

227 207



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION DE LAS PROPIEDADES DIFERENCIADORAS DEL INDUCTOR DE MACROFAGOS Y GRANULOCITOS DE MACROFAGO EN PRECURSORES MIELOIDES DE MEDULA OSEA

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 I  
LUIS SANCHEZ SANCHEZ

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1969



## **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.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## INDICE

### RESUMEN

ANTECEDENTES-----	1
DERIVACION DE LAS CELULAS SANGUINEAS----	2
MADURACION DEL NEUTROFILO-----	10
FUNCION DE LOS NEUTROFILOS-----	12
MADURACION DEL MONOCITO-----	16
FUNCION DEL MONOCITO-----	19
INMUNOGLOBULINAS-----	22
RECEPTORES Fc-----	25
CROMATOGRAFIA-----	28
INTERLEUCINA 1-----	29
MATERIALES Y METODOS-----	31
RESULTADOS-----	37
DISCUSION-----	60
APENDICE I-----	68
APENDICE II-----	70
APENDICE III-----	70
APENDICE IV-----	71
BIBLIOGRAFIA-----	72

## ABSEVIATURAS

MGI-----INDUCTOR DE MACROFAGOS Y GRANULOCITOS  
CSF-----FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS  
CSA-----ACTIVIDAD ESTIMULADORA DE COLONIAS  
MC-----MEDIO CONDICIONADO  
MCF-----MEDIO CONDICIONADO POR FIBROBLASTOS  
MCE-----MEDIO CONDICIONADO POR CELULAS EPITELIALES  
MC-MacR-----MEDIO CONDICIONADO POR MACROFAGOS RESIDENTES  
MC-MacI-----MEDIO CONDICIONADO POR MACROFAGOS INDUCIDOS  
CFU-----UNIDAD FORMADORA DE COLONIAS  
CFUs-----UNIDAD FORMADORA DE COLONIAS DEL BAZO  
Fc-----FRACCION CRISTALIZABLE DE LAS INMUNOGLOBULINAS  
ME-----MEDIO DE EAGLE  
SAF-----SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS  
SC-----SUERO DE CABALLO  
EA-----ERITROCITOS ACTIVADOS CON ANTICUERPO

## RESUMEN

Se sabe que los macrófagos tienen la capacidad de secretar una gran variedad de sustancias con funciones específicas. De tales sustancias, el Factor Estimulador de Colonias (conocido por sus siglas en Inglés CSF (Colony Stimulating Factor)), es uno de los más estudiados debido a que éste desempeña un papel regulador en el proceso de proliferación y/o diferenciación de células mieloides. El presente trabajo se realizó con la finalidad de contribuir en la determinación de algunos de los efectos diferenciadores del CSF de macrófagos sobre los precursores mieloides murinos.

Se encontró que los macrófagos residentes (MacR) de la cavidad peritoneal de ratón y una línea celular de tipo macrofágica murina (WR19M.1), pueden secretar al medio de cultivo (Medio Condicionado) dos moléculas con la propiedad de inducir un cambio morfológico de precursores granulocíticos neutrófilos y de incrementar la actividad fagocítica inespecífica de estos mismos.

Al determinar el peso molecular encontramos dos pesos moleculares distintos, uno de 45,000 daltones y otro de 17,000 daltones aproximadamente. La molécula encontrada en la fracción de 45,000, aparenta tener un efecto a la proliferación y/o diferenciación de neutrófilos en médula ósea total, mientras que la molécula encontrada en la fracción de 17,000, sólo estimula la diferenciación.

Cuando se comparó el efecto que tiene la molécula de 45,000 daltones con el efecto que tiene el Factor Estimulador de Colonias Granulocíticas (G-CSF), se encontró que ambos presentan un efecto similar al ser probados en cultivos de médula ósea total tanto en líquido como en agar.

El efecto que tiene la interleucina 1 (IL-1) sobre la inducción a la proliferación de timocitos del timo de ratón, fue comparado con la molécula de 17,000 daltones presente en el medio condicionado, ambas presentaron un efecto similar, lo que posiblemente indica, que la molécula de 17,000 daltones sea la misma que la IL-1, ya que presentan el mismo efecto a la proliferación sobre timocitos, un peso molecular semejante y son secretadas por el mismo tipo celular.

## ANTECEDENTES

Las células sanguíneas humanas tienen su génesis en las primeras semanas de la vida intrauterina, la hematopoyesis comienza en la segunda semana de vida intrauterina 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 hematopoyesis extraembrionaria. A partir de la sexta semana de vida intrauterina, se forma un endotelio que rodea todo el sistema hematopoyético y aparecen focos germinativos en el bazo y en el hígado, que es el centro principal de la hematopoyesis, predominando la eritropoyesis, seguida por la mielopoyesis y la megacariopoyesis, y por último los macrófagos. A partir de la segunda semana de vida fetal, aparece en la clavícula la médula ósea (MO), que es el centro más importante de la hematopoyesis en la segunda mitad de la gestación y de la vida posnatal. Después del nacimiento, decae la hematopoyesis 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 MO activa en el esqueleto periférico (1, 2, 3).

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 MO (1, 4). Existen evidencias de la formación de colonias hematopoyéticas in vivo que incluyen tipos celulares múltiples provenientes de clones, las cuales derivan de una sola célula pluripotencial llamada Unidad Formadora de Colonias (UFC). Estas células dan origen según esta teoría a los diferentes tipos celulares existentes en el tejido hematopoyético (4, 5, 6, 7, 8).

## DERIVACION DE LAS CELULAS SANGUINEAS

Las células sanguíneas maduras tienen una vida limitada, y con la excepción de los linfocitos, las demás células son incapaces de renovarse por sí mismas. El reemplazamiento de células hematopoyéticas periféricas gastadas, es la función de los elementos primitivos denominados células tallo. Las células tallo se caracterizan por su habilidad para diferenciarse a distintas líneas celulares con funciones especializadas, y su habilidad para regenerarse por sí mismas lo que permite mantener el compartimento de células tallo.

A partir de la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos desarrolladas durante el siglo pasado (9), varios investigadores han ideado métodos para averiguar cuales son las moléculas implicadas en la proliferación y diferenciación celular (10). En el inicio de este siglo se introdujo la técnica de cultivo en agar, esta matriz semisólida permite la separación de células, lo que facilita el estudio del proceso de diferenciación celular a partir de los precursores indiferenciados (11). Al llevarse a cabo la división celular y ante el impedimento de la migración, se produce la formación de grupos celulares denominados colonias (12, 13).

Destacan los trabajos de Fluznick y Sachs en 1965 (14) y de Bradley y Metcalf en 1966 (15), en el que lograron el cultivo de precursores hematopoyéticos, de los cuales se obtuvo colonias de macrófagos o granulocitos, o bien, colonias mixtas de ambos tipos celulares hematopoyéticos en agar. En estos trabajos se hizo evidente que no bastaban las condiciones nutricionales habituales, sino que era necesaria la presencia de inductores para la formación y proliferación de las células y la subsecuente formación de colonias (11, 16). Desde un principio, a este estimulante o inductor a la formación de colonias de macrófagos y granulocitos *in vitro*, se le llamó MGI (del inglés, Macrophage and Granulocyte Inducer) (17) o CSA (del inglés, Colony Stimulating Activity), actualmente se emplea CSF (del inglés Colony Stimulating Factor) (9, 18, 19, 20). Al llevarse a cabo el



estudio de este factor, se encontró que consta de varias unidades con actividad simultánea que permite la proliferación y diferenciación de los precursores mieloides (21, 22). Existen tres formas distintas de CSF, las cuales difieren en su cualidad de inducir colonias de macrófagos (CSF-M) (23), granulocitos (CSF-G) (24), o de ambos tipos celulares (CSF-MG). Además existe otra forma llamada MGI-2, que provoca exclusivamente la diferenciación de las células precursoras de macrófagos y/o granulocitos.

Al realizar el estudio bioquímico de los CSF, se ha encontrado que tienen propiedades de glucoproteína, ya que es termolábil, resistente a la acción del éter, de la desoxirribonucleasa y ribonucleasa y sensible a la acción proteolítica de la tripsina. Al efectuar la electroforesis de las moléculas, se encuentra que migran inmediatamente después de la albúmina y junto con la gama globulina (25, 26).

Varios autores han determinado el peso molecular del CSF, los cuales presentan una alta heterogeneidad que depende del tipo de tejido o células en estudio, obteniendo pesos que van desde 3,000 daltones (27) hasta 200,000 daltones (28). Asimismo, se ha encontrado que casi todos los tejidos del organismo en humanos y ratones son capaces de producir CSF, cuya actividad llega a ser en ocasiones idéntica a pesar de la diferencia en los pesos moleculares. Este comportamiento puede deberse a una rápida respuesta del organismo ante una invasión patógena, aunque surge la cuestión del porqué de la heterogeneidad en los pesos moleculares del CSF, ya que todos tienen la misma función. Esto último se ha tratado de explicar al suponer que los CSF de menor peso molecular son algunas subunidades de moléculas de mayor peso (28, 29, 30, 31). Es obvio que se deben realizar más estudios para confirmar o rechazar esta hipótesis.

Hay que considerar que el fenómeno de proliferación y diferenciación no es un proceso aislado, sino que está incluido dentro de un mecanismo de regulación en el que intervienen sustancias inhibitoras de la proliferación, como son la lactoferrina (32, 33), prostaglandinas, chalconas y otras

moléculas encontradas en medios condicionados por células maduras (33). Ante esto, es evidente que tal mecanismo de regulación tiene la capacidad de provocar un aumento de células sanguíneas en caso de ser necesario (por ejemplo en infecciones bacterianas), o bien, inhibir esta proliferación en determinados casos (por ejemplo en las neoplasias)

Han sido propuestas dos teorías divergentes sobre las células tallo, la teoría monofilética y la teoría polifilética. La teoría monofilética propone una célula precursora común, la célula tallo pluripotencial, que bajo la influencia de factores humorales desconocidos, puede dar origen a cada una de las principales líneas celulares sanguíneas. La célula pluripotencial es capaz de renovarse por sí misma, proliferar, y diferenciarse a todas las líneas celulares hematopoyéticas. En contraste, la teoría polifilética propone que existe una célula tallo única para cada uno de los tipos celulares sanguíneos. Esta teoría propone que cada célula tallo monopotencial es capaz de diferenciarse exclusivamente a un sólo tipo de célula sanguínea. Un arreglo entre estas dos teorías extremas, fue el proponer que existen varias células tallo, aunque algunas tienen el potencial para desarrollarse a más de un tipo celular sanguíneo.

Las evidencias clínicas y experimentales que ahora existen, apoyan fuertemente la teoría monofilética. Con base en estas evidencias, las células hematopoyéticas pueden ser divididas en tres compartimentos celulares dependientes de la madurez.

En orden de maduración, estos compartimentos son; 1- células multipotenciales primitivas capaces de renovarse por sí mismas y diferenciarse a todas las líneas celulares sanguíneas, 2- células progenitoras comprometidas destinadas a desarrollar a diferentes líneas celulares, 3- células maduras con funciones especializadas que disminuyen la capacidad a proliferar (34).

