticuerpo a un sitio de reconocimiento o receptor, sobre la superficie del macrófago. De esta forma la porción de la inmunoglobulina que se une al macrófago es la Fc, en tanto la porción Fab une inmunoespecíficamente al microorganismo patógeno (84). Además de su función en la eliminación de cuerpos extraños, los receptores Fc de los macrófagos funcionan en la eliminación fisiológica de eritrocitos viejos o inviables (85).

La presencia de receptores Fc es evaluada hoy en día principalmente por el ensayo de rosetas, en donde eritrocitos xenógenos son cubiertos con anticuerpos (EA) y luego son expuestos a los macrófagos. La actividad del receptor Fc es indicada por la adición de eritrocitos sobre la superficie del macrófago en una configuración denominada roseta. Se cuenta con técnicas en las que si los eritrocitos son premarcados con Cr, pueden ser contados automáticamente. También se emplean conjugados de anticuerpos con fluorescencia que se unen a los macrófagos y de esta manera son contados con aparatos que separan a las células de acuerdo a su diferencia en fluorescencia (86).

El empleo de rosetas EA se ha realizado no solo en investigación básica sobre la naturaleza y función biológica de los receptores Fc, sino también a nivel clínico en el que este ensayo se utiliza como diagnóstico en la detección del cáncer cervico uterino (87).

En la actualidad se han desarrollado técnicas que se encuentran encaminadas a la evaluación más eficiente de estos receptores como son: el método de Avidina-Biotina peroxidasa este es utilizado para la determinación de receptores Fc en macrófagos aislados o en tejidos (88), y el método que emplea partículas

fluorescentes de 2-hidroxietil metacrilato con dinitrofenol y anticuerpos monoclonales antidinitrofenil de tal forma que con este se detectan receptores Fc y la fagocitosis mediada por estos receptores (89).

Se han descrito varias funciones inmunológicas de los Fc incluyendo su papel en la inmunofagocitosis, la localización particular de complejos inmunes, la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, transferencia placentaria de IgG e inhibición a la retroalimentación de síntesis de anticuerpos (90-94).

Los receptores Fc son muy sensitivos a los iones Ca^{++} contenidos en el medio (95), a los efectos de las drogas que afectan el citoesqueleto, a los cambios metabólicos y a los cambios de temperatura (96).

Recientemente se encontró que las prostaglandinas producidas por monocitos influyen en la expresión de los receptores Fc en células T humanas. Cuando se adicionan prostaglandinas de la serie E, o sobrenadantes de cultivos de monocitos se incrementa el número de células T que presentan receptores Fc.

En la actualidad el desarrollo y perfeccionamiento de la técnica de cultivo *in vitro* ha permitido mantener órganos, tejidos y células aisladas del organismo animal, asimismo es una herramienta útil que permite realizar estudios encaminados a un mejor entendimiento de los procesos celulares básicos. El principal problema al que se enfrentaron los primeros investigadores de este campo fue el encontrar medios de cultivo que contuvieran los elementos indispensables para que las células pudieran desarrollarse adecuadamente fuera del organismo.

Con este propósito se realizaron una serie de experimentos

como los trabajos de Roux quien mantuvo placa neural de pollo en una solución salina caliente (97). En 1907 Harrison cultivo in vitro células nerviosas de anfibio utilizando como medio nutritivo plasma sanguíneo (98). Debido a que se usaban como medios de cultivo fluidos y extractos de tejidos corporales, su complejidad no permitía observar el efecto de una determinada sustancia sobre el comportamiento de las células, por lo que se les llamó medios nutritivos indefinidos. Esto provocó que se dedicaran mayores esfuerzos en la búsqueda de medios de composición conocida, que permitieran establecer el efecto de las diferentes sustancias sobre las células. De esta manera en 1929, Deaker utilizó medios semidefinidos, que contenían glicina, ácidos nucleicos, glutatión y hemoglobina, suplementados con plasma humano y extracto de embrión de pollo, en los que logro matener células de sarcoma de ratón en crecimiento continuo (99).

Posteriormente, en 1959 Eagle implemento el primer medio mínimo esencial, que como su nombre lo indica contiene los elementos tanto orgánicos como inorgánicos básicos para su crecimiento celular, entre los cuales se encuentran doce de los veinte aminoácidos esenciales (100).

Después de este medio se desarrollaron otros diferentes, con el propósito de obtener condiciones óptimas de crecimiento para líneas celulares específicas, entre los que se encuentran el medio de McCoy, el cual fue usado como medio estandar para clonado celular. Más tarde este medio fue modificado y se conoce como RPMI-1629 que se utiliza para el cultivo de células mioblásticas. El medio de Ham F 10 fue elaborado especialmente para el clonado de células de ovario de Hamster, siendo generalmente suplementados

estos medios con suero, ya sea de caballo, humano o fetal de bovino, los cuales contienen promotores del crecimiento tales como hormonas y proteínas.

Asimismo aunado al desarrollo del cultivo de tejidos se establecieron las condiciones físicas óptimas para el crecimiento celular, imitando las que se presentan en el organismo de los mamíferos. Generalmente se emplea una temperatura de 37° C, una composición atmosférica de 5 a 10% de bióxido de carbono (CO₂), en el aire la cual junto con el bicarbonato del medio de cultivo permite mantener un pH entre 6.2 - 7.2, además se utiliza un ambiente húmedo a punto de rocío con el fin de evitar la evaporación de los cultivos (101).

Debido a su facilidad de obtención y de mantenimiento en cultivo, el tejido hematopoiético se ha empleado frecuentemente en investigación. Por ejemplo, como sistemas de prueba para medir efectos de diversas sustancias químicas, así como para estudios de diferenciación y proliferación celular (22).

Es innegable la importancia que tienen los receptores Fc en leucocitos para la defensa del organismo contra cuerpos extraños. En consecuencia el entendimiento de los mecanismos de la inducción a la aparición de este receptor nos dará herramientas necesarias para tratar de controlar este efecto en beneficio del organismo.

Siendo que hasta la fecha solo se ha evaluado la inducción y aparición de receptores Fc en células totales de médula ósea, se creyó conveniente evaluar esta misma cinética de inducción en poblaciones homogéneas de células como lo son los macrófagos. Esta elección de fagocitos tiene asimismo el interés de estudiar un mecanismo de autoinducción ya que también los macrófagos son

capaces de producir FcRI. En consecuencia en este trabajo se plantea la obtención de medios condicionados por macrófagos maduros ricos en FcRI y su efecto inductor en macrófagos inmaduros obtenidos tanto de la médula ósea como de la cavidad peritoneal. Además se plantea estudiar los mecanismos de autoinducción a la formación de receptores Fc en macrófagos y la determinación de la interdependencia entre el inductor de proliferación (MDI) y el factor inductor a la aparición de receptores Fc (FcRI).

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLOGICO

ANIMALES

Todos los ratones que se utilizan para la elaboración de los ensayos son hembras de la cepa CD-1 mantenidas en el bioterio de la ENEP-Zaragoza. Para las pruebas de aparición de receptores Fc y proliferación en células de médula ósea, se usan de 6 u 8 semanas de edad; para la obtención del medio condicionado donde se encuentra el factor inductor de proliferación y diferenciación celular (MGI), se cultivan riñones de ratones de 2 semanas y para la obtención del factor inductor a la aparición de receptores Fc (FcRI), macrófagos peritoneales de hembras de 12 semanas.

ERITROCITOS DE CARNERO

Los eritrocitos se obtienen de carneros machos sanos mediante sangrado de la yugular en forma aséptica, inmediatamente después se vierten en una cantidad equivalente de Alsever (Apéndice 1) para su almacenamiento a 4°C. Los eritrocitos se dejan en reposo durante una semana y se utilizan sin exceder de un mes, a partir de la fecha de extracción.

INMUNOGLOBULINA G (IgG)

Se usa inmunoglobulina G (7S IgG, Cordis Labs, USA). Se emplea en una dilución de 1:1600 en solución buffer de fosfatos (FRS) (Apéndice 2) y una vez hecha la dilución se coloca en tubos de ensayo y se conserva en congelación a -20°C hasta su uso. Debido a que la IgG diluida se desnaturaliza, cuando existen porciones restantes se desechan.

CULTIVO CELULAR

Como fuente de nutrición se usa el Medio Mínimo Esencial de Eagle (ME) con exceso de vitaminas y aminoácidos (Gibco Labs, USA) (Apéndice 3), al que se le adiciona 100 $\mu\text{l/ml}$ de penicilina G y 100 $\mu\text{l/ml}$ de estreptomina, como medida preventiva de una posible contaminación bacteriana y 3.7 g/l de bicarbonato de sodio para mantener un pH fisiológico de 7.2 en los cultivos en presencia de CO_2 . Posteriormente se filtra en membrana Millipore (Millipore, USA) con un diámetro de poro de 0.22 micras para garantizar la esterilidad del medio.

Asimismo para obtener el medio de cultivo, el ME se suplementa en algunas ocasiones con 10% de suero fetal de bovino y en otros con 10% de suero de caballo (Microlab, México), previamente desactivados durante 30 min a 56°C . Para el cultivo celular se utiliza una incubadora con temperatura constante de 37°C , humedad a saturación y una atmósfera relativa de 10% de CO_2 . Las células se siembran en la cantidad y condiciones requeridas para cada experimento en cajas de Petri, ya sea de vidrio o de

plástico desechable de 60 X 15 mm, las cuales contienen siempre un volumen final de 5 ml. Para observar las células en cultivo se utiliza un microscopio de tipo invertido (American Optical, USA).

PRUEBA DE ESTERILIDAD

Para verificar la esterilidad de las soluciones utilizadas, se colocan 3 gotas tanto en tubos de ensayo que contienen 2 ml de caldo de soya tripticasa al 3%, como con la misma cantidad de caldo de Sabouraud (Bioxon, México) previamente esterilizadas en autoclave. Se incuban las muestras durante 48 horas a 37° C y se observa si hubo proliferación de microorganismos contaminantes.

OBTENCION DE FAGOCITOS DE MEDULA OSEA

Se sacrifican ratones mediante dislocación cefalo-medular, para proceder a retirar los fémures colocándolos inmediatamente en cajas de Petri que contienen PBS. En seguida, se elimina la mayor cantidad posible de tejido muscular circundante, se cortan las epifisis con una tijera pequeña y con una jeringa de 1 ml que contiene PBS, se hace fluir el líquido de un extremo a otro del hueso para coleccionar el tejido medular en un tubo de ensayo. Las células así obtenidas se lavan con PBS por centrifugación, (tres veces a 500 g durante 3 min). Se adicionan 5 ml de medio de cultivo, se resuspende y se determina la cantidad de células con un hemocitómetro (American Optical, USA). Se siembran para cada experimento 8×10^6 células.

ELABORACION DE MEDIOS INDUCTORES

-MEDIO CONDICIONADO POR MACROFAGOS RESIDENTES (MCHacR)

Se sacrifica al animal y para extraer las células de la cavidad peritoneal se inyectan 10 ml de PBS, dándole un ligero movimiento con el objeto de suspender la mayor cantidad de células y poder recuperarlas al extraer el PBS. En seguida se coloca el exudado en un tubo cónico de plástico, el cual se mantiene en hielo para evitar hasta donde sea posible la adhesión de los fagocitos a sus paredes. Posteriormente se repite el proceso de extracción de macrófagos residentes con 5 ml más de PBS. Las células así obtenidas se lavan por centrifugación, se resuspenden en 5 ml de medio de cultivo para proceder al conteo celular. Se siembran 4×10^6 células en caja de Petri de vidrio (Pyrex, USA), se incuban durante una hora con la finalidad de que los fagocitos se adhieran al recipiente de cultivo, y se retira el medio en el que van todas aquellas células no adheridas. En seguida se adicionan 5 ml de medio de cultivo nuevo y 10 μ l (de la solución stock 1 μ g/ml) de lipopolisacáridos provenientes de la pared celular de Salmonella typhimurium (LPS)(Sigma Chem., USA), se incuba por 4 días, se recogen los medios condicionados y se centrifugan a 500 g por 5 minutos para eliminar las células en suspensión. Se almacena el sobrenadante a -20°C hasta su uso.

-MEDIO CONDICIONADO DE FIBROBLASTOS DE RIÑON (MCF).

Para obtener los fibroblastos de riñón, se sacrifica al ratón, se hacen dos incisiones dorso-laterales, se abre la piel y luego la capa muscular, posteriormente se jalan y cortan los

riñones los cuales se colocan en cajas de Petri con PBS a 37 °C, enseguida se les quita la corteza. Se fraccionan en pedacitos lo más pequeños posible y todo el macerado se resuspende en 10 ml de PBS, para ser colocado en un matraz Erlenmeyer con 30 ml de tripsina al 0.25% (Sigma Chem., USA) (Apéndice 4), se agita en parrilla magnético durante 10 min a velocidad media, se desecha el sobrenadante y se agregan 30 ml de tripsina, se agita entre 30 y 45 min más, hasta que la solución se vea turbia. En seguida todo el contenido se pasa a través de un tamiz fino de nylon, se coloca en un tubo y se lava por centrifugación, finalmente se resuspende en medio de cultivo para el conteo celular. Se siembran en cajas de Petri de vidrio 1.5 y 2.5 X 10⁶ células. Al cabo de 4 y 8 días dependiendo de la saturación de las cajas de cultivo, se procede a recoger el medio condicionado (MCF) para posteriormente centrifugarlo y almacenarlo a -20 °C hasta su uso.

-MEDIO CONDICIONADO POR PULMON (MCP).

Se inyectan ratones por vía intravenosa con 0.1 ml de PBS conteniendo 5 µl de lipopolisacáridos de Salmonella typhimurium (sigma, USA). Después de tres horas se sacrifican a los animales, se les extirpan los pulmones colocándolos en tubos de ensayo de 50 ml de ME posteriormente se incuban durante 48 horas, se separan los pulmones del medio condicionado mediante centrifugación a 1 000 g durante 15 minutos, se conserva hasta el momento de su uso a -20 °C.

PREPARACION DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS CON ANTICUERPO (EA).

Se toma 1 ml de eritrocitos de carnero y se lavan por centrifugación. Al botón se le agregan 4 ml de IgG y un volumen igual de PBS, se mezcla e incuba por 30 min a 37°C. Se centrifuga durante 3 min, se desecha el sobrenadante y se lava una vez más para eliminar el exceso de anticuerpo, finalmente se resuspende en 8 ml de PBS. El EA así preparado se conserva a 4°C hasta el momento de su uso, (nunca después de 5 días).

TECNICA PARA LA EVALUACION DE RECEPTORES Fc.

Se utilizan células de médula ósea después de 4 días de incubación, se revisan los cultivos en el microscopio invertido, y en seguida de corroborar visualmente el buen estado general, se procede a separar las células adheridas al sustrato. Para ello se utiliza un gendarme de hule y junto con las células que se encuentran en suspensión se colocan en tubos de ensayo. Se lavan mediante centrifugación y se adiciona 1 ml de PBS. Se procede a agregarles 100 ul de EA y se resuspende para posteriormente centrifugar a 500 g durante 5 min. Posteriormente de una incubación de 30 min en baño de agua a 37°C y para evaluar el porcentaje de células con receptores para Fc se determina el porcentaje de rosetas EA en un hemocitómetro. Se considera como roseta a aquel leucocito que tiene más de tres eritrocitos adheridos a su membrana celular. Las evaluaciones del porcentaje de las células con receptores de membrana se hacen al contar un mínimo de 200.

Para llevar a cabo esta técnica en células adheridas al

sustrato, se procede a retirar de los cultivos todo el sobrenadante y a lavar las cajas en 3 ocasiones con PBS a 37°C, en seguida se agrega 1,5 ml de PBS y 0.5 de EA para después incubar durante 30 minutos a 37°C. Se eliminan los eritrocitos no adheridos mediante un lavado con PBS, para finalmente fijar y teñir (Apéndice 5).

Cuando se evalúan únicamente las células en suspensión, se retiran estas de las cajas de cultivo y se ponen en tubos de ensayo para lavar por centrifugación. Posteriormente se agregan un ml de PBS y 100 µl de EA, se centrifuga y se incuba durante 30 minutos a 37°C, y se procede al conteo de células con receptores para Fc.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DEL MCMacR.

Para determinar la actividad biológica del MCMacR que contiene el factor inductor a la aparición de receptores Fc (FcRI), se procede a cultivar 8×10^6 células de médula ósea en cajas de Petri de plástico (Durango Vale, México), y se adicionan 100 µl de MCMacR. Estas células en presencia del inductor se incuban durante 4 días para luego realizar la evaluación del porcentaje de células con receptores Fc.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DEL MCF.

Para determinar la actividad biológica del MCF que contiene el factor inductor a la proliferación de macrófagos y granulocitos (MGI), se procede a cultivar 8×10^6 células de médula ósea en

cajas de Petri de plástico a las cuales se les agrega 20% de MCF de 4 u 8 días. Después de 4 días se procede a evaluar la proliferación mediante un conteo celular.