Till y McCulloch en 1961 demostraron el potencial de células tallo puras al repoblar el bazo de ratones fuertemente irradiados con todas las líneas celulares sanguíneas. Los ratones fueron letalmente irradiados para destruir todas las células hematopoyéticas. Estos ratones fueron transfundidos por vía

intravenosa con células de MO normal de ratones donadores. En el estadio temprano de recuperación, los bazo y médulas de estos animales transfundidos mostraron estadios tempranos de proliferación, nódulos macroscópicos de células hematopoyéticas en proceso de proliferación. Aunque en los primeros 7 u 8 días cada uno de los nódulos tuvieron sólo una línea celular (eritrocitos, mielocitos o megacariocitos), los nódulos presentes al día 14 mostraron poblaciones celulares mezcladas. La célula que formó la colonia fue llamada unidad formadora de colonias del bazo (CFU-S). Esto sugirió que quizás los nódulos que aparecen al día 7, estuvieran formados de más células tallo unipotentes comprometidas maduras, mientras que los nódulos del día 14 fueron derivados de una célula tallo multipotencial más primitiva (35). Es también interesante notar que los nódulos aparecieron en áreas específicas del bazo, de acuerdo a su línea celular predominante. Las colonias eritrocíticas estuvieron presentes sobre la superficie del bazo, las colonias megacariocíticas debajo de la cápsula, y las colonias mielocíticas crecieron dentro del bazo. Esta preferencia por ciertas áreas del bazo puede ser causada por la influencia del medio local, llamado el microambiente inductor hematopoyético (MIH), sobre las células tallo hematopoyéticas (36). Los estudios de la influencia del estroma de la MO sobre la hematopoyesis, en ratón y hamsters, han sugerido que el estroma normal es esencial para sustentar la hematopoyesis normal (37, 38, 39).

Experimentos adicionales proporcionaron evidencias directas sobre la existencia de células tallo pluripotenciales. Las células de médula normal, se irradiaron severamente, lo suficiente para causar aberraciones cromosomales, una vez irradiadas, fueron inyectadas dentro de ratones letalmente irradiados. Estas células irradiadas dieron origen a diferentes tipos celulares con el mismo cariotipo en células hematopoyéticas de nódulos del bazo (40). Además la suspensión celular de estos nódulos podría ser inyectada dentro de otros ratones irradiados, para formar nuevos nódulos del bazo con anomalía cromosomal similar.

Estos estudios indican que existe una única célula en la médula que no sólo es capaz de diferenciarse a distintos tipos celulares hematopoyéticos, sino que también es capaz de autorrenovar el tipo celular original.

Otros estudios indican que aunque la CFU-S da origen a monocitos, neutrófilos, megacariocitos y eritrocitos, no da origen a linfocitos. Las investigaciones recientes con marcadores cromosomales, sugieren que los linfocitos y CFU-S probablemente tienen en común una célula tallo más primitiva, que da origen a ambos CFU-S y progenitores linfoides (Fig. A). Por ejemplo, una única isoenzima G6PD a sido encontrada en todas las células hematopoyéticas e inclusive linfocitos T y B de pacientes con anemia sideroblástica, un desorden en células tallo y un mosaico de G6PD (41). Las hembras heredan dos cromosomas X, uno de cada progenitor, sin embargo, solamente uno de los dos cromosomas X en cada célula es activo. El proceso de inactivación es fortuito en la embriogénesis. La G6PD es una enzima cuyo gene es el cromosoma X; así, en las hembras que son heterocigotas para las dos diferentes isoenzimas de la G6PD (una heredada de la madre y la otra del padre), existen dos poblaciones de células rojas. Una población contiene la isoenzima materna y la otra la isoenzima paterna. Todas las células derivadas de la misma célula tallo tienen la misma isoenzima G6PD. De esta manera una única isoenzima, encontrada en todas las células hematopoyéticas de pacientes heterocigóticos con desórdenes hematopoyéticos, indican que la población de células anormales incluso en linfocitos, probablemente se originaron de una única célula tallo pluripotencial.

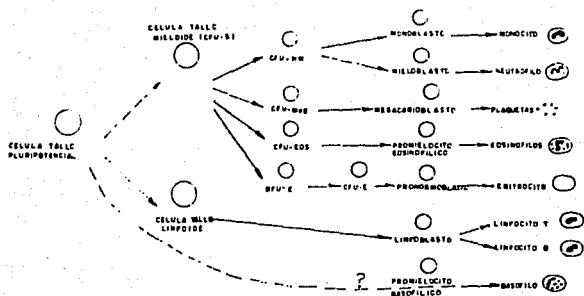
Fueron obtenidas claras evidencias para una célula tallo hematopoyética común para todas las células sanguíneas de los estudios de pacientes con leucemia mielógena crónica (CML). Se ha encontrado que las células malignas transportan un cromosoma anormal; el cromosoma Philadelphia. Este cariotipo anormal fue encontrado en células rojas, granulocitos y megacariocitos, pero estuvo ausente en linfocitos. Esto sugiere que los linfocitos se derivaron de una célula tallo diferente de la célula tallo para

otras células hematopoyéticas. Contrario a esto, los estudios más recientes han demostrado que el cromosoma Philadelphia puede ser encontrada en linfocitos B, así como en otras líneas celulares sanguíneas en algunas pacientes con CML (42,43). Los pacientes con CML frecuentemente entran en una crisis mieloblástica en la que la mayoría de los mieloblastos malignos ocupan la MO y entran en la sangre periférica. Los estudios con tinciones citoquímicas y marcadores celulares, han revelado que una pequeña porción de las crisis blásticas en CML son causadas debido a la proliferación de linfoblastos malignos más que de mieloblastos. Esto sugiere que las células malignas en CML son probablemente una célula tallo primitiva que es capaz de diferenciarse a mieloblastos y linfoblastos. El cariotipo asociado a esta enfermedad, no es una prueba definitiva de clonalidad de células, sin embargo, estos hallazgos junto con los estudios de la isoenzima G6PD, indican que la línea celular linfocítica puede ser derivada de una célula tallo primitiva multipotencial, que es capaz de diferenciarse a linfocitos así como a otros tipos celulares sanguíneos.

Los métodos in vitro para el crecimiento de células tallo hematopoyéticas en cultivos de agar, han proporcionado evidencias para la existencia de células tallo comprometidas unipotenciales o bipotenciales que son derivados de la CFU-S. Un factor estimulador de colonias (CSF), que se piensa actúa solamente a nivel de célula tallo comprometida monocito-granulocito, puede ser el responsable para la inducción de las CFU-S a proliferar y diferenciarse a estas células tallo comprometidas. Los linfocitos T, monocitos, y macrófagos pueden inducir a la formación del CSF (44). En el sistema de cultivo eritroide, las células progenitoras dan origen a dos tipos distintos de colonias eritroides en la presencia de eritropoyetina. Un tipo de colonia de un tamaño máximo a los 7 u 8 días, madura y degenera. El progenitor unipotencial sensible a la eritropoyetina de estas colonias, es llamado CFU-E. Una célula progenitora unipotencial más primitiva, derivada de la CFU-S, es relativamente insensible a la eritropoyetina y forma grandes colonias después de 14 días,

en forma abierta o de estallido. La célula progenitor de estas colonias es conocida como la unidad formadora de colonias abiertas eritroides (BFU-E). La CFU-E es considerada un descendiente de la BFU-E que da origen al primer precursor de células rojas, llamado pronormoblasto.

Los estudios de cultivos en agar, han indicado también, la existencia de colonias monocito-neutrófilo derivadas de células tallo. Estas colonias requieren del factor estimulador de colonias para crecer. La célula tallo bipotencial que da origen a estas colonias es llamada la unidad formadora de colonias en cultivo (CFU-C), pero es más comúnmente referida como la unidad formadora de colonias de neutrófilo-monocito (CFU-NM). Raramente los eosinófilos aparecen en las mismas colonias donde se encuentran los neutrófilos-monocitos, lo que indica que los eosinófilos son probablemente derivados de una célula formadora de colonias diferente. Los basófilos generalmente no crecen en este sistema. Los nódulos megacariocíticos probablemente son derivados de células tallo comprometidas en la megacariopoyesis (CFU-Meg). Sin embargo, los megacariocitos se han encontrado en colonias mezcladas con neutrófilos y monocitos, lo que indica que bajo algunas circunstancias el CFU-NM puede también diferenciarse a megacariocitos. Fueron estimuladas células tallo comprometidas unipotencial y bipotencialmente, a proliferar y diferenciarse por un estímulo humoral específico. Como se describió anteriormente, la eritropoyetina es el estímulo específico de las células comprometidas unipotencialmente a la eritropoyesis. También existen evidencias para la presencia de los factores humorales, como la leucopoyetina y la trombopoyetina, para el estímulo de la leucopoyesis y trombopoyesis respectivamente. Aproximadamente el número de células tallo es de una por 1,000 células nucleadas de la MO. La mayoría de los investigadores compara a la morfología de la célula tallo con la de los linfocitos; aunque, en el presente, no hay características distintivas que permitan una identificación específica de estas células. En cambio la existencia de células tallo ha sido establecida a través de los sistemas de cultivo antes descrito.



CELULA TALLO NO COMPROMETI- DA	CELULA TALLO COMPRO- METIDA	PRIMER PRECUR- SOR DE MEDULA POSEA RECONOCI- BLE MORFOLOGI- CAMENTE.	CELULA MADURA EN SANGRE PE- RIFERICA
--------------------------------------	--------------------------------	--	--

#### ORIGEN DE LAS CELULAS SANGUINEAS

CFU-S	UNIDAD FORMADORA DE COLONIAS DEL BAZO
CFU-NM	UNIDAD FORMADORA DE COLONIAS DE NEUTROFILOS Y MONOCITOS
CFU-Meg	UNIDAD FORMADORA DE COLONIAS DE MEGACARIOCITOS
CFU-EOS	UNIDAD FORMADORA DE COLONIAS DE EOSINOFILOS
BFU-E	UNIDAD FORMADORA DE COLONIAS DE ESTALLIDO ERITROIDE
CFU-E	UNIDAD FORMADORA DE COLONIAS ERITROIDES

FIG. A. DIFERENCIACION DE LAS CELULAS SANGUINEAS A PARTIR DE LA CELULA TALLO PLURIPOTENCIAL.

## MADURACION DEL NEUTROFILO

El neutrófilo presenta 6 estadios morfológicamente identificables en el proceso de maduración, los cuales van desde la célula tallo unipotente, al neutrófilo segmentado funcional. Estos estadios son: 1- mieloblasto; 2- promielocito (progranulocito); 3- mielocito; 4- metamielocito; 5- granulocito en banda; 6- granulocito segmentado o neutrófilo polimorfonuclear (PMN).

Durante este proceso de maduración hay un cambio progresivo en el núcleo. El nucleolo deja de percibirse, la cromatina se condensa, y la masa circular una vez indentada, eventualmente se va fragmentando. Este cambio nuclear está acompañado por distintos cambios citoplásmicos. El escaso citoplasma basofílico agranular del estadio más joven, es remplazado gradualmente por un citoplasma voluminoso de color rosa y granular cuando se tiñe con el colorante de Giemsa en el estadio maduro diferenciado (45).

El mieloblasto, es el precursor del neutrófilo más tempranamente reconocible, su tamaño es de 15 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro y tiene un radio núcleo-citoplasma alto. El núcleo es generalmente redondo u ovalado, contiene una cromatina delicada, uniformemente teñida. Hay de 3 a 5 nucleolos grandes y altamente desarrollados, no hay condensación de cromatina sobre la membrana lisa nuclear. La pequeña pero moderada cantidad de citoplasma es agranular, se tiñe de un azul intenso en la periferia y de azul ligero hacia el núcleo.

El promielocito es reconocido por la presencia de gránulos primarios grandes, de color negro-azulado, llamados azurofílicos o no específicos que contienen enzimas y otras sustancias tales como: fosfatasa ácida, mieloperoxidasa, hidrolasas ácidas, lisozima, mucopolisacáridos sulfatados, y otras proteínas básicas. Su tamaño varía entre 15 y 21  $\mu\text{m}$  según la fase del ciclo celular; frecuentemente un promielocito aparece tan grande como un mieloblasto; el citoplasma basofílico es similar al del



blasto, el núcleo es bastante grande. La estructura de la cromatina aunque es más burda que la del blasto, está todavía abierta y se tiñe de azul-púrpura claro. Varios nucleolos son visibles en este estadio.