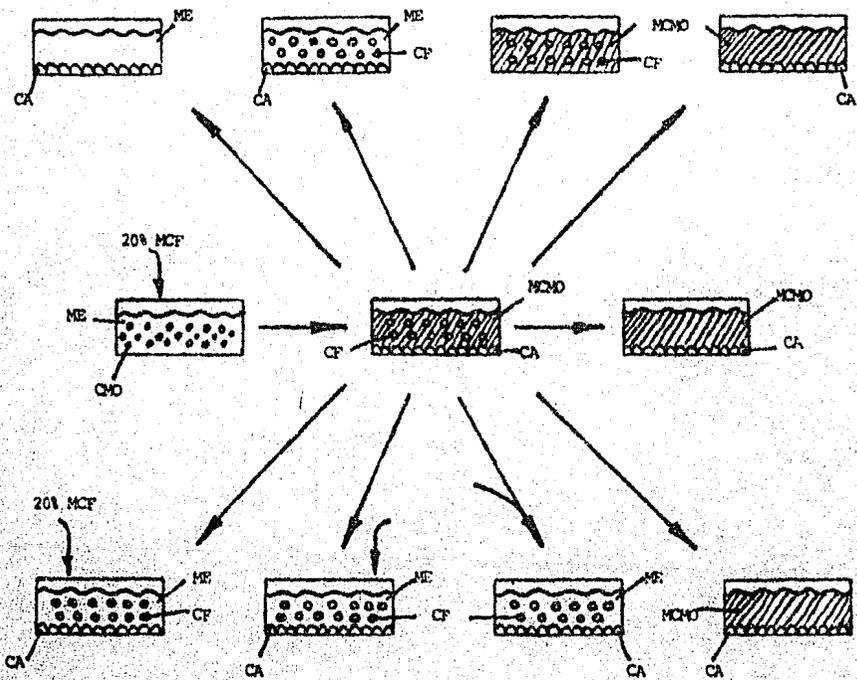
CULTIVO DE CELULAS NO ADHERENTES DE MEDULA OSEA.

Se siembran 8×10^6 células de médula ósea en cajas de Petri de vidrio en presencia de 20% de MCF durante dos días, se recolectan tanto las células en suspensión como el medio condicionado (MCMO) para ponerlos en cultivo durante dos días más. Finalmente se evalúa la cantidad de células con receptores Fc (Fig. 2)

EVALUACION DE LA INTERACCION DE CELULAS ADHERENTES, CELULAS FLOTANTES Y EL MCMO PARA LA INDUCCION DE RECEPTORES Fc POR MCF.

-CULTIVO DE CELULAS ADHERENTES CON EL MCMO.

La eliminación de células flotantes se hace después de dos días de cultivo. Para ello se centrifugan las células flotantes y el MCMO y se regresa solo el sobrenadante a las cajas de cultivo en donde se encuentran las células adherentes, las cuales a su vez fueron lavadas tres veces con PBS (Fig. 2)



ME : MEDIO MINIMO ESENCIAL DE EAGLE
 MO : CELULAS DE MEDULA OSEA
 CF : CELULAS FLOTANTES
 CA : CELULAS ADHERENTES

MCF : MEDIO CONDICIONADO POR FIBROBLASTOS
 McMacR : MEDIO CONDICIONADO POR MACROFAGOS
 MI : MEZCLA DE INDUCTORES
 MCMO : MEDIO CONDICIONADO DE CELULAS DE MEDULA OSEA

FIG. 2 DIAGRAMA DE FLUJO

RESULTADOS

PRODUCCION DEL FACTOR INDUCTOR A LA APARICION DE RECEPTORES Fc (FcRI) POR MACROFAGOS RESIDENTES DE LA CAVIDAD PERITONEAL.

Debido a que los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal (MacR) al ser estimulados in vitro por lipopolisacáridos (LPS) bacterianos secretan el factor FcRI (43), y con la finalidad de obtener suficiente medio condicionado (MC) por dichas células (MCMacR) y así disponer del factor para la realización de ensayos posteriores; se cultivaron los fagocitos estimulándolos con 10 µg/ml de LPS provenientes de la pared celular de Salmonella typhimurium. Al cabo de 4 días se colectaron 4 diferentes MCMacR (subíndice 1,2,3 y 4) y con el propósito de determinar la existencia del factor FcRI en ellos, se procedió a agregar 100 µl de cada uno a cultivos de células de médula ósea y después de 4 días se les evaluó la aparición de receptores Fc. En el primer ensayo se encontró a todos los MCMacR activos, induciendo al menos 10% más de células con receptores para Fc que el control (8%) (Tabla 1), siendo el más alto el MCMacR2 con 22% de células con receptores Fc. En un segundo ensayo el control fue de 23% y una vez más todos los MCMacR fueron activos, aunque en esta ocasión la diferencia entre el control y el MCMacR de actividad más baja fue de 7% más de fagocitos con receptores Fc (Tabla 1).

T A B L A 1

INDUCCION A LA FORMACION DE RECEPTORES PARA Fe EN CELULAS DE MEDULA OSEA POR MEDIOS CONDICIONADOS DE MACROFAGOS RESIDENTES DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATON

Ensayo	Células con receptores para Fe (%)				
	Control	MCMacR ₁	MCMacR ₂	MCMacR ₃	MCMacR ₄
1	8	18	32	21	19
2	23	32	32	29	30

Control: Ensayos sin MCMacR.

MCMacR : Medio condicionado por macrófagos residentes de la cavidad peritoneal estimulados con LPS.

PRODUCCION DEL FACTOR INDUCTOR A LA PROLIFERACION Y DIFERENCIACION DE MACROFAGOS Y GRANULOCITOS (MGI) POR FIBROBLASTOS DE RINON MURINO.

Se sabe que el MGI es secretado por diversos tipos celulares (35-63), entre ellos los fibroblastos; por esta razón se cultivaron fibroblastos de riñón murino para usar su MC (MCF) como fuente del factor, con la finalidad de determinar las condiciones idóneas de su obtención se cultivaron tanto 1.5 como 2.5×10^6 fibroblastos y se espero 4 y 8 días respectivamente, tiempo en el cual los cultivos visualmente habían llegado a saturación.

Nuestros resultados mostraron una actividad inductora similar para todos los MCF obtenidos (Tabla 2).

CINETICA DE APARICION DE RECEPTORES Fc EN MACROFAGOS DE MEDULA OSEA

Una vez confirmado que en nuestras condiciones de cultivo el MCF estimula la proliferación de células de médula ósea y que el MCMacR induce la aparición de receptores Fc en estas, puede suponerse que si poner MCF (que contiene MGI) a cultivos de médula ósea se estimulará la proliferación de nuevos macrófagos los cuales secreten FcRI. Teniendo en cuenta lo anterior se cultivaron células de médula ósea durante 1,2 y 4 días en

T A B L A 2

INDUCCION A LA PROLIFERACION DE CELULAS DE SEÑALA OSEA POR EL FACTOR INDUCTOR DE MACROFAGOS Y GRANULOCITOS, PROCEDIENTE DE FIBROBLASTOS DE RIÑON MURINO

Ensayo	Proliferación Celular (X10 ⁴)	
	MCF ₄	MCF ₈
1	296	325
2	250	300

MCF₄ : Medio condicionado de fibroblastos durante 4 días.

MCF₈ : Medio condicionado de fibroblastos durante 8 días.

presencia de MCF y se evaluó el porcentaje de células con rosetas EA que se encontraban en suspensión, así como el de aquellas adheridas al sustrato de cultivo. Simultáneamente se determinó la población celular a lo largo de todo el experimento.

Al realizar el conteo celular se encontró, a los cuatro días de cultivo en presencia del inductor (MCF), un aumento de 225 y 208 $\times 10^4$ células, en comparación con los controles que presentaron 125 y 142 $\times 10^4$ células en el primer y segundo ensayos respectivamente (Tabla 3), observándose que la población iba disminuyendo a medida que pasaba el tiempo esto es un fenómeno normal en cultivo de médula ósea ya que muchas células mueren durante los primeros días (Tabla 3).

Por otro lado se observó que había un aumento en el porcentaje de células adherentes con receptores para Fc en función del tiempo de cultivo en presencia de MCF (Tabla 3); para el primer ensayo se obtuvo 1, 14 y 58% de células con receptores para Fc y en el segundo ensayo se confirmó dicho aumento con 3, 13 y 55%, a los 1, 2 y 4 días respectivamente. En los dos ensayos se puede observar que el porcentaje más alto fue para 4 días de cultivo y representa aproximadamente el doble del porcentaje de células con receptores en los testigos (Tabla 3).

El porcentaje de receptores que presentaron las células flotantes fue para el primer ensayo 0, 3 y 7% a los 1, 2 y 4 días, mientras que en el segundo ensayo se obtuvieron 4, 5 y 11%. Los cultivos controles presentaron 5 y 6% de células con receptores en

T A B L A 3
 CINÉTICA DE APARICIÓN DE RECEPTORES PARA Fe EN MACROFAGOS DE MEDULA ÓSEA
 INDUCIDOS POR MCF

Ensayo	Cultivo (días)	Cuento Celular (x10 ⁴)	Células con receptores para Fe (%)	
			Células en Suspensión	Células Adherentes
1	1	780	0	1
	2	510	3	14
	4	349	7	58
	4*	125	5	24
2	1	740	4	3
	2	552	5	13
	4	349	11	55
	4*	142	6	30

* : Control de los ensayos sin MCF.

el primer y segundo ensayo respectivamente. Aunque en los dos ensayos puede notarse un leve incremento en el porcentaje de receptores respecto al control, en general es muy pequeño al compararlo con el que presentan las células adherentes (Tabla 3).

En resumen, nuestros resultados muestran que el mayor porcentaje de receptores Fc se encuentra en las células adherentes al sustrato; asimismo se observó que a partir del segundo día había un incremento significativo en el porcentaje de receptores Fc, siendo este aumento paulatino y alcanzando el valor máximo a los 4 días de cultivo. Por lo tanto en presencia de MCF incrementa la proliferación y también aumenta el número de células adherentes con receptores para Fc.

EVALUACION DE LA APARICION DE RECEPTORES Fc EN MACROFADOS DE MEDULA OSEA EN PRESENCIA DE MCF, MCMacR Y MEDIO CONDICIONADO POR PULMON ENDOTOXICO (MCP).

Una vez que se encontró que en presencia de MCF existía un incremento del número de células con receptores para Fc, se procedió a evaluar si el MCMacR también era capaz de inducir receptores Fc en ausencia de MCF. Por lo anterior, diferentes cultivos de médula ósea fueron incubados en presencia de uno u otro inductor, obteniéndose una actividad semejante para el MCF y el MCMacR, con un 48 y 51% de células adherentes con receptores Fc respectivamente, en comparación con el control que presentó una actividad de 31% (Tabla 4). Al realizar un segundo ensayo nuestros resultados se confirmaron, encontrándose un 58 y 52 y 27% de

T A B L A 4

EVALUACION DE RECEPTORES Fe EN PRESENCIA DE MCF, MCMacR Y MCP

Medios Condicionados	Células con receptores para Fe (%)	
	Ensayo 1	Ensayo 2
-----	31	27
MCF	51	58
CAM ₂	24	29
MCMacR	48	52
MCP	49	54

- : Control de los ensayos sin medio condicionado de fibroblastos.
- MCF : Células de médula ósea en presencia de medio condicionado de fibroblastos.
- CAM₂ : Células adherentes más medio condicionado de dos días.
- MCMacR: Células de médula ósea en presencia de medio condicionado de macrófagos.
- MCP : Células de médula ósea en presencia de medio condicionado de pulmón.

células con receptores; para MCF, MCMacR y el control respectivamente.

Además, al cultivar células de médula ósea con MCF, el cual contiene tanto inductor para la formación de rosetas EA (semejante a la contenida en MCMacR) como inductor de la proliferación celular (similar al contenido en MCF) (43), se encontraron en ambos ensayos valores similares a los de MCMacR y MCF (Tabla 4).

Una vez determinado que en los cultivos de cuatro días con los diferentes inductores aumenta el número de células adherentes con receptores, fué interesante evaluar si era necesario la presencia de las células en suspensión, así como del medio condicionado por todo el cultivo para que este incremento se lleve a cabo. Por lo anterior, se procedió a cultivar células de médula ósea en presencia de MCF y a los dos días se retiraron tanto células flotantes como el MC, permitiendo a las células adherentes continuar en cultivo con medio nuevo durante dos días más. Se encontró que el porcentaje de células con receptores se abatió observando solo un 24 y 29% para el primer y segundo ensayo en comparación con los controles de 4 días con MCF que presentaron 51 y 58%. Cabe mencionar que estos bajos valores son semejantes a los encontrados en los controles sin ningún inductor que presentaron 31 y 27% respectivamente (Tabla 4).

INDUCCION POR MCF DE RECEPTORES PARA Fc EN CELULAS ADHERIDAS AL
SUBSTRATO DE CULTIVO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE LAS CELULAS EN
SUSPENSION.

Debido a que al retirar las células flotantes, las adherentes sufren una menor inducción de rosetas EA y con el propósito de averiguar si existe una interrelación entre ambos tipos celulares para que dicha inducción se lleve a cabo, en esta ocasión a los dos días de cultivo con MCF se lavaron y regresaron las células flotantes en medio de cultivo nuevo, para permitir una interacción ininterrumpida entre las células en ausencia del MC. Dos días después se observó que el porcentaje de células adherentes con receptores se abate respecto al control positivo (48 y 44%), presentando únicamente 34 y 19% en el primer y segundo ensayo respectivamente (Tabla 5).

Asimismo, se colocaron dos controles negativos, el primero con la finalidad de evaluar la inducción en ausencia de las células flotantes lo constituyeron cultivos de médula ósea en presencia de MCF por dos días, al cabo de los cuales se les retiró tanto el MC como las células flotantes, para agregarles exclusivamente medio de cultivo nuevo por dos días más. El segundo se efectuó con cultivos sin MCF. El ensayo fue repetido en dos ocasiones obteniéndose 37 y 25%, y 35 y 28% respectivamente (Tabla 5). Siendo que al retirar el MC por dos días de los cultivos de médula ósea se abate la inducción de receptores Fc, nuestros resultados indican que la presencia de este MC es necesaria para que dicha inducción se lleve a cabo.

T A B L A 5

INDUCCION DE RECEPTORES Fe EN CÉLULAS ADHERENTES EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE LAS CÉLULAS EN SUSPENSIÓN

Medios Condicionados	Células con receptores para Fe (%)	
	Ensayo 1	Ensayo 2
---	35	26
MCF	48	44
CAN ₂	37	25
CAF	34	19

--- : Control de los ensayos sin medio condicionado de fibroblastos.

MCF : Células de médula ósea en presencia de medio condicionado de fibroblastos.

CAN₂ : Células adherentes con medio condicionado de dos días.

CAF : Células adherentes con células en suspensión.

DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE RECEPTORES PARA Fc EN CELULAS FLOTANTES DE MEDULA OSEA AL SER SUBCULTIVADAS

Tomando en consideración que al retirar el MC secretado a los dos días de cultivo por células de médula ósea en presencia de MCF la inducción de receptores en células adherentes disminuye; y con la finalidad de detectar si las células flotantes podrían ser inducidas por este MC, se procedió a cultivarlas durante dos días más en ausencia de las adherentes encontrándose porcentajes mucho más bajos que el control sin MCF (26 y 25%); de 10 y 11% en el primer y segundo ensayo respectivamente (Tabla 6). Los resultados anteriores indican que probablemente exista una interrelación entre células adherentes y las flotantes para que la inducción a la aparición de receptores Fc se lleve a cabo.

EVALUACION DE LA INTERACCION ENTRE CELULAS ADHERENTES, CELULAS FLOTANTES Y SU MEDIO CONDICIONADO PARA LA INDUCCION DE RECEPTORES Fc POR MCF EN CULTIVOS DE MEDULA OSEA.

Puesto que al retirar el MC de los cultivos de médula ósea en presencia de MCF la inducción a la aparición de receptores Fc disminuye y con la finalidad de determinar si exclusivamente este MC es el causante de dicha disminución, se cultivaron células de médula ósea para a los dos días retirarles las células flotantes y dejar por dos días más solo las adherentes con el MC obteniéndose que al igual que en ausencia de las células en suspensión la inducción se abate con valores semejantes al negativo sin MCF (Tabla 7).

T A B L A 6

DETERMINACION DE RECEPTORES Fc EN CELULAS FLOTANTES DE MEDULA OSEA AL SER SUB-
CULTIVADAS DESPUES DE DOS DIAS DE CULTIVO

	Células con receptores para Fc (%)	
	Ensayo 1	Ensayo 2
---	26	25
HCF	43	45
CACM	15	15
CS	10	11

--- : Control de los ensayos sin medio condicionado de fibroblastos.