El mielocito presenta un tamaño entre 12 y 18  $\mu\text{m}$  de diámetro; en este estadio aparecen los gránulos neutrofilicos secundarios o específicos, que son pequeños y de apariencia arenosa. Estos gránulos contienen fosfatasa alcalina y lisozima pero no contiene fosfatasa ácida o peroxidasa, presentan otras enzimas como la amino peptidasa, colagenasa, y las proteínas básicas están bien identificadas en estos gránulos (46). El citoplasma es acidófilo y se tiñe de un color rosa claro. El núcleo es reducido en tamaño, la cromatina nuclear parece más condensada e intensamente más teñida que en el progranulocito. Los nucleolos pueden ser vistos en el mielocito temprano pero suelen estar ausentes. El núcleo es redondo u oval y generalmente excéntrico. En el estadio tardío el mielocito puede presentar un achatamiento de un lado del núcleo. El radio núcleo citoplasma esta disminuido. Este es el último estadio capaz de sufrir división mitótica.

El metamielocito es ligeramente más pequeño que el mielocito, entre 10 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, pero la mayoría de ellos presenta una característica de diferenciación que es la indentación nuclear, la indentación da al núcleo la forma de riñón o frijol. La cromatina nuclear está condensada, mal definida y teñida de color púrpura oscuro. Los nucleolos no son visibles y el citoplasma es de color rosa con gránulos secundarios predominantes.

El metamielocito se convierte en granulocito en banda cuando la indentación del núcleo es más de la mitad del diámetro del hipotético núcleo circular. Esta indentación da al núcleo la apariencia de herradura. En un corte histológico la cromatina muestra cambios degenerativos con picnosis en ambos lados del núcleo. La célula es ligeramente más pequeña que el metamielocito, entre 9 y 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, el citoplasma aparece rosado como en el estadio anterior. Este estadio es el primero en

aparecer en la sangre.

Aunque el tamaño del granulocito en banda es similar al neutrófilo polimorfonuclear (PMN), éste es reconocido por un núcleo segmentado con 2 o más lóbulos conectados por un delgado filamento nuclear. La cromatina está condensada y se tiñe de un color púrpura oscuro muy intenso. La mayoría de los neutrófilos presentan de 2 a 5 lóbulos nucleares, se toman como anormal los que presentan más de 5 lóbulos, lo cual caracteriza a las células como un PMN hipersegmentado. Solamente un cromosoma X activo es necesario para el funcionamiento normal de la célula; en las hembras con dos cromosomas X, uno es inactivado azarosamente (hipótesis de Lyon). Este cromosoma X inactivo permanece condensado, como un cuerpo de cromatina sexual nuclear. Este cuerpo en neutrófilos, tiene forma de palo de tambor, el cual aparece como un apéndice del núcleo. El citoplasma del PMN maduro, contiene muchos gránulos secundarios y se tiñe de un color rosa. Los gránulos primarios pueden estar presentes, pero debido a su escasez y baja calidad de tinción, podrían no ser identificados (45).

## FUNCION DE LOS NEUTROFILOS

Los neutrófilos tienen como función en la sangre el de ayudar a los tejidos del organismo a luchar contra microorganismos antigénicos. La respuesta inicial de los neutrófilos inicia con la diapedesis (marginación y adherencia), proceso por el cual el neutrófilo se adhiere al endotelio vascular y se dispersa sobre su superficie. Esta adherencia es reversible; los neutrófilos adherentes pueden desadherirse y reentrar a la circulación. A la agregación de neutrófilos le sigue la adherencia, y los neutrófilos adherentes pueden llevar a cabo la diapedesis entre las uniones de las células endoteliales vasculares. El movimiento a través del tejido es facilitado por sustancias secretadas por gránulos neutrofilicos específicos (por

ejemplo colagenasa), cuando se funden con la membrana de los pseudópodos. Los neutrófilos pueden vagar azarosamente a través de los tejidos o pueden ser atraídos a ciertas áreas específicas por estímulos quimiotácticos. Una sustancia actúa como estímulo quimiotáctico para una célula, si ésta tiene un receptor para la sustancia. Una vez que la sustancia quimiotáctica es ligada por el receptor, que se encuentra situado en la membrana plasmática del neutrófilo, éste induce cambios metabólicos dentro de la célula y los neutrófilos se mueven hacia la fuente de la sustancia quimiotáctica. Varias sustancias que se encuentran en el exudado inflamatorio sirven como quimiotácticos para neutrófilos. Estas incluyen a los componentes C5a y C3a del complemento, secreciones de células mastocíticas, linfocíticas, de macrófagos y otros neutrófilos, proteínas de la reacción en cascada de la coagulación activada, y productos de bacterias y virus. La mayoría de los neutrófilos tienen la capacidad de mover parte de su superficie, lo que le da movimiento, las células lentamente van hacia el estímulo por medio de una fuerza motriz provista por el citoesqueleto situado por debajo de la membrana celular. Después de un período de tiempo la célula se vuelve refractaria y permanece inmóvil. Una vez en el área de inflamación, la mayoría de los neutrófilos reconocen la partícula como extraña, y es iniciada la adhesión y la fagocitosis (Fig. B). Algunos microorganismos o partículas pueden ser reconocidas sin una modificación de la superficie, mientras que la mayoría son opsonizadas (cubiertas con anticuerpos y/o complemento), para hacerlas más atrayentes a los neutrófilos. Dos opsoninas han sido bien definidas, el anticuerpo IgG y el componente del complemento C3b. El anticuerpo se liga a la partícula por medio de la región Fab, mientras que la región Fc se adhiere al receptor Fc de la membrana del neutrófilo. El neutrófilo también tiene receptores para algunos componentes del complemento que han sido activados. Algunas bacterias con cápsulas compuestas de polisacáridos, evitan el reconocimiento, lo que causa una deficiencia en la efectividad de la fagocitosis. Una vez llevado a cabo el reconocimiento y la adhesión, la partícula es rodeada por los

pseudópodos emitidos de la membrana citoplásmica del neutrófilo. Cuando los pseudópodos se tocan, se fusionan y encierran a la partícula dando origen a una vesícula denominada fagosoma, la cual se fusiona con el lisosoma (vacuola digestiva) que contiene gránulos primarios específicos (enzimas), formando el fagolisosoma. Esta fusión y liberación es conocida como degranulación. Algunas enzimas de los lisosomas pueden jugar un papel en la muerte de los microorganismos, pero el efecto directo del contenido granular es la digestión del organismo ya muerto. El fago-lisosoma protege a la célula del posible daño causado por la segregación de las enzimas digestivas y los metabolitos del oxígeno dentro del fagolisosoma cuando éstas digieren microbios. Una vez que se ha llevado a cabo la digestión del material fagocitado por el contenido de los lisosomas, el material es exocitado. La mayoría de los neutrófilos mueren en el exudado inflamatorio, y son fagocitados por los macrófagos.

Los neutrófilos también interactúan en otros procesos fisiológicos, tales como la estimulación de la coagulación y liberación de pirógenos que provocan fiebre (45).

F A G O C I T O S I S

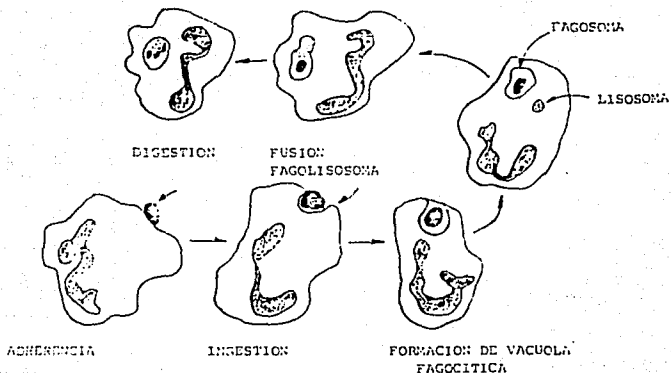


FIG. B. INICIO DE LA FAGOCITOSIS CON EL RECONOCIMIENTO Y ADHERENCIA DEL MICROBIO AL NEUTROFILO. EL MICROBIO ES INTERNALIZADO DENTRO DE UNA VACUOLA FAGOCITICA, DESPUES EL LISOSOMA SE FUSIONA CON LA VACUOLA Y SE LLEVA A CABO LA DIGESTION DEL MICROBIO.

## MADURACION DEL MONOCITO

El monocito se origina en la MD a partir de una célula tallo bipotencial (CFU-NM) que es capaz de diferenciarse ya sea a monocito o a granulocito. El estímulo para la maduración en una línea celular no es conocido, pero es probable que una hormona específica similar a la eritropoyetina esté involucrada. La bipotencialidad de las células precursoras del monocito está basada en las similitudes morfológicas e inmunológicas de clones neoplásicos observados en leucemias que involucran tanto a macrófagos como a granulocitos. La proliferación clonal de neutrófilos, tal como ocurre en la Leucemia mielógena crónica (LMC), frecuentemente muestra proliferación monocítica así como de neutrófilos, y la leucemia mielomonocítica aguda, involucra proliferación irregular de monoblastos y mieloblastos. La célula tallo es más similar a las células neoplásicas en estos desórdenes.

Los precursores del monocito en la MD son el monoblasto y el promonocito. Estas células se encuentran en abundancia solamente en procesos leucémicos del sistema monocítico. El monoblasto de la médula no puede ser morfológicamente distinguido por el microscopio de luz de el mieloblasto, excepto cuando hay una marcada proliferación de la serie monocítica, como ocurre en la leucemia monocítica (47). Frecuentemente son utilizadas tinciones citoquímicas para ayudar a diferenciar estas dos líneas celulares. El promonocito es el primer estadio de desarrollo morfofisiológico característico que permite ser diferenciado como un precursor del monocito por el microscopio de luz. La identificación de precursores tempranos del monocito es ayudada por la observación de pliegues o indentaciones en el núcleo y por su asociación con monocitos maduros.

El monoblasto tiene abundante citoplasma agranular de color azul-grisáceo. El núcleo es ovoide o redondo, pero puede estar plegado o indentado. La luz azul-púrpura de la cromatina nuclear está finamente dispersa y varios nucleolos son fácilmente identificados. La diferencia entre el monoblasto y el mieloblasto

puede ser posible con tinciones citoquímicas. El monoblasto no tiene actividad de esterasa específica demostrada por el sustrato alfa-naftil butirato que es inhibido por fluoruro de sodio. El mieloblasto tiene actividad esterasa específica y no específica, pero esta última no es inhibida por el fluoruro de sodio. El mieloblasto con actividad esterasa específica es demostrado por la reacción con naftol AS-D cloroacetato.

El promonocito es una forma intermedia entre el monoblasto y el monocito. La célula es grande 14 a 18  $\mu\text{m}$  de diámetro, con abundante citoplasma azul-grisáceo. Gránulos azurófilos finos pueden estar presentes (lisosomas). El núcleo es más bien irregular y profundamente indentado con una fina malla de cromatina. Los filamentos de cromatina son más gruesos que en el monoblasto. El nucleolo puede estar o no presente. Las tinciones citoquímicas para esterasa no específica, peroxidasa, fosfatasa ácida y arilsulfatasa son positivas.