HCF : Células de médula ósea en presencia de medio condicionado de fibroblastos.

CACM : Células adherentes con cambio de medio.

CS : Células en suspensión subcultivadas durante dos días.

Debido al hecho de que al retirar el MC y dejar solo las células flotantes el porcentaje de inducción se abate, se colocaron tres cultivos de médula ósea a los que se les retiró a los dos días solo el MC permitiendo continuar al cultivo dos días más en presencia de medio nuevo y factores inductores que podrían sustituir al MC. Al primer cultivo se le añadió MCF como fuente de MGI, al segundo MCMacR que contiene FcRI y al tercero una mezcla de estos dos inductores, encontrándose 40, 30 y 53% de células con receptores para Fc (Tabla 7). Como el cultivo con mayor porcentaje de inducción fue aquel que contenía la mezcla de los inductores suponemos que ambos se encuentran en el MC, no obstante es importante señalar que esta inducción de 53% fue muy inferior a la presentada por el control positivo (77%). Mas aún, el MC debe contener algún elemento adicional al MGI y FcRI para una inducción óptima.

Análogamente, a cultivos de médula ósea con MCF se les retiraron solo las células flotantes dejando sus MCs y la presencia de MCF, MCMacR y una mezcla de ambos para evaluar si estos eran capaces de sustituirlas para inducir la aparición de receptores Fc. Se obtuvo que únicamente en los cultivos con MCF y MCF más MCMacR existió una inducción mayor a la del negativo sin inductores (Tabla 7). Sin embargo vale la pena hacer notar que la inducción fue mucho mayor y semejante al control positivo cuando se empleo la mezcla de ambos inductores (72%), que cuando se uso solo MCF (54%). En consecuencia nuestros resultados indican que las células flotantes son una fuente de MGI y FcRI y que ambos

T A B L A 7
EVALUACION DE LA INTERACCION ENTRE CELULAS ADHERENTES, CELULAS FLOTANTES Y SU
MEDIO CONDICIONADO PARA LA INDUCCION DE RECEPTORES Fc POR MCF EN CULTIVOS DE
MEDULA OSEA

	Células con receptores para Fc (%)	
	Ensayo 1	Ensayo 2
CAN ₂	30	11
CT	44	22
MCF ₄	77	50
CFF	40	11
CFR	30	18
CFER	53	38

T A B L A 7
(continuación)

CAM ₂ F	56	40
CAM ₂ R	29	19
CAM ₂ FR	72	45
CAF ₂	78	48
CACM	47	10

CAM₂ : Células adherentes más medio condicionado de 2 días.

CFF : Células flotantes más MCF.

CFR : Células flotantes más MCMacR.

CFFR : Células flotantes más MCF y MCMacR.

CAM₂F : Células adherentes más medio condicionado de 2 días y MCF.

CAM₂R : Células adherentes más medio condicionado de 2 días y MCMacR.

CAM₂FR : Células adherentes más medio condicionado de 2 días, MCF y MCMacR.

CAF₂ : Células adherentes más MCF y CAM₂.

factores son necesarios para que una óptima inducción de receptores Fc en células adherentes se lleve a cabo.

Los controles consistieron en cultivar células de médula ósea sin inductor (control negativo), así como con MCF durante 4 días (control positivo), presentándose un 44% y 77% de células adherentes con receptores para Fc.

Siendo que el tratamiento de lavado hecho para retirar ya sea las células flotantes o el MC de los cultivos pudiera ser un factor que afecte el proceso de inducción de la aparición de receptores Fc se procedió a cultivar células con MCF a los que a los dos días se les retiraron las células en suspensión y su MC; y en seguida de un lavado les fueron regresados, encontrándose un porcentaje muy similar al valor positivo (78%), de aquí puede concluirse que el tratamiento de lavado no altera el proceso de inducción. Además se colocó un control extra al que después de dos días con MCF se le retiraron tanto células flotantes como su MC, dejándolo continuar por dos días más en medio nuevo y se obtuvo un 47% de células adherentes inducidas, valor que es muy semejante al control negativo. De la misma manera se procedió a repetir este ensayo y se encontraron valores similares a los encontrados para el primer ensayo, lo cual corrobora nuestras suposiciones.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Durante muchos años se le asocio al factor inductor a la proliferación y diferenciación de macrófagos y granulocitos (MGI), la capacidad de llevar a dichos tipos celulares a un proceso completo de maduración, sin embargo recientemente se han encontrado otros factores que colaboran en el proceso de la diferenciación celular completa. Entre estos factores podemos mencionar a los inductores de la aparición de receptores Fc (FcRI) y C3 (C3RI) en las membranas plasmáticas de diferentes tipos de fagocitos. Cabe hacer notar la existencia de un interesante mecanismo de autoinducción mediado por los macrófagos de la cavidad peritoneal de ratón mediante el cual estos son capaces de sintetizar y secretar al medio de cultivo tanto MGI como FcRI y C3RI.

Tomando en consideración que por lo general en todos los ensayos de diferenciación mieloide se utiliza médula ósea completa, se plantea la interrogante de si el MGI y el FcRI son suficientes para garantizar la existencia de células inmunológicamente maduras, o si algún otro factor es necesario para este fin. Durante el desarrollo de este trabajo se encontró que para la diferenciación completa de fagocitos provenientes de la médula ósea, era necesario además de la presencia de MGI y FcRI, otros factores producidos por células de la médula ósea

durante el proceso de inducción a la diferenciación. Evidentemente estos resultados abren un amplio campo de investigación acerca de los procesos normales de diferenciación mielóide, que bien entendidos incidirán en la comprensión de los procesos de enfermedad en donde dichas células estén involucradas.

Aunque el MGI ha sido detectado en medios condicionados por un gran número de células cultivadas in vitro, se creyó conveniente utilizar para el presente trabajo el producido por fibroblastos, ya que estas células se encuentran íntimamente ligadas en el organismo y producen factores capaces de inducción recíproca. Como fuente de FcRI se utilizó aquel producido por los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal por ser esta la única célula sanguínea que lo produce (102). Por último, como una fuente natural que contenga MGI y FcRI se utilizó el medio condicionado por pulmón endotóxico, el cual se sabe contiene estos dos factores en grandes cantidades.

En nuestros resultados encontramos que tal y como era de esperarse al ensayar los diferentes medios condicionados de fibroblastos durante 4 días (MCF4), o durante 8 días (MCF8) se presentó un aumento en la proliferación celular con respecto al control. Los valores fueron similares para los dos medios condicionados empleados, lo cual indica que no importa la cantidad de células de tipo fibroblástico que se siembren inicialmente, sino de que el cultivo haya llegado a saturación.

En nuestras condiciones experimentales se encontró que el mayor porcentaje de células de médula ósea con receptores para Fc lo presentaron las células adheridas al sustrato y que este aumentaba durante el tiempo de incubación, llegando a un máximo a los 4 días de cultivo. Suponemos que el aumento de células adherentes con receptores para Fc era el resultado de la aparición de nuevas células de tipo macrofágico inducidas por el efecto del MGI sobre los precursores mieloides, aunado al efecto del FcRI procedente de las mismas células adherentes.

Aunque existió una inducción a la proliferación celular cuando se utilizó MCF (que contiene solo MGI) o MCP (que contiene MGI y FcRI), el porcentaje de células adherentes con receptores para Fc fue semejante al encontrado con MCMacR (que contiene solo FcRI), lo cual parece indicar que no es absolutamente necesaria la presencia de FcRI para que la inducción se lleve a cabo y que por otro lado tampoco es indispensable la presencia del MGI. Estos resultados nos hacen pensar que el MGI al producir macrófagos maduros induce en forma indirecta la producción de FcRI y que por el otro lado estos fagocitos maduros son a su vez susceptibles a la acción del FcRI, aún en ausencia del MGI.

A la luz de nuestros resultados se podría suponer ya sea que durante el proceso normal de diferenciación se secretan factores que son indispensables para que este mecanismo se efectúe en su totalidad, o que existan células no adherentes cuya presencia sea absolutamente necesaria. En consecuencia, y tomando en consideración que son necesarios dos días de incubación para que

la mayoría de las células adherentes se adosen al sustrato de cultivo, se considero pertinente eliminar ya sea el MC, las células en suspensión, o las células adherentes al cabo de estos dos días y continuar los cultivos para determinar si el proceso de inducción de receptores Fc se llevaba a cabo en la ausencia de cualquiera de ellos. Encontramos que tanto al eliminar el MC, las células en suspensión, o las células adherentes (al subcultivar las células en suspensión junto con el MC) la inducción de receptores para Fc no se efectuaba. En consecuencia supusimos que debe existir una interacción entre células adherentes, células en suspensión y el MC para que este mecanismo de inducción se lleve a cabo.

Para determinar si el FcRI, el MGI o la mezcla de ambos pudiesen sustituir al MC, o a las células en suspensión, se utilizaron células adherentes en presencia de uno de estos elementos y los diferentes factores inductores. Se encontró que en presencia de ambos factores existió inducción y que esta era mayor cuando se utilizó el MC, que cuando se emplearon las células en suspensión. Sin embargo también existió una inducción muy semejante a la encontrada con la mezcla de factores en ausencia de MC, cuando se utilizó el MCF junto con el MC. En consecuencia suponemos que es probable la existencia en el MC de algún factor (cofactor) que colabore con FcRI en la inducción de receptores para Fc.

Sería conveniente tratar de identificar al cofactor de la inducción de receptores para Fc, determinar sus propiedades

moleculares, e identificar la función que pueda tener in vivo. De esta forma no únicamente se contribuiría al entendimiento de los procesos de diferenciación normal hacia células inmunocompetentes, sino facilitaría la identificación de algún tipo de anomalía que pudiese presentarse en el ser humano. Por otro lado el estudio de la posibilidad de aplicar este cofactor en forma terapéutica para aumentar el número de células con receptores para Fc y así ayudar al individuo a la defensa contra cuerpos extraños, queda abierto.

APENDICE 1

SOLUCION ALSEVER

Es una solución isotónica anticoagulante, preservativa que permite el almacenamiento de sangre entera a temperatura de refrigerador (4°C) por alrededor de diez semanas.

Los eritrocitos se utilizan durante cuatro semanas (un mes), después de su extracción.

El pH de la solución estéril debe ser de 6.1

Se disuelven los ingredientes sucesivamente en agua destilada (H₂O) y la solución resultante se autoclave a 15 libras durante 15 minutos.

Dextrosa	20.50 g.
Citrato de sodio dihidratado	8.00 g.
Acido cítrico monohidratado	0.55 g.
Cloruro de sodio	4.20 g.
Agua destilada	1000.00 lt.

APENDICE 2

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS

Esta solución se usa para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante períodos cortos.

La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes fueron diluidos en un volumen final de 1 000 ml de agua bidestilada.

Cloruro de magnesio	0.1 g
Cloruro de calcio	0.1 g
Cloruro de sodio	8.0 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Fosfato monoácido de sodio	2.16g
Fosfato diácido de potasio	0.2 g

El cloruro de magnesio y el de calcio se disuelven en 100 ml de agua bidestilada. Las sales restantes, por separado se diluyen en 800 ml de agua bidestilada y después se adiciona los 100 ml que contienen los cloruros. Posteriormente, se ajusta a un volumen final de 1 000 ml y esta solución se ajusta a un pH de 7.2 a 7.4, utilizando HCl 8N. Finalmente se esteriliza la solución por medio de filtros de membrana (Millipore, USA) con un diámetro de poro de 22 μ , la solución se almacena a una temperatura de 4°C hasta el momento de su uso.

APENDICE 3

MEDIO MINIMO EBENCIAL DE EAGLE

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

AMINOACIDOS	mg/l
L-Arginina	84.00
L-Cistina	62.57
L-Glutamina	584.00
Glicina	30.00
L-Histidina HCl.H ₂ O	422.00
L-Isoleucina	105.00
L-Leucina	105.00
L-Lisina.HCl	146.00
L-Metionina	30.00
L-Fenilalanina	66.00
L-Serina	42.00
L-Treonina	95.00
L-Triptófano	16.00
L-Tirosina (Sal Disódica)	104.20
L-Valina	94.00

VITAMINAS mg/l

D-Ca Pentotenato	4.00
Acido Fólico	4.00
Inositol	7.20
Nicotinamida	4.00
Piridoxal.HCl	4.00
Riboflavina	0.40
Tiamina	4.00

SALES INORGANICAS

Cloruro de calcio anhidro	200.00
Nitrato de fierro III nonahidratado	0.10
Cloruro de potasio	400.00
Sulfato de magnesio anhidro	96.67
Cloruro de sodio	6400.00
Fosfato monosódico monohidratado	125.00

OTROS COMPUESTOS

L-Glucose	4500.00
Rojo fenol	15.00

En 950 ml de agua bidestilada, se diluye el medio en polvo agitando ligeramente, se adicionaron 3.7 g/l de bicarbonato de sodio, además los antibióticos como penicilina G 100 U/ml y estreptomycin 100 mcg/ml. Posteriormente se afora a un volumen de 1000 ml y se agita hasta disolver, sin sobreagitar. El medio fue ajustado a un pH de 6.9 y después se filtra con filtros Millipore (Millipore, USA) con un tamaño de poro de 22 μ . Finalmente el medio se almacena a 4 C hasta el momento de su uso.

APENDICE 4

TRIPSINA

La tripsina se prepara en verseno a una concentración de 0.25%, para preparar el verseno se agregan a 800 ml de agua bidestilada, las siguientes sustancias:

Tris base	3.04 g
Cloruro de sodio	8.00 g
Cloruro de potasio	0.40 g
Etilen-diamin-tetra-acético(EDTA)	0.20 g

Posteriormente se agita, se afora a un litro con agua bidestilada se ajusta el pH a 7.7 con ácido clorhídrico 10 N y se esteriliza por medio de autoclave a 20 lb durante 20 min.

Una vez preparado el verseno se procede a pesar 0.25 g de tripsina y se diluye en 100 ml de verseno esta solución se esteriliza por medio de un filtro millipore de 20 micras de diámetro, esta solución preparada se conserva en congelación a 20°C hasta su uso.

APENDICE 5

TENIDO DE CELULAS ADHERENTES

Se lavan las cajas de cultivo con PBS a 37°C en tres ocasiones para retirar el exceso de EA y posteriormente se fijan y tiñen las células por medio de la técnica Metanol-Giemsa, con el primero permanecen 2 minutos y con el giemsa al 10% se tiñen durante 10 minutos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Weiss L. 1977 The blood, en: Histology, (Weiss L. ed.), Mc Graw Hill, New York, pp. 432.
- 2.- Moore M. A. 1978 Regulation of granulopoiesis in vitro, Academic Press, New York, pp. 32.
- 3.- Bradley T., Stanley E. and Summer A. 1971 Factor from mouse bone marrow cells in vitro Aust. J. Exp. Biol. Sci., 49:595.
- 4.- Ham W. A. 1985 Tratado de histología, Interamericana, Mex. D.F., pp. 190.
- 5.- Globstein C. 1967 Mechanisms of organic tissue interaction, Mat. Cancer Inst. Mongr., 26:279.
- 6.- Hilman R., Finch A. C., Boggs R. F., Winkelstein A. and Jarder A. L. 1977 Manual de Hematología, El Manual Moderno, Mex. D.F., pp. 1.
- 7.- Backer A. J., McCulloch E. A. and Till J. E. 1963 Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells, Nature, 197:452.
- 8.- Curry J. L. and Trentin J. J. 1967 Hematopoietic spleen colony studies. I. Growth and differentiation, Dev. Biol., 15:395.
- 9.- Leavell S. B. and Thorup A. O. 1978 Hematologia clinica, Interamericana, Mex. D.F., pp. 1.
- 10.- Trentin J., Wolf M. and Ceng V. 1967 Antibody production by mice populated with limited numbers of clones of lymphoid cell precursors, J. Immunol., 98:1326.
- 11.- Waheed A. and Shadduk K. R. 1979 Purification and properties of cell-derived colony-stimulating factor, J. Lab. Clin. Med., 94:180.
- 12.- Dexter T. M., Spencer E., Jendry J. and Lajtha G. 1978 Stem cells in vitro, en: Haemopoietic cell differentiation, (David W., Golde, Cline M. J., Metcalf D. and Fox C. P., ed.), Academic Press, New York, pp. 163.
- 13.- De Robertis E. D. 1976 Biología celular y molecular, El Ateneo, Mex. D.F., pp. 10.
- 14.- Pluznik D. and Sachs L. 1965 The cloning of normal mast cells, en: Tissue culture, J. Cell. Comp., 55:319.