El monocito maduro tiene características morfológicas variables que dependen de su actividad. La célula se adhiere al cristal y emite numerosos pseudópodos que dan como resultado una amplia variación de tamaños y formas en un frotis sanguíneo. El intervalo de tamaño de las células es de 12 a 30  $\mu\text{m}$  con un promedio de 18  $\mu\text{m}$ , las células más grandes se encuentran en la sangre periférica. Los estudios citoquímicos y de microscopía electrónica revelan dos tipos de gránulos: un tipo contiene peroxidasa, fosfatasa ácida, y arilsulfatasa, lo que sugiere que estos gránulos son similares a los lisosomas (gránulos azurófilos) de neutrófilos. Se conoce menos acerca del contenido del otro tipo de gránulos, pero son diferentes a los gránulos específicos de neutrófilos, éstos no contienen fosfatasa alcalina. Los lípidos que constituyen a la membrana de los lisosomas se tiñen con el colorante Sudán-negro B. El núcleo es irregular y frecuentemente con forma de herradura o de frijol, y posee numerosos pliegues que dan la apariencia de circunvoluciones similares a las del cerebro humano. Algunas

veces los nucleolos pueden ser vistos. La cromatina es difusa y lineal, semejante a un patrón como de encaje, en comparación con el de la cromatina densa de linfocitos o granulocitos maduros.

Los monocitos, por otro lado, son algunas veces difíciles de distinguir de los linfocitos grandes. El monocito eventualmente vive en la sangre y entra al tejido donde éste lleva a cabo su maduración a macrófago. La transición de monocito-macrófago está caracterizada por un agrandamiento celular progresivo. El núcleo se vuelve redondo, los nucleolos pueden ser vistos y el citoplasma aparece de color azul (45, 48). Así, al madurar el macrófago, pierde actividad de peroxidasa, pero se incrementa en retículo endoplásmico, lisosomas y mitocondrias. También son notables algunos gránulos en la maduración del macrófago. Estas células pueden vivir por meses en el tejido. Los macrófagos normalmente no reentran a la sangre, pero algunos pueden nuevamente tener acceso a la linfa, para permanecer eventualmente en la sangre. Los macrófagos colectivamente conocidos como histiocitos, desarrollan diferentes características citoquímicas y morfológicas que dependen del sitio de maduración y del tejido de residencia. Estas células reciben nombres más específicos, basados en su localización en el cuerpo. Por ejemplo, los macrófagos en el hígado son conocidos como células de Kupffer, los macrófagos del pulmón como macrófagos alveolares, a los de la piel como células de Langerhans y a los del cerebro como células de microglia. Los macrófagos no son considerados células tallo; sin embargo, pueden proliferar en el tejido, especialmente en áreas de inflamación, lo que permite incrementar el número de estas células en estos sitios. Ocasionalmente dos o más macrófagos se fusionan para producir células multinucleadas gigantes. Esto ocurre en lesiones granulomatosas en las cuales muchos macrófagos se encuentran estrechamente juntos. La fusión también ocurre cuando algunas partículas de materia son muy grandes para ser fagocitadas por una sola célula, o cuando dos células simultáneamente fagocitan la misma partícula (45).



## FUNCION DEL MONOCITO

Es bien conocido, desde los experimentos de Metchnikov, que los monocitos y macrófagos funcionan como fagocitos, frecuentemente se sabe que estas células también secretan una variedad de sustancias que afectan las funciones de otras células, especialmente linfocitos, que en turno secretan productos solubles (linfocinas), que modulan las funciones de los monocitos.

Los monocitos y macrófagos ingieren microorganismos. Son especialmente importantes en la inhibición del crecimiento de microorganismos intracelulares.

La opsonización de un microorganismo con inmunoglobulinas y complemento, incrementa la fagocitosis por monocitos y macrófagos ya que estas células poseen receptores para el componente Fc de las inmunoglobulinas de la clase IgG y para el componente C3b del complemento. Después de la adhesión del microorganismo a la membrana celular del macrófago, es ingerido de una manera similar a como lo hacen los neutrófilos (Fig. B). Primeramente los lisosomas se fusionan con el fagosoma, en el que se liberan enzimas hidrolíticas y otras sustancias microbidas, de las cuales las más poderosas son productos del metabolismo del oxígeno, tales como el superóxido ( $O_2^-$ ), oxígeno molecular ( $O_2$ ), radicales hidroxilo ( $OH^-$ ), y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Los macrófagos activados se adhieren a las células tumorales y las matan por un efecto citolítico directo. Si la célula tumoral tiene inmunoglobulinas adheridas, los macrófagos se adhieren a la porción Fc de la inmunoglobulina, para llevar a cabo un efecto lítico sobre la célula tumoral.

Los macrófagos son importantes como limpiadores, ya que fagocitan restos celulares, células viejas y otras partículas; por ejemplo los monocitos en la sangre ingieren factores coagulados en la sangre, lo que limita el proceso de coagulación, ingieren proteínas desnaturalizadas y complejos antígeno-anticuerpo, también remueven sustancias tóxicas de la sangre.

previniendo que éstas lleguen a los tejidos (49).

Los macrófagos liberan una variedad de sustancias que están involucradas en la defensa del organismo tal como la lisozima, pirógeno, componentes del complemento y el interferón. Secretan sustancias que modulan a otras células, estas incluyen al CSF que estimula a las células tallo de la unidad formadora de colonias de neutrófilo-macrófago (CFU-NM), factores que estimulan el crecimiento de nuevos capilares, factores que estimulan y suprimen la actividad de linfocitos, sustancias quimiotácticas para polimorfonucleares, y sustancias que estimulan a los hepatocitos a secretar fibrinógeno (45).

Los macrófagos activados, liberan enzimas tales como la colagenasa, elastasa, y proteinasas neutras que hidrolizan los componentes del tejido.

Los macrófagos y monocitos de diversas fuentes presentan algunas características diferentes. Así, se ha mostrado (50), que los macrófagos de diferentes tejidos al ser aislados y cultivados in vitro, su capacidad de adherencia al vidrio, así como su índice mitótica en cultivo variaba. En base a estas características, Bennet describió tres categorías de macrófagos: macrófagos peritoneales y de sangre periférica que se adhieren rápidamente y tienen una baja tasa mitótica; macrófagos de la MO, del bazo y del hígado que se adhieren lentamente, pero tienen una alta tasa mitótica; y macrófagos alveolares que se adhieren rápidamente y tienen una alta tasa mitótica.

En diversos tejidos del organismo, existen macrófagos como residentes habituales, no obstante, se ha experimentado con mayor frecuencia con los provenientes de la cavidad peritoneal, debido a que la población es fácilmente caracterizada (51). Su colecta es sencilla comparada con la de macrófagos de otros tejidos, que sólo se pueden obtener por disgregación enzimática, con lo que se afecta a las células. Los macrófagos de la cavidad peritoneal son utilizados en estudios morfológicos, de diferenciación, fagocitosis, citotoxicidad y respuesta inmune (52). Se piensa que la población de macrófagos residentes se mantiene mediante un

mecanismo de autoduplicación y que las células con características de monocitos ahí encontradas, pueden ser monocitos transitorios en la cavidad y no estar relacionados con macrófagos residentes (51).

Se ha empleado una amplia variedad de agentes irritantes para provocar la llegada a la cavidad peritoneal de un gran número de células (como los monocitos y los neutrófilos). El patrón que sigue la respuesta a la estimulación por diversos agentes, es generalmente la misma (53): cuando el irritante que se emplea en la cavidad peritoneal es el caseinato de sodio, se observa que el tipo celular que arriva en primer término es el granulocito, el cual arriva entre una y dos horas después de la inyección, posteriormente llega a su número máximo a las 16 horas y comienza a declinar hasta desaparecer casi completamente a las 24 horas. En el caso de los monocitos, éstos tienen su máximo (54) a los 4 días después de haber sido inyectado el patógeno. El tiempo que lleva el restablecimiento de la normalidad en la cavidad, varía según la concentración y la naturaleza del estímulo (55).

## INMUNOGLOBULINAS

Además de las sustancias inductoras a la proliferación celular, producidas por ciertos tipos celulares, se producen en el organismo moléculas de importancia en la defensa del cuerpo contra agentes extraños. Tales moléculas son producidas por células especializadas con este fin, llamadas linfocitos B. Las inmunoglobulinas producidas por estas células son moléculas protéicas que portan actividad de anticuerpos, es decir, la propiedad de combinarse específicamente con la sustancia que provocó su formación (antígeno). Los anticuerpos se originan como respuesta a las sustancias extrañas introducidas en el cuerpo. Los anticuerpos son moléculas bifuncionales y se ligan de manera específica con el antígeno e inician también toda una gama de fenómenos secundarios como la fijación del complemento y la liberación de histamina por las células cebadas, que son independientes de su especificidad por el antígeno (56).

Como la diversidad estructural y funcional de los anticuerpos normales hace difícil su análisis fisicoquímico, mucho de nuestro conocimiento concerniente a la estructura de inmunoglobulinas, es derivado del estudio de las proteínas del mieloma y de macroglobulinas monoclonales (57). A pesar de su gran heterogeneidad, todos los anticuerpos presentan ciertas similitudes estructurales, todos consisten de una subunidad básica compuestas por 4 cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. Dos tienen un peso molecular de 53,000 a 75,000 daltones según la clase de inmunoglobulina, y son conocidas como cadenas pesadas (H del inglés heavy); las otras dos tienen un peso molecular de 22,500 daltones y son denominadas cadenas ligeras (L). Las cuales, tienen como base sus propiedades generales, así como las características fisicoquímicas e inmuoquímicas de sus cadenas H constituyentes, las inmunoglobulinas pueden ser subdivididas en 5 clases principales: IgG, IgM, IgD, IgE, e IgA. Dentro de una clase dada de cadenas pesadas, se han distinguido subclases de acuerdo a sus características antigénicas. Por ejemplo, hay 4 subclases de IgG: IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. En

tanto, sólo han sido identificadas dos tipos de cadenas L, Kappa y Lambda. Estas cadenas son portadas por todas las clases de inmunoglobulinas, aunque la cantidad relativa de cada una varía de clase a clase. Cuando una molécula de gama globulina es tratada con papaina en presencia de cisteína, se producen 3 fragmentos (50), dos de éstos idénticos y consisten de una cadena ligera y la porción amino-terminal de la cadena pesada; éstos son referidos como Fab (del inglés, Fraction antigen binding), es mediante esta porción que la inmunoglobulina se une al antígeno. La tercera pieza, conocida como fragmento Fc (del inglés Fraction cristalizante), contiene la porción carboxilo terminal (Fig. C). La porción Fc regula la fijación de la molécula a las células (células cebadas, linfocitos, macrófagos) la transferencia placentaria, y la fijación del complemento (59). Las cadenas L están compuestas de aproximadamente 214 aminoácidos (60). Las cadenas L pueden ser vistas como dos regiones enlazadas de igual longitud; la primera de estas regiones es referida como la región variable (VL), mientras la restante se denomina región constante (CL) (60). La región variable se denomina así debido a que varía considerablemente de una inmunoglobulina a otra, mientras que la región constante muestra menos variabilidad. Las cadenas pertenecientes a la clase IgG1 han sido estudiadas más extensamente (61), además, la IgG constituye casi las 3/4 partes de las gamma globulinas totales. Esta es la única inmunoglobulina selectivamente transferida a través de la placenta, por tanto provee de cierta protección al feto; también está involucrada en la activación del sistema del complemento.

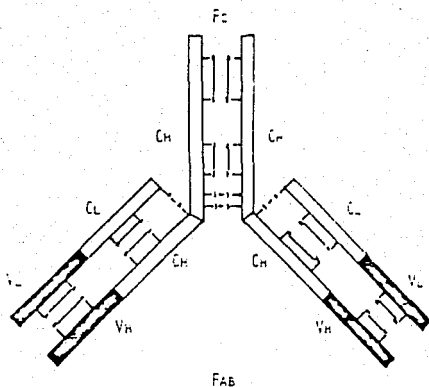


Fig. C. Modelo general de la estructura de la hemagglutina. Se muestran las porciones Fc y Fab, así como las porciones pesadas (H) y ligeras (L) de las regiones constantes y variables de la molécula (tomado de: Wintrobe M. Clinical Hematology: 1974).

## RECEPTORES Fc

Dada la importancia que representan en la defensa del organismo moléculas como las inmunoglobulinas, y las que forman parte del sistema del complemento, se ha investigado la manera mediante la cual se lleva a cabo su acción, se ha encontrado que existen receptores a través de los cuales se unen a distintos tipos celulares. Los receptores que reconocen y unen la porción Fc de la IgG, han sido detectados en una amplia variedad de células, tales como los macrófagos, linfocitos y leucocitos polimorfonucleares. Estos receptores funcionan en la fagocitosis (62) y citólisis (63) de células recubiertas de IgG. Los receptores Fc que son encontrados en diferentes tipos de células, expresan distintas afinidades para las subclases de IgG.

Muchos estudios con células autólogas e inmunoglobulinas sostienen que los receptores de los fagocitos mononucleares, unen sólo ciertas clases de IgG específicamente. Los macrófagos de humanos evidencian gran afinidad por las subclases IgG1 e IgG3 (64), mientras que los macrófagos de ratón unen específicamente IgG2 e IgG2b, pero en cambio no unen IgG3. Así mismo, se han descrito receptores Fc que unen distintas clases de inmunoglobulinas (IgM e IgE) (62). Los macrófagos portan en su superficie receptores para la porción Fc de la IgG, además de receptores para el complemento y receptores no específicos para sustancias extrañas, todos éstos de gran importancia biológica. Existen datos sobre la existencia de receptores para la insulina, fibrina, lacto-ferrina, linfocinas, carbohidratos y lípidos (63). En cuanto a los receptores de tipo inmune, se sabe que el recubrimiento de bacterias con inmunoglobulinas, facilita la adherencia y fagocitosis, lo que incrementa la actividad bactericida de los macrófagos (64). 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, mientras que la

porción Fc no inmunoespecíficamente al microorganismo patógeno (65). 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 no viables (66). Se piensa que el envejecimiento puede exponer grupos carbohidratos que estuvieran previamente ocultos en el eritrocito, los cuales son luego opsonizados por IgG autóloga in situ, lo que facilita su fagocitosis por fagocitos hepáticos y esplénicos (67).

La presencia de receptores Fc es evaluada hoy en día, principalmente por el ensayo de rosetas, en donde los eritrocitos xenogénicos son cubiertos con anticuerpos (EA) y posteriormente son expuestos a los macrófagos. La actividad del receptor Fc es iniciada cuando ocurre la adhesión de eritrocitos sobre la superficie del macrófago, que da una configuración denominada roseta. Se cuenta con técnicas en la que si los eritrocitos son premarcados con Cr 51, pueden ser contados automáticamente. También se emplean conjugados de anticuerpos con fluoresceína que se unen a los macrófagos y de esta manera son contados con aparatos que separan a las células de acuerdo a su diferencia en fluorescencia (68).

El empleo de rosetas EA se ha realizado no sólo 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 de cáncer cervical (69).

Actualmente se han desarrollado técnicas encaminadas a la evaluación más eficiente de estos receptores. Así, tenemos por ejemplo el método avidina-biotina-peroxidasa (70), para la determinación de receptores Fc en macrófagos aislados o en tejido. Otro método consiste en el empleo de partículas fluorescentes de 2-hidroxiethyl metacrilato con dinitrofenol y anticuerpos monoclonales anti-dinitrofenil, de tal forma que se detectan receptores Fc y la fagocitosis mediada por estos receptores (71).

Se ha encontrado que la formación de receptores Fc está mediada por una molécula termolábil y sensible a la tripsina que



la determina como una proteína. El estudio bioquímico de esta molécula llamada FcRI (4-1 inglés, Fc Receptor Inducer), indica que tiene un peso molecular de 10,500 daltones y un pH isoeléctrico de 7.6. Se ha obtenido en principio de una línea leucémica de tipo macrófagico denominada WR19M.1 (72) y posteriormente en suero endotóxico murino, así como en el medio condicionado por pulmones que se obtiene como se describirá en material y método, y medio condicionado por macrófagos peritoneales sometidos a la acción de lipopolisacáridos (73). El desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos para el FcR, sobre leucocitos humanos ha establecido la existencia de tres tipos distintos de FcR.

Hay tres clases de FcR, el FcRI que es una glucoproteína de 70,000 daltones (74, 75), y es el único FcR que liga a la IgG monovalente con una alta afinidad, y con una constante de afinidad alta para IgG1 e IgG3 humanos y IgG2 e IgG3 de ratón (76, 77). El FcRII, una glucoproteína de 40,000 daltones que ha sido definida por anticuerpos monoclonales así como sondas de ADN clonado (70, 72, 80, 81, 82), dos formas de FcRII fueron identificadas (83), y recientes experimentos con clonación de cADN apoyan el concepto de subtipos de receptores múltiples (80, 84). Todas las formas del FcRII tienen afinidad baja para la IgG1 monovalente, y parecen ser específicas para complejos inmunes y partículas opsonizadas.

El FcRIII también tiene baja afinidad para IgG monomérica y fue originalmente identificada como una glucoproteína de 50 a 70,000 daltones (85).

En resumen, son reconocidos tres clases de FcR, así como a las formas poliméricas de FcRII y FcRIII. El polimorfismo notado parece estar relacionado en ambos con las diferencias en los alelos y la modificación post-transduccional en diferentes células (86, 87, 88).

La expresión de FcRI está mayormente restringida a fagocitos mononucleares. Los monocitos de sangre periférica normal tienen un intervalo de 15,000 a 40,000 sitios de FcRI por célula, mientras que los macrófagos tienen más de 50,000 sitios por

célula (77, 90-92). Menos de 1,000 sitios Fc $\gamma$ R por célula son encontrados sobre granulocitos frescos aislados (91, 92).

El Fc $\gamma$ RII es expresado sobre la superficie de virtualmente todas las células hematopoyéticas, excepto eritrocitos y es probablemente el único FcR sobre plaquetas, este Fc $\gamma$ RII se encuentra en cantidades similares sobre todas las células que lo presentan, y su expresión es relativamente inalterada por citocinas inmunes (93). El Fc $\gamma$ RIII es altamente reconocido por su alto nivel de expresión (100,000 a 200,000 sitios por célula), sobre neutrófilos humanos (92, 94). En contraste los monocitos humanos tienen poco Fc $\gamma$ RIII, aunque los macrófagos humanos así como los macrófagos derivados de monocitos, expresan altos niveles de este receptor (95).

#### CROMATOGRAFIA

A través del tiempo, los métodos de separación han evolucionado considerablemente, a tal grado que ahora es posible separar una molécula específica de entre muchas otras. Los métodos más utilizados son los métodos cromatográficos. Dentro de estos, los más frecuentemente utilizados son la cromatografía de exclusión molecular o tamiz molecular y la de intercambio iónico. En este trabajo se utilizó la cromatografía de tamiz molecular con el objeto de obtener fracciones enriquecidas de la proteína deseada.

En la cromatografía de tamiz molecular, la mezcla de proteínas disueltas en una solución amortiguadora apropiada, se deja fluir por gravedad a lo largo de una columna empaquetada con gránulos, de un material polimero inerte, de elevado grado de hidratación que ha sido previamente lavado y equilibrado con la solución amortiguadora. Los materiales más usuales para el llenado de las columnas son el Sephadex que es un derivado polisacárido, el Bio-Gel un derivado de poliacrilamida y la agarosa que es otro polisacárido, los cuales pueden estar preparados con diferente grado de porosidad interna. En las

columnas las proteínas de diferente tamaño molecular penetran en los poros internos de los gránulos en grados diferentes de intensidad y descienden a lo largo de la columna a velocidades distintas. Las moléculas de proteínas muy grandes no pueden penetrar en los poros de los gránulos, se dice que son excluidos y salen por ello en el volumen de exclusión de la columna, definido como volumen de la fase acuosa en el exterior de los gránulos. Por otra parte, las proteínas muy pequeñas pueden penetrar libremente en el poro de los gránulos, que obstaculiza su paso a través de la columna, mientras que las proteínas de gran tamaño la atraviesan con rapidez ya que no pueden penetrar en las partículas polímeras hidratadas (96, 97).

#### INTERLEUCINA-1

La interleucina 1 (IL-1) es una citocina polipeptídica inmunoreguladora, producida primordialmente por fagocitos mononucleares, pero también por muchos otros tipos celulares (98, 99). En base en el principio del punto isoelectrico (PI), dos formas de IL-1 han sido identificadas: IL-1 alfa (PI 5.0) y IL-1 beta (PI 7.0).

La forma predominante de la IL-1 secretada en la estimulación de macrófagos de humanos es la IL-1 beta. Ambas interleucinas son primero sintetizadas con una secuencia de señales convencionales como pro-hormonas intracelulares de aproximadamente 270 aminoácidos. Las pro-hormonas son procesadas para producir moléculas extracelulares de aproximadamente 17 Kilodaltones, sin embargo, la IL-1 puede ser encontrada sobre la superficie celular del macrófago.

La IL-1 tiene un profundo efecto sobre algunos procesos inmunológicos, regula la renovación tisular, la reparación e inflamación por medio de su actividad reguladora sobre algunos tipos celulares como células endoteliales, granulocitos, osteoclastos, condrocitos, fibroblastos, células hematopoyéticas, células nerviosas y células linfoides (100 a 103). El daño

titular profundo puede ocasionar una producción sin restricción de IL-1, sin embargo, la mayoría de los procesos inmunoinflamatorios están regulados. Esto sugiere que el mecanismo que existe para regular la transcripción, libera y regula los receptores biológicamente importantes para los efectos de la IL-1 (90).

Con base en lo descrito anteriormente, no cabe duda de la importancia que tiene el buen funcionamiento de los macrófagos en el organismo, y aunque se conocen muchas de sus funciones, cada día hay algo nuevo. Es por ello que, con la finalidad de conocer la relación que existe entre el macrófago y el granulocito neutrófilo, se llevó a cabo este trabajo, que trata de determinar algunas de las propiedades diferenciadas que tiene el CSF secretado por macrófagos sobre los precursores mieloides de MO, en específico sobre los precursores del granulocito neutrófilo.

## MATERIALES Y METODOS

**MATERIAL BIOLÓGICO** - Para la realización de este trabajo se utilizaron ratones hembra de la cepa CD-1 de 8 a 12 semanas de edad.

**CONDICIONES DE CULTIVO** - Se trabajó en una campana de cultivo previamente humedecida 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 en autoclave a 15 libras de presión durante 20 minutos.

Para el cultivo in vitro de las células de macrófagos residentes (MacR) y de médula ósea (MO), se utilizaron cajas petri de plástico (Durango Vela, Méx) de 60 x 15 mm y placas de microcultivo con pozos de 6.4 mm de diámetro (Costar, USA), las cuales contenían un volumen de cultivo celular de 5 ml y de 200  $\mu$ l respectivamente. 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 Estreptomicina 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 micrómetros 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 % 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 micrómetros 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 con base en los grupos y colonias formadas.

**CULTIVOS** - Todos los cultivos de células de médula ósea y de macrófagos residentes, se llevaron a cabo en EM suplementado con 10% de SC y 40% del medio condicionado de macrófagos o de otros tipos celulares, utilizados como inductor. Todos los cultivos de MD y de timocitos fueron llevados a cabo en placas de microcultivo, mientras que los cultivos de macrófagos residentes fueron realizados en cajas petri de plástico.

**MOLECULAS OBTENIDAS POR RECOMBINACION GENETICA** - Las sustancias recombinantes utilizadas en este trabajo fueron: interleucina-1, 20 ul de una solución stok (150 ng/ml) añadida a los cultivos respectivos; factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF), 5 ul de la solución stok (20 ug/ml) adicionada a los cultivos respectivos.

**PREPARACION DE LA DILUCION DE INMUNOGLOBULINA G (IgG)** - Se diluyó inmunoglobulina G (7s, IgG, Cordis Labs, USA) en SAF a 1 : 1,600. Se almacenaron 4 ml en tubos de ensayo y se conservaron congelados a - 20 C hasta su uso. Siempre se utilizó el total de IgG diluida una vez descongelada para evitar la pérdida de su actividad.

**TECNICA DE ROSETAS** - Con el objeto de obtener eritrocitos opsonizados con anticuerpo (EA), se obtuvo sangre de carnero (eritrocitos de carnero (EC)), mediante punción yugular en forma aséptica, inmediatamente después se colocó en Solución de Alsever (Apéndice 3) en proporción 1:1, 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 opsonizar a los EC, se toma 1 ml de la sangre de carnero en solución Alsever y se lava tres veces con SAF, se centrifuga a 800 gravedades, para posteriormente agregar IgG en una proporción 1:1. Esta mezcla se resuspendió e incubó en baño maría a 37 C durante 30 min, para obtener eritrocitos cubiertos con anticuerpo. Los eritrocitos así obtenidos se lavaron con SAF para quitar el exceso de IgG libre. Finalmente se resuspendieron los eritrocitos opsonizados en el doble del volumen de SAF utilizado para su preparación y se almacenaron a 4 C hasta su uso, sin exceder de 5 días.

TECNICA EN BICAPA DE AGAR - Esta técnica consta de dos capas de agar sobrepuestas en una caja de cultivo. Para la primera capa se preparó agar (Dacto 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 20X de ME, 20X SC, 20X MCP y 20X ME doblemente concentrado (2X), el volumen final es de 5 ml por 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 con agar al 1.83 % en agua bidestilada, se colocaron 300 mil células de médula ósea en ME, en esta capa se utilizó 10X de SC, 50X de ME con 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.

MEDIOS CONDICIONADOS - El medio condicionado de macrófagos residentes (MacR) se preparó mediante el cultivo de MacR estimulados con 10 ul de lipopolisacáridos (LPS) obtenida de una solución stok (1ug/ml) por caja, se incubaron durante 4 días a 37 C en EM suplementado con 10X de SC. Al término de este periodo se colectó el medio de cultivo de las cajas de petri (medio condicionado (MC)) y se centrifugó a 500g por 5 min para eliminar a las células. Se almacenó el sobrenadante a -20 C hasta su uso.

El medio condicionado de macrófagos inducidos (MacI) se obtuvo al cultivar macrófagos que fueron inducidos en la cavidad peritoneal al inyectar a los ratones 3 ml de caseinato de sodio al 10 % en la cavidad peritoneal (apéndice 4), para ser obtenidos después de 4 días como los MacR. Los MacI se cultivaron de manera similar a los MacR para elaborar MC.

Medio condicionado de epitelio (MCE) y medio condicionado de fibroblastos (MCF) - Estos medios se preparan al cultivar células de epitelio de riñón y fibroblastos de pulmón en EM suplementado con 10% de SC, se incuban por 4 a 7 días, al término de los cuales se colecta el MC y se procesa de manera similar que a los anteriores.

PRUEBAS DE ESTERILIDAD - Para probar la esterilidad de los medios y soluciones empleados en nuestros cultivos, se colocó una gota de estas en un tubo de ensayo que contiene 2 ml de Caldo de Soya Trypticaseína al 3 %, o caldo de Sabouraud (Richon, Méx), previamente esterilizados en autoclave, se incubaron por 48 hrs a 37 C, al término de lo cual se verifica si hay desarrollo de microorganismos contaminantes.

OBTENCION DE MACROFAGOS RESIDENTES - Se sacrificaron ratones mediante la dislocación céfalo-medular para proceder a lavar la cavidad peritoneal mediante una inyección de 10 ml de SAF, enseguida se da una ligera sacudida al animal con el objeto de suspender la mayor cantidad de células residentes, y poder de esta forma recuperarlas al extraer el SAF inyectado. El exudado se colocó en un tubo de plástico previamente enfriado para evitar la adherencia de los fagocitos a las paredes del tubo. Este procedimiento de extracción de células se repitió por dos o tres veces, se varió la cantidad de SAF inyectado, se utilizó 5 ml en vez de 10 ml de SAF. Las células obtenidas se lavaron tres veces con SAF, se resuspendieron en EA, se contaron y se sembraron 4 millones en cajas de plástico. Se incubaron durante 1 hora a 37 C para permitir la adhesión de los fagocitos al sustrato del



recipiente de cultivo. Transcurrido este tiempo se procedió a retirar el ME en el que iban todas aquellas células no adheridas. En seguida se lavó tres veces la caja con SAF. Por último se agregó EM con 10% de SC y 40% de inductor en las cajas que lo requirieron.

**OBTENCION DE CELULAS DE MEDULA OSEA** - Con el objeto de obtener células viables de MO se sacrificaron ratones mediante la dislocación cefalo-medular para proceder a retirar 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 ensayo para posteriormente lavarlos 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), para obtener las células Totales (T) en EM. Se sembraron para cada experimento 400,000 células por pozo, resuspendidas en EA al 10% de SC y con un 40% de inductor.

#### OTROS PROCEDIMIENTOS

**Teñido de células** - Para hacer frotis de las células mieloides se procedió de la siguiente manera: las células se colocaron en portaobjetos mediante una centrifuga especial ('cytopspin' Shandon Southern U.S.A.) a 1,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos, posteriormente se fijan con metanol y se tiñen con el Hemocolorante Rápido Sigma (Sigma de México).

Para la determinación de rosetas en macrófagos, se adicionó 0.1 ml de eritrocitos opsonizados a las cajas de cultivo y se incuban a 37 C durante 1/2 hora, pasado el tiempo de incubación se lavaron las cajas con SAF y se procedió a fijar los cultivos con metanol, teñirlos y evaluarlos.

CONFIABILIDAD DE RESULTADOS - Todos los experimentos realizados en este trabajo, se efectuaron por duplicado. Cada experimento se realizó independientemente uno de otro y los resultados se expresan como el promedio de estos valores. Los cálculos de la desviación standar se encuentran entre el 0.5 % como valor mínimo y el 7.0 % como valor máximo.

## RESULTADOS

INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD FAGOCITICA Y DE LA EXPRESION DE RECEPTORES Fc EN MACROFAGOS RESIDENTES (MacR), ESTIMULADOS CON EL MEDIO CONDICIONADO DE UNA LINEA CELULAR DE TIPO MACROFAGICO (MC-WR19M.1).

Es conocido que los macrófagos son células capaces de inducir a su propia diferenciación (104). Es más se han identificado factores producidos por estas células que tienen la propiedad de inducir tanto la proliferación como la diferenciación de precursores hematopoyéticos mieloides (76, 105). Aunque en un principio se pensó que una sola molécula tenía la propiedad tanto de inducir a la proliferación como a la diferenciación a los macrófagos (100), recientemente se ha encontrado que son varias moléculas las que actúan en conjunto para producir células funcionalmente maduras (106, 107, 108, 109).

Por tanto, gran esfuerzo se desarrolla hoy en día para determinar qué molécula tiene la propiedad de inducir a la proliferación celular (llamado factores estimuladores de colonias 'CSF' (del inglés Colony Stimulating Factor)) y cuales las de diferenciación. Entre las de diferenciación se encuentran las de receptores inmunológicos como son las de inducción de receptores para Fc (FcRI) y para C3 (C3RI) (104).

Con la finalidad de determinar si las células de tipo macrófago, son capaces de producir moléculas diferenciadoras, ya sea para estimular la fagocitosis específica (FcRI) o la fagocitosis inespecífica, se utilizó el medio condicionado de la línea celular tipo macrófaga WR19M.1 (MC-WR19M.1) que ya ha demostrado secretar al medio de cultivo factores de proliferación y diferenciación, que actúan sobre células de tipo macrófago. Para ello se cultivaron durante 4 días 8 millones de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón (MacR) y se evaluó el porcentaje de células que presentaron aumento tanto en los

receptores para Fc, como en la capacidad de fagocitar partículas de látex de 1.1  $\mu$ m de diámetro (tabla 1).

En la primera serie de experimentos se comparó únicamente la capacidad inductora del medio condicionado de fibroblastos (MCF) con la del MC-WR19M.1 y se obtuvo que la del MCF era significativamente más intensa para la inducción de rosetas para EA (eritrocitos con anticuerpo), mientras que semejante a la de fagocitosis de partículas de látex. Sin embargo para determinar si existía algún aumento respecto a las células en ausencia de estos inductores, en la segunda serie de experimentos se procedió a comparar con un control. En este caso se obtuvo nuevamente que MCF era más efectivo para la inducción de rosetas EA, pero que ninguno de los dos inductores era capaz de inducir la fagocitosis de partículas de látex (tabla 1).

Inductor	% Rosetas en MacR				% de Fagocitosis en MacR				
	RD	RF	TR	TD	<10	>10	TF	TO	
Exp 1 MC-WR	19	0	19	81	14	0	14	86	
	MCF	50	12	62	38	13	0	13	87
Exp 2	C	22	5	27	73	12	1	13	87
	MC-WR	29	5	34	66	12	1	13	88
	MCF	31	13	44	56	12	0	13	87

**Tabla 1. Determinación de la actividad fagocítica y expresión de receptores Fc en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal (MacR). (C) control, (MC-WR19M.1) medio condicionado de la línea macrofágica transformada WR19M.1, (MCF) medio condicionado de fibroblastos de pulmón, (RD) rosetas débiles, (RF) rosetas**

fuertes, (TR) total de rosetas, (TD) total de células desnudas, (<,>) células que fagocitan menos de, o más de 10 partículas de látex respectivamente, (TO) total de células que no fagocitan.

Los resultados de estos ensayos demuestran que el MC-WR19M.1 no estimula ni a la expresión de receptores Fc ni a la actividad fagocítica de los MacR. Por tanto podemos suponer que estas células no tienen la capacidad de inducir la autorregulación de la fagocitosis. Por otra parte el MCF de pulmón que se sabe contiene FcRI estimuló como era de esperarse a la formación de rosetas de tipo EA. Sin embargo este MCF no indujo la fagocitosis de partículas de látex. Este resultado nos indica que es probable que sean diferentes los factores de estimulación para la fagocitosis específica de la inespecífica.

La falta de respuesta de los MacR a ser inducidos a la diferenciación por el MC-WR19M.1, puede deberse por un lado a que las células no sean sensibles a este factor o a que sencillamente los MacR estén en una etapa de diferenciación tal, que ya no respondan a un factor que pudiera diferenciar a células menos maduras. Debido a esto, consideramos que podría ser más informativo para resolver entre estas posibilidades, el utilizar un sistema en donde se encontraran células en diferentes estadios de diferenciación. Por ello se procedió a evaluar dicha actividad en células de médula ósea (MO), en donde es conocido que existen células de la línea monocito-macrófago en todos los estadios de diferenciación.

#### DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DIFERENCIADORA DEL MC-WR19M.1 SOBRE PRECURSORES DE MACROFAGOS Y GRANULOCITOS DE MEDULA OSEA DE RATON.

Existen evidencias que sugieren la existencia de un precursor común para los granulocitos y los macrófagos (45,110), se creyó conveniente el determinar si el MC-WR19M.1 presentaba el igual que con los MacR la imposibilidad de inducir a la formación de rosetas para EA. Para ello se utilizaron 8 millones de

células de MD y se mantuvieron en cultivo durante 4 días en presencia de 40% de este medio condicionado. Al final del período de incubación se aplicó la técnica de rosetado EA y se tiñeron las células con la finalidad de evaluar morfológicamente a los granulocitos que presentaban formación de rosetas (tabla 2).

Inductor	% de rosetas en MD				% Granulocitos	
	RD	RF	TR	TD	CB	G
C	2	0	2	98	98	2
MC-WR19M.1	2	1	3	97	8	92

Tabla 2. Evaluación de la capacidad diferenciadora del MC-WR19M.1 sobre células de Médula ósea (MO) y análisis de granulocitos. (C) control, (MC-WR19M.1) medio condicionado de la línea macrófaga transformada WR19M.1, (RD) rosetas débiles, (RF) rosetas fuertes, (TR) total de rosetas, (TD) total de células desnudas, (CB) células en banda, (G) granulocitos maduros.

Encontramos que los granulocitos de la MD tampoco presentaron un aumento de rosetas para EA respecto al control sin medio condicionado (Tabla 2). Sin embargo al analizar la morfología de las células de tipo granulocítico, nos encontramos que, aunque los granulocitos no presentaban receptores para Fc estas se encontraban morfológicamente muy diferenciados, cuando se incubaban en presencia del MC-WR19M.1. En efecto, en presencia de este medio condicionado el 92% de los granulocitos presentaban una morfología nuclear altamente segmentada, evidencia de una diferenciación muy avanzada, mientras que en ausencia de este medio condicionado sólo el 2 por ciento de las células presentaban esta morfología. El 98% de los granulocitos que no presentaron morfología altamente segmentada, presentaron

núcleo en forma de banda que indica que se encuentran en una fase intermedia de su diferenciación. Además del análisis morfológico encontramos que los granulocitos constituyeron el 56% del total de células blancas, mientras que el 40% fue de células tipo macrófago y el 4% de células restantes fueron de tipo blástico. El hecho de que el porcentaje de células de tipo macrófago encontrado no presentaba formación de receptores para Fc parece indicar que probablemente el MC-WR19M.1 carezca de este tipo de inductor puesto, que se supone que en la MO se encuentran presentes todos los estadios de diferenciación de este tipo de célula.

Nuestros resultados en consecuencia parecen indicar que los macrófagos transformados son capaces de producir un factor diferenciador de granulocitos. Estos resultados van de acuerdo con otros (111) en los cuales se demuestra que los macrófagos son capaces de modular la diferenciación de células granulocíticas. Por tanto sería conveniente el determinar si el factor de diferenciación morfofisiológica de granulocitos proveniente de macrófagos tiene otras propiedades de inducción a la diferenciación de estas células.

#### EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DEL MC-WR19M.1 SOBRE LA DIFERENCIACION DEL SISTEMA MONOCITO-GRANULOCITO EN CELULAS DE MEDULA OSEA.

Una vez determinado que el MC-WR19M.1 tiene actividad diferenciadora sobre células de tipo granulocítico, se procedió a evaluar si dentro de estas propiedades de diferenciación también se encuentra la de inducción a la fagocitosis.

Por otra parte, al utilizar células de MO se encontró, que el MC-WR19M.1 no tiene capacidad inductora de receptores Fc en células de la línea macrófaga, pero aun no hemos evaluado si

tiene capacidad de inducción a la fagocitosis sobre este tipo de células. Por consiguiente se procedió en forma simultánea a la evaluación de inducción de fagocitosis de granulocitos y macrófagos de MO por el MC-WR19M.1 para completar este estudio (tabla 3).

5

Para ello se sembraron  $4 \times 10^5$  células de MO en presencia de 40% del medio condicionado durante 4 días. Posteriormente a este periodo de incubación se procedió a realizar el ensayo de fagocitosis, a tener las células y a efectuar una evaluación diferencial de aquellas que habían sido inducidas a la fagocitosis. Nuevamente como control negativo agregamos un cultivo sin inductores. En esta ocasión también se agregaron el medio condicionado por epitelios (MCE) el MCF como controles positivos ya que se ha reportado que este tipo de células estromales tienen la capacidad de inducir a la diferenciación de células de tipo macrófago y granulocítico (108, 112, 113, 114, 115, 116).

% Fagocitosis

Inductor	Granulocito			Macrófagos		
	<5	>5	T	<10	>10	T
C	19	3	22	10	24	34
MC-WR19M.1	35	21	56	36	47	83
MCF	26	22	48	54	35	89
MCE	35	28	63	ND	ND	ND

Tabla 3. Evaluación de la actividad fagocítica de macrófagos y granulocitos de MO en presencia de diferentes inductores. (C) control, (MC-WR19M.1) medio condicionado de la línea macrófaga



transformada WR19M.1, (MCF) medio condicionado de fibroblastos de pulmón, (MCE) medio condicionado de células epiteliales de riñón, (<,>) células que fagocitan menos de o más de 5 o 10 partículas de látex respectivamente, (T) total de células que fagocitan, (ND) no determinado a causa de la escasez de células de macrófagos en presencia de este inductor.

Nuestros resultados muestran que tanto el MC-WR19M.1 como los MCE y MCF tienen una actividad inductora de la fagocitosis en granulocitos de MO, ya que respecto al control esta actividad aumentó en más del doble (Tabla 3). Aquí, parece que los macrófagos también fueron inducidos importantemente a la fagocitosis, sin embargo cuando se observaron los cultivos al microscopio antes de ser procesados para la prueba de fagocitosis, se encontró que un gran número de macrófagos permanecieron adheridos al sustrato. Suponemos que esta observación proviene del hecho de que en ausencia de factores inductores, los macrófagos inmaduros de la MO tienen tendencia a adherirse a las superficies de las cajas de cultivo y mantenerse en cultivo por muchos días más, mientras que los granulocitos en ausencia de este tipo de factores, tienden a lisarse a los tres días de cultivo.

En consecuencia no sabemos si el aumento del porcentaje de macrófagos con capacidad fagocítica en nuestros experimentos se debió justamente al aumento proporcional de este tipo de células al morir los granulocitos, o al hecho de que existe una molécula inductora de esta propiedad para este tipo de células en el MC-WR19M.1. Se procedió a efectuar un análisis morfológico de las células que se encontraban en los cultivos del ensayo anterior, para esclarecer estas posibilidades (tabla 4).

## II. Análisis Morfológico

Inductor	CB	G	TG	Mac	B	T
C	44	2	46	31	3	34
MC-WR19M.1	3	83	86	10	4	14
MCF	1	67	68	18	14	32
MCE	1	77	78	14	8	22

Tabla 4. Determinación de la capacidad de inducción a la diferenciación que tienen diferentes inductores sobre células de MO. (C) control, (MC-WR19M.1) medio condicionado de la línea macrofágica transformada WR19M.1, (MCF) medio condicionado de fibroblastos de pulmón, (MCE) medio condicionado de células epiteliales de riñón, (CB) células en banda, (G) granulocitos maduros, (TG) total de granulocitos, (Mac) macrófagos, (B) células blásticas, (T) total.

Nuestros resultados muestran que tal, como lo supusimos en los cultivos control sin medio condicionado existía una proporción mucho menor de granulocitos respecto a los macrófagos (Tabla 4). Puesto que esta diferencia fue de más del doble y que el aumento de la fagocitosis inducida por los diferentes factores en macrófagos también fue de este orden de magnitud creemos haber demostrado que no existe inducción a la fagocitosis por el MC-WR19M.1 en células de tipo macrofágico, mientras que es muy

evidente en células de tipo granulocítico. Este fenómeno registrado en este ensayo, pudo ser ocasionado por un pipeteo no homogéneo al tomar las muestras para llevar a cabo las preparaciones de fijación y tinción de las células.

Podemos suponer en base a los resultados, que las células de tipo macrófágico son capaces de producir factores de regulación de la diferenciación de células de tipo granulocítico. Por otro lado también encontramos que estas mismas células son incapaces de inducir a los granulocitos a expresar receptores para FC, lo cual nos indica que deben de existir varios tipos de factores para la inducción de las propiedades de diferenciación de granulocitos y no sólo una moléculas con todas estas características. Es más consideramos que sería conveniente el efectuar una separación bioquímica de las moléculas contenidas en el MC-WR19M.1, para determinar si las propiedades de inducción a la fagocitosis y a la diferenciación morfofisiológica son responsabilidad de una o de dos diferentes moléculas.

#### CARACTERIZACION DE LA FRACCION DIFERENCIADORA DE GRANULOCITOS

Con la finalidad de determinar el peso molecular de los factores que pudieran estar involucrados en la inducción de los cambios morfofisiológicos (fagocitosis y morfología madura) en granulocitos, en base a una cromatografía por filtrado molecular del MC-WR19M.1 y provando su actividad de CSF en cultivos de MO en agar realizado anteriormente en este laboratorio (Fig. D) (110), se obtuvo que las fracciones 44, 45, y 46 forman un pico de actividad estimuladora de colonias, el mayor número de colonias lo presenta la fracción de 45 por lo que se dice que este factor tiene un peso molecular de 45,000 daltones.

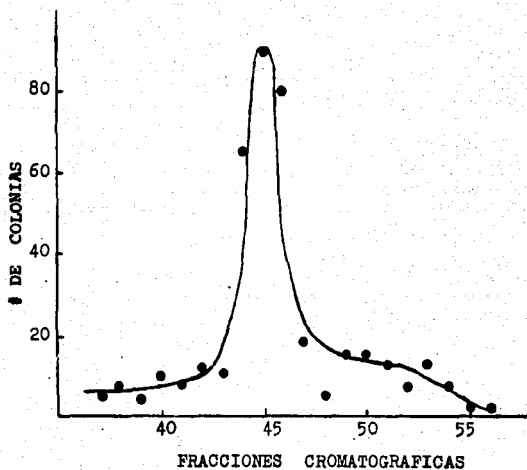


Fig. D. Determinación de la actividad inductora de colonias en las fracciones cromatográficas del medio condicionado de la línea tipo macrofónica WP19M.1 sobre cultivos de agar (110)

Con la finalidad de determinar si la molécula activadora CSF contenida en este medio condicionado también tenía funciones diferenciadoras de granulocitos, se procedió a utilizar las fracciones cromatográficas 44, 45 y 46 en donde se sabía estaba este factor (110, 117). Para ello se realizaron los ensayos de fagocitosis y morfología en células de MO, en los que se utilizó 80 ul de una mezcla de éstas fracciones. Como controles positivos se utilizaron lipopolisacáridos bacterianos (LPS) de paredes de Salmonella Typhimurium, MCF, MCE y MC-WR19M.1 que se sabe tienen este tipo de actividad y como negativo un cultivo sin inductores (Tabla 5 y 6).

% Analisis Morfológico		
Inductor	CB	G
C	89	11
MCE	10	90
MCF	35	65
MC-WR19M.1	11	89
Fracciones	13	87

Tabla 5. Determinación de la actividad diferenciadora del MC-WR19M.1 y la mezcla de las fracciones cromatográficas 44, 45 y 46 de este mismo medio. (C) control, (MCE) medio condicionado de células epiteliales de riñón, (MCF) medio condicionado de fibroblastos de pulmón, (MC-WR19M.1) medio condicionado de la línea macrofágica transformada WR19M.1, (fracciones) mezcla de las fracciones cromatográficas 44, 45 y 46 del MC-WR19M.1, (CB) células banda, (G) granulocitos polimorfonucleares maduros.

Inductor	% de Fagocitosis de Granulocitos			
	<	>	TF	T0
C	16	1	17	83
LPS	26	12	38	52
MCE	35	16	52	48
MCF	28	8	36	64
MC-WR19M.1	21	25	46	54
Fraciones	35	27	62	38

Tabla 6. Evaluación de la actividad fagocítica de granulocitos de MO al ser estimulados con diferentes inductores. (C) control, (LPS) lipopolisacáridos de paredes bacterianas de Salmonella typhimurium, (MCE) medio condicionado de células epiteliales de riñón, (MCF) medio condicionado de fibroblastos de pulmón, (MC-WR19M.1) medio condicionado de la línea macrofágica transformada WR19M.1, (fracciones) mezcla de las fracciones cromatográficas 44, 45 y 46 del MC-WR19M.1, (<,>) células que fagocitan menos de o más de 5 partículas de látex, (TF) total de células que fagocitan, (T0) total de células que no fagocitan.

Estos resultados muestran que aparte del MC-WR19M.1 la mezcla de las fracciones cromatográficas también induce cambios morfológicos en los granulocitos neutrófilos. En efecto mientras que en los cultivos sin inductor las células en banda representan el 89 % del total de granulocitos y aquellas polimorfonucleadas sólo el 11 %, en presencia de las fracciones 44, 45 y 46, el número mayoritario correspondió a las polimorfonucleadas con un 87 % del total y sólo contenían un 13 % de células en banda (Tabla 5). La actividad diferenciadora de la morfología nuclear

del granulocito contenida en las fracciones cromatográficas fue semejante a la obtenida por el MC-WR19M.1 y el MCE, y significativamente mayor a la del MCF. En consecuencia podemos suponer que la molécula inductora a la diferenciación de granulocitos en banda a granulocitos maduros tiene un peso similar al CSF contenido en el MC-WR19M.1 ya que ambas se encuentran en las mismas fracciones.

Cuando se evaluó la inducción a la fagocitosis de los granulocitos neutrófilos por los diferentes inductores se encontraron resultados similares a aquellos de inducción a la morfología madura de estas células (Tabla 6). Sin embargo en esta serie de experimentos las fracciones cromatográficas presentaron la mayor actividad inductora, se encontró que la inducción era de más del triple (62 %) de aquella del control negativo (17 %). Nuevamente todos los controles positivos mostraron tener capacidad de inducción a la fagocitosis y el MCF fue aquel que presentó la menor. Por tanto se puede suponer que las fracciones incluyen al inductor de la diferenciación morfológica de granulocitos, al de inducción a la fagocitosis y al de formación de colonias, que tienen pesos moleculares similares. Esto no nos permite descartar la posibilidad de que el efecto corresponda a otras moléculas. Sin embargo el hecho de haber encontrado que las fracciones del MC-WR19M.1 que contenían al CSF también inducían propiedades de diferenciación en granulocitos, no excluye que puedan existir otras moléculas con estas mismas propiedades. Una vez que se sabe que el CSF contenido en el MC-WR19M.1 tiene la propiedad de diferenciar granulocitos, sería interesante saber si este CSF tiene propiedades de G-CSF.

DETERMINACION DE QUE EL MC-WR19M.1 CONTIENE ACTIVIDAD DE G-CSF Y MAS DE UNA MOLECULA CON PROPIEDADES DIFERENCIADORAS DE GRANULOCITOS.

Después de determinar el efecto diferenciador del MC-WR19M.1

sobre granulocitos de MO y de demostrar que las fracciones con actividad de CSF son las responsables de tales efectos, se consideró adecuado ensayar todas las fracciones cromatográficas del MC-WR19H.1 sobre cultivos líquidos de MO para detectar la posible existencia de otras moléculas contenidas en este medio condicionado, con propiedades de inducción a la morfología madura de granulocitos y a la fagocitosis (Figura E). Además en los ensayos de CSF se tiñeron las células para evaluar que tipo de colonias se producían.

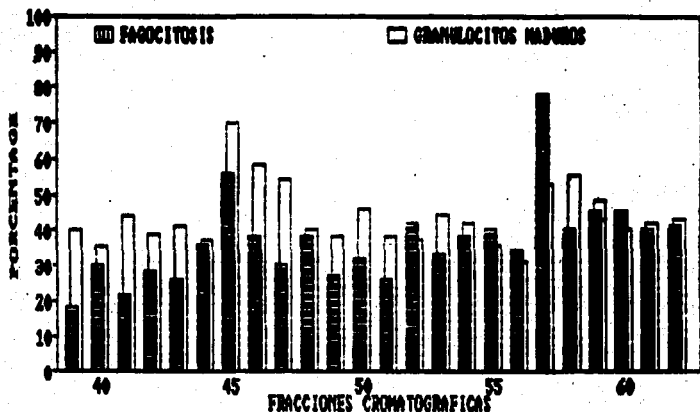


Fig. E. Determinación de las propiedades estimuladoras o la diferenciación (morfológica y fagocítica) de las fracciones cromatográficas del MC-WR19H.1 en células de MO en cultivos en líquido.



Encontramos que existen dos picos de activación con propiedad diferenciadora de granulocitos, uno correspondiente al previamente descrito (Fig.D) con un peso molecular de 45,000 daltones el cual demostramos tiene actividad diferenciadora y proliferadora de granulocitos neutrófilos (Tabla 5), y un segundo pico situado en las fracciones E7 y E8, con similar actividad diferenciadora, pero sin actividad de CSF, cuyo peso molecular es de 17,000 daltones. Es conveniente hacer notar (Fig E), que la actividad inductora de fagocitosis fue mayor en la fracción de 17,000 daltones, mientras que la de inducir morfología fue mayor en la de 45,000.

Sería interesante el determinar si este pico de 17,000 daltones es la interleucina 1, la cual se sabe es producida por macrófagos, que pesa 17,500 daltones y que tiene propiedades de diferenciación en células mieloides (117, 118).

Con la finalidad de determinar si el CSF contenido en el MC-WR19M.1 tiene actividad de G-CSF se efectuó un ensayo de colonias en agar en el que se utilizó como controles positivos una molécula recombinante humana de G-CSF (rhG-CSF) y el MCE que se sabe induce a la formación tanto de colonias de macrófagos como de granulocitos. Como controles complementarios se emplearon el MCF que se sabe sólo induce a colonias de macrófagos y un cultivo sin medios inductores. Por otra parte se utilizaron también los medios condicionados por macrófagos residentes de la cavidad peritoneal del ratón, para determinar si las células normales de tipo macrófágico también son capaces de inducir colonias y de que tipo (tabla 7).

% DE COLONIAS

INDUCTOR	GRANULOCITOS			Mac	B	TC
	CB	G	TG			
C	0	0	0	0	0	0
MC-WR19M.1	18	76	94	6	0	250
rhG-CSF	11	69	80	14	6	625
MC-MacR	16	56	72	22	6	645
MC-MacI	0	0	0	0	0	0
MCF	1	9	10	90	0	289
MCE	9	37	46	45	9	500

Tabla 7. Determinación de la capacidad inductora a la diferenciación que tienen diferentes inductores sobre células de MD en cultivos de agar. (C) control, (MC-WR19M.1) medio condicionado de la línea macrofágica transformada WR19M.1, (rhG-CSF) factor estimulador de colonias de granulocito recombinante humano, (MC-MacR) medio condicionado de macrófagos residentes, (MC-MacI) medio condicionado de macrófagos inducidos, (MCF) medio condicionado de fibroblastos de pulmón, (MCE) medio condicionado de células epiteliales de riñón, (CB) células en banda, (G) granulocitos maduros, (TG) total de granulocitos, (Mac) macrófagos, (B) células blásticas, (TC) total de colonias.

Los resultados encontrados nos indican que efectivamente el MC-WR19M.1 y el rhG-CSF tienen actividad similar sobre células de MO (Tabla 7).

Es de notar que el CSF contenido en el MC-WR19M.1 resultó ser más efectivo en la inducción de colonias de tipo granulocítico pues el 94 % de ellas demostraron tener esta morfología, mientras que con el rhG-CSF sólo la presentaron el 80% (tabla 7). Probablemente por ser el factor recombinante una molécula que carece de las cadenas glucosídicas al ser producida en células procariontas, resultó tener menor capacidad inductora que la de la moléculas producida por células eucariontas.

Tal y como era de esperarse el MCF produce principalmente colonias de tipo macrofágico y el MCE tanto colonias macrofágicas como granulocíticas (Tabla 7). Es de llamar la atención que sólo los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal presentaron actividad inductora semejante a la encontrada por el rhG-CSF, mientras que los inducidos no presentaron actividad alguna. Estos resultados nos indican que los macrófagos normales sí pueden producir G-CSF pero no en todas sus etapas de diferenciación.

Al evaluar las propiedades de diferenciación sobre granulocitos de los diferentes inductores empleados para la determinación de la presencia del G-CSF en cultivos en líquido, encontramos nuevamente que el efecto de diferenciación morfológica y de fagocitosis inducidos por el rhG-CSF fue muy similar al del MC-WR19M.1 excepto en blastos y al del MC-MacR, y que el MC-MacI carecía de este tipo de actividades, cuyo efecto fue similar al del control (Tabla 8 y 9).

% Analisis Morfológico

GRANULOCITOS

Inductor	CB	G	TG	Mac	B	T
C	53	14	67	25	8	33
MC-WR19M.1	15	62	77	18	5	23
rhG-CSF	10	67	77	12	11	23
MC-MacR	14	72	86	9	5	14
MC-MacI	51	13	64	28	8	36
MCE	16	65	81	11	8	19
MCF	7	61	68	20	12	32

Tabla 8. Comparación del efecto diferenciador que tienen diferentes inductores sobre células de MC. (C) control, (MC-WR19M.1) medio condicionado de la línea macrofágica transformada WR19M.1, (rhG-CSF) factor estimulador de colonias de granulocito recombinante humano, (MC-MacR) medio condicionado de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal, (MC-MacI) medio condicionado de macrófagos inducidos a la cavidad peritoneal, (MCE) medio condicionado de células epiteliales de riñón, (MCF) medio condicionado de fibroblastos de pulmón, (CB) células en banda, (G) granulocitos maduros, (TG) total de granulocitos, (Mac) macrófagos, (B) células blásticas. (T) total.

% de Fagocitosis de Granulocitos

Inductor	<5	5-10	TF	T0
C	24	7	31	62
MC-WR19M.1	27	20	47	53
rhG-CSF	44	24	68	32
MC-MacR	39	23	62	38
MC-MacI	27	10	37	63
MCE	28	16	44	56
MCF	31	20	51	47

Tabla 9. Comparación del efecto que tienen diferentes inductores sobre la actividad fagocítica de granulocitos de MO. (C) control, (MC-WR19M.1) medio condicionado de la línea macrofágica transformada WR19M.1, (rhG-CSF) factor estimulador de colonias de granulocitos recombinante humano, (MC-MacR) medio condicionado de macrófagos residentes, (MC-MacI) medio condicionado de macrófagos inducidos, (MCE) medio condicionado de células epiteliales de riñón, (MCF) medio condicionado de fibroblastos de pulmón, (<,>) células que fagocitan menos de o más de 5 partículas de látex, (TF) total de granulocitos que fagocitan, (T0) total de células que no fagocitan.

En esta serie de experimentos encontramos que también el MCF y el MCE tenían una actividad muy importante de diferenciación. Como los experimentos se realizaron con las células totales de la MO es muy difícil determinar si los MCF y el MCE tenían este tipo

de actividad diferenciadora, o era a través de los macrófagos presentes en dicha médula, los cuales se sabe son activados por estos medios condicionados a secretar todo tipo de factores inductores, entre ellos el G-CSF (105, 108, 111).

#### IDENTIFICACION COMO IL-1 AL FACTOR DE 17,000 DALTONES CONTENIDO EN EL MC-WR19M.1 CON ACTIVIDAD DIFERENCIADORA DE GRANULOCITOS.

Ya que se encontró que el MC-WR19M.1 contiene dos factores con la capacidad de inducir a la diferenciación de granulocitos (Fig E), contenidos en diferentes fracciones cromatograficas de este medio, se consideró conveniente el tratar