- 15.- Stanley E. R. and Metcalf D. 1969 Partial purification and some properties of the factor in normal and leukemic human urine stimulating mouse bone marrow colony growth in vitro, Aust. J. Exp. Biol. Med., 47:467.
- 16.- Williams N. and Eger R. R. 1978 Purification and characterization of clonable murine granulocyte-macrophage precursor cell populations, (David W., Golde, Cline M. J., Metcalf D. and Fox F., ed), Academic Press, New York, pp. 385.
- 17.- Wintrobe M. M., Les G. R., Behell C. T., Athens J. E., Boggs D. R. and Foerster J. 1965 Clinical hematology, Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 3.
- 18.- Brainton D. F. and Furguhar M. G. 1966 Origin of the granules in polymorphonuclear leukocytes, J. Cell. Biol., 28:277.
- 19.- Davidson I. and Nelson D. A. 1978 Sangre en diagnóstico clínico para el laboratorio, (Davidson I. and Henry J. B., ed), Salvat, Barcelona, pp. 155.
- 20.- Dacie J. 1975 Practical hematology, Churchill Livingstone, New York, pp. 15.
- 21.- Volkman A. and Gowans J. L. 1965 The origin of macrophages from bone marrow in the rat, Brit. J. Exp. Pathol., 46:62.
- 22.- Irons R. D. 1985 Toxicology of the blood and bone marrow, Raven Press., New York, pp. 5.
- 23.- Allen T. D. 1981 Haemopoietic microenvironments in vitro: ultrastructural aspects, en: Microenvironments in haemopoietic and lymphoid differentiation, Ciba Foundation Symposium, Pitman, London, pp. 38.
- 24.- Lethija A., Davis S. and Trubowitz S. 1979 Bone marrow adipose tissue response to starvation, Am. J. Hematol., 6:191.
- 25.- Bentley S. A. 1982 Bone marrow connective tissue and the haemopoietic microenvironment, Br. J. Hematol., 50:1.
- 26.- Birgens H. S., Ebbes N. E., Karle M. and Kristensen L. O. 1983 Receptor binding of lactoferrin by human monocytes, Br. J. Haematol., 54:383.
- 27.- Carr I. 1973 The macrophage, en: A review of ultrastructure and function, Academic Press., New York, pp. 8.
- 28.- Daems W., Wisse E., Brederoo P. and Emeis J. J. 1975 Peroxidatic activity in monocytes and macrophages, en: Immunity infection and pathology (R. Van Furth ed.) Blackwell, London, pp. 57.

- 29.- Allison A. D. and De Petris P. S. 1971 Role of contractile microfilaments in macrophage movement and endocytosis, *Nature New Biol.*, 232:153.
- 30.- Unanue E. R. and Calderon J. 1975 Evaluation of the role of macrophage in immune induction, *Fed. Proc.*, 34:1737.
- 31.- Waldron D. A., Horn R. G. and Rosenthal A. S. 1973 Antigen induced proliferation of guinea pig lymphocytes *in vitro*; Obligatory role of macrophages in the recognition of antigen by immune T lymphocytes, *J. Immunol.*, 111:58.
- 32.- Rosenthal A. S., Barenski M. A. and Rosenwasser L. J. 1978 Function of macrophages in genetic control of immune responsiveness, *Fed. Proc.*, 37:79.
- 33.- Rosenthal A. S., Lipsky F. E. and Shevach E. M. 1975 Macrophage lymphocyte interaction and antigen recognition, *Fed. Proc.*, 34:1743.
- 34.- Lee K.C. and Berry D. 1977 Functional heterogeneity in macrophages activated by *Corynebacterium parvum*, and: Characterization of subpopulations with different activities in promoting immune response and suppressing tumor cell growth, *J. Immunol.*, 118:1530.
- 35.- MacDonal H. R., Bonnard G.P., Sordat B. and Zarvonik S. A. 1975 Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; heterogeneity of effector cells in human peripheral blood, *Scand. J. Immunol.*, 4:487.
- 36.- Beller D. I., Farr A. G. and Unanue E. R. 1978 Regulation of lymphocyte proliferation and differentiation by macrophages, *Fed. Proc.*, 37:91.
- 37.- Allison A. and Davies P. 1975 Increased biochemical and biological activities of mononuclear phagocytes exposed to various stimuli with reference to secretion of lysosomal enzymes, and: Mononuclear phagocytes in immune infection and pathology (R. Van Furth ed.), Blackwell, London, pp. 487.
- 38.- Unanue E. R. and Cerrotini J. C. 1970 The immunogenicity of antigen bound to the plasma membrane of macrophage, *J. Exp. Med.*, 131:711.
- 39.- Gordon S., Unkeless J.C. and Cohn Z. A. 1975 In the macrophage as secretory cell. Immune recognition, Rosenthal, Academic Press., New York, pp. 598.
- 40.- Rabellino E. M., Roos G. D., Trang H. TK., Williams N. and Metcalf D. 1978 Membrane receptors of mouse leukocyte and phagocytic capacity during leukocyte differentiation, *J. Exp. Med.*, 147:434.

- 41.- Lotem J. and Sachs L. 1979 Different blocks in the differentiation of myeloid leukemic cells, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 71:3507.
- 42.- Brown CH III. and Carbone F. P. 1971 In vitro growth of normal and leukaemic human bone marrow, J. Natl. Cancer Inst., 46:989.
- 43.- Calcagno M., Perez J., Waldo M., Cabrera G. and Weiss-Steider B. 1982 Evidence of the existence of a factor that induces Fc receptors on bone marrow cells, Blood, 59:756.
- 44.- Chervenick P. A. and Lo Buglio A. F. 1972 Human blood monocytes: stimulators of granulocyte and mononuclear colony formation in vitro, Science, 17:164.
- 45.- Das S. K., Stanley E. R., Guilbert L. J. and Forman L. W. 1981 Human colony-stimulating factor (CSF-1) radioimmunoassay: resolution of three subclasses of human colony-stimulating factor, Blood, 58:630.
- 46.- Douglas I. and Pickering B. 1977 The effect of various sources of colony-stimulating activity on normal human marrow in agar culture, Exp. Cell. Res., 104:95.
- 47.- Fojo S. S., Wu M-C. and Gross M. A. 1978 Purification and characterization of a colony stimulating factor from human lung, Biochem., 17:3109.
- 48.- Golde D. W., Findley T. N. and Cline M. J. 1972 Production of colony stimulating factor by human macrophages, Lancet., 2:1397.
- 49.- Inoue S. and Ottenbreit M. J. 1978 Heterogeneity of human colony-forming cells, Blood, 51:196.
- 50.- Pike B. L. and Robinson W. A. 1970 Human bone marrow colony growth in agar gel, J. Cell. Physiol., 76:77.
- 51.- Quesenberry P. and Gimbrone M. 1980 Vascular endothelium as a regulator of granulopoiesis: production of colony-stimulating activity by cultured human endothelial cells, Blood, 56:1060.
- 52.- Ruscetti F. W., Chou J. Y. and Gallo R. C. 1982 Human trophoblasts: cellular source of colony-stimulating activity in placental tissue, Blood, 59:86.
- 53.- Wu A. M. 1979 Properties and separation of T-lymphocyte growth stimulatory activity (TL-GSA) and granulocyte-macrophage colony-stimulating activity (GM-CSA) produced separately from two human lymphocyte subpopulations, J. Cell. Physiol., 101:237.

- 54.- Metcalf D. 1973 Regulation of granulocyte and macrophage proliferation by colony stimulating factor (CSF): a review, *Exp. Hematol.*, 1:185.
- 55.- Burgess A. and Metcalf D. 1980 The nature and action of granulocyte macrophage colony-stimulating factors, *Blood*, 56:947.
- 56.- Kimura N., Niho Y. and Yanese T. 1982 A high level of colony-stimulating activity in a lung cancer patient with extensive leucocytosis and the establishment of CSA producing cell line (KONT), *Scand. J. Haematol.*, 28:417.
- 57.- Sato N., Asano S., Ueyama Y., et. al. 1979 Granulocytosis and colony-stimulating activity (CSA) produced by a human squamous cell carcinoma, *Cancer*, 43:605.
- 58.- Di Fersio J., Brennan J., Lichtman M. and Speiser B. 1978 Human cell lines that elaborate colony-stimulating activity for the marrow cells of men and other species, *Blood*, 51:507.
- 59.- Lusis A., Quon D. and Golde D. 1981 Purification and characterization of human T-lymphocyte-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *Blood*, 57:13.
- 60.- Maeda M., Ichikawa Y. and Asuma I. 1980 Differentiation and production of colony-stimulating factor induced by immunostimulants in a leukemia cell line, *J. Cell. Physiol.*, 105:33.
- 61.- Okabe T., Nomura H. and Oshawa N. 1982 Establishment and characterization of a human colony-stimulating factor-producing cell line from a squamous cell carcinoma of the thyroid gland, *J. Natl. Cancer Inst.*, 69:1235.
- 62.- Sakai N., Shikita M., Tsunooka K., Reshio M. and Hirashima K. 1984 Macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor separated from fibrosarcoma tissue in mice, *Gann*, 75:355.
- 63.- Tarrella C., Ruscelli F., Polesz B., et. al. 1982 Factors that affect human hemopoiesis are produced by T-cell growth factor dependent and independent cultured T-cell leukemia-lymphoma cells, *Blood*, 59:1330.
- 64.- Wu. M. C., Cini J. and Yunis A. 1979 Purification of colony-stimulating factor from cultivated pancreatic carcinoma cells, *J. Biol. Chem.*, 254:6226.
- 65.- Asano S., Urabe A., Okabe T., et. al. 1977 Demonstration of granulopoietic factor(s) in the plasma of nude mice transplanted with a human lung cancer and in the tumor tissue, *Blood*, 49:845.

- 66.- Asano S., Sato N., Mori M., et. al. 1980 Detection and assessment of human tumors producing granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), heterotransplantation into nude mice, *Br. J. Cancer*, 41:689.
- 67.- Dale D. C., Brown C. H., Carbone P, et. al. 1971 Cyclic urinary leukopoietic activity in grey collie dogs, *Science*, 173:152.
- 68.- Mengelick A. and Robinson W. A. 1973 Cyclic neutropenia: the relationship between urine granulocyte colony stimulating activity and neutrophil count, *Blood*, 41:79.
- 69.- Metcalf D. and Stanley E. R. 1971 Haematological effects in mice of partially purified colony stimulating factor (CSF) prepared from human urine, *Br. J. Haematol.*, 21:481.
- 70.- Moore M. A. S., Spitzer G., Metcalf D, et. al. 1974 Monocyte production of colony stimulating factor in familial cyclic neutropenia, *Br. J. Haematol.*, 27:47.
- 71.- Sato N., Asano S., Ueyama Y., et. al. 1979 Granulosisstosis and colony-stimulating activity (CSA) produced by a human squamous cell carcinoma, *Cancer*, 43:605.
- 72.- Shadduk R., Waheed A., Greenberger J, et. al. 1983 Production of colony-stimulating factor in long-term bone marrow cultures, *J. Cell. Physiol*, 114:88.
- 73.- Suda T., Miura Y., Mizoguchi H., Kubota K. and Takaku F. 1980 A case of lung cancer associated with granulocytosis and production of colony-stimulating activity by the tumor, *Br.J. Cancer*, 41:980.
- 74.- Zinzar S. N., Svet-Moldavsky G. J., Fogh J. et. al 1985 Elaboration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human tumor cell lines and normal urothelium, *Exp. Hematol.*, 13:574.
- 75.- Motoyoshi K., Takaku F. and Miura Y. 1983 High serum colony-stimulating activity of leukocytopenic patients after intravenous infusions of human urinary colony-stimulating factor, *Blood*, 62:685.
- 76.- Metcalf D. 1974 Control of proliferation in animal cells (Clarkson B. and Baserga R. eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 887.
- 77.- Lesson R. and Lesson T. S. 1977 *Histologia Interamericana*, Mex. D. F., pp. 108.
- 78.- Hanly W. C. 1980 Immunogloblin genetics, structures and funtion, Department of preventive medicine and community health, University of Illinois at the Medical Center, Chicago Illinois, pp. 109.

- 79.- Fudenberg H. H. 1985 *Inmunología básica y clínica*, El Manual Moderno, S. A., Mex. D. F., pp. 13.
- 80.- Hood L. E., Wood W. B., Wilson J. H. et. al. 1984 *Immunology*, Benjamin Cummings, California, USA, pp. 2.
- 81.- Sandor M., Fust G., Medgyesi G. A. et. al. 1979 The heterogeneity of Fc receptors on human peripheral mononuclear blood cells, *Immunology*, 38:553.
- 82.- McKeever F. E. and Spicer S. S. 1980 *Surface receptors of mononuclear phagocytes, en the reticulo endothelial system Vol. 1*, (Carr I. and Daems W. T, ed), Plenum Press.
- 83.- Reynolds H. Y. 1982 *Pulmonary host defenses in rabbits after immunization with Pseudomonas antigens: The interaction of bacteria, antibodies, macrophages and lymphocytes*, *J. Infect. Dis.*, 130:5.
- 84.- Diamond B. 1974 *Site of binding of mouse IgG2b to the Fc receptor on mouse macrophages*, *J. Exp. Med.*, 150:721.
- 85.- Knyszynski A. 1977 *Association and dissociation of aggregated IgG from rat peritoneal macrophages*, *J. Exp. Med.*, 145:1368.
- 86.- Schwartz R. H. 1976 *Studies of Ia antigens on murine peritoneal macrophages*, *Scand. J. Immunol.*, 5:731.
- 87.- Wagner D. and Noltenius H. W. 1983 *Clinical evaluation of the EA-rossette test in the early detection of cervical cancer*, *Acta Cytologica*, 27:4.
- 88.- Elner V. M., Hass A. J., Davies H. R. et. al. 1983 *An avidin-biotin-peroxidase method for Fc receptors macrophages isolated from and in sections of rat lung*, *J. Histochemistry*, 31:9.
- 89.- Fornusek L., Kopecek J. and Vetvicka M. 1983 *An advantageous method for detection of Fc-receptor and for studying Fc-receptor-mediated phagocytosis*, *Immunology Letters*, 7:29.
- 90.- Kerbel R. S. and Davies A. J. 1974 *The possible biological significance of receptors on mammalian lymphocytes and tumor cells*, *Cell*, 3:105.
- 91.- Dorrington K. J. 1976 *Properties of the Fc receptor on macrophages and monocytes*, *Immunol. Commun.*, 5:263.
- 92.- Schlamowitz M. 1976 *Membrane receptors in the specific transfer of immunoglobulins from mother to young*, *Immunol. Commun.*, 5:481.
- 93.- Dickler H. R. 1976 *Lymphocyte receptors for immunoglobulin*, *Adv. Immunol.*, 26: 167.

- 94.- Ryan J. L. and Henkart P. A. 1976 Inhibition of B lymphocyte activation by interaction with Fc receptors, Immunol. Commun., 5:545.
- 95.- Mantovani B. 1981 Phagocytosis of immune complexes mediated by IgM and C3 receptors by macrophages from mice treated with glycogen, J. Immunol., 126:127.
- 96.- Uher F., Dobronyi I. and Gergely J. 1981 IgM-Fc receptor-mediated phagocytosis of rat macrophages, Immunology, 42:419.
- 97.- Roux W. and Beitrage Z. E. 1961 Mechanick des embryo en: Reymond, C., Methods of tissue culture, Paul B. Hoeber, New York, pp. 1.
- 98.- Harrison R. G. 1961 Observation on the living developing nerve fiber, en: Reymond, C., Methods of tissue culture, Paul B. Hoeber, New York, pp. 2.
- 99.- Baker L. E. 1929 The chemical nature of the sustances required for cell multiplication II. The action of glutation, hemoglobin, and ash of liver on the growth of fibroblast, J. Exp. Med., 49:163.
- 100.- Eagle H. 1959 The specific amino acid requirements of human carcinoma cell (Strain Hells), en: Tissue culture, J. Exp. Med., 102:37.
- 101.- Taylor W. G. 1981 Electrolites dissolved grasses, buffers and pH changes in tissue culture, en: The growth requirements of vertebrates cells in vitro, Waymonth Press Syndicate of the University of Cambridge, New York, pp. 94.
- 102.- Fragoso Jimenez T. A. and Arciga Granados M. A. Identificación y caracterización de inductores a la formación de receptores Fc y C3 en órganos murinos y suero y orina humana, Tesis, Enep Zaragoza, pp. 68.

AGRADECIMIENTOS

Deseo hacer constar mi agradecimiento al Dr. Benny Weiss Steider y a la Biol. Ma Teresa Corona Ortega por su apoyo, dirección y consejos, los cuales hicieron posible la realización de este trabajo.

Por otra parte, doy gracias a la Biol. Gloria Cabrera Pimentel, Biol. Teresita del Niño Jesús Marín Hernández y al M en C. Mario Altamirano Lozano por la revisión del manuscrito así como por sus acertadas y útiles observaciones, para mejorar la presentación de este trabajo.

También expreso mi gratitud a los señores Renulfo Pedraza y José Chavarría por su colaboración técnica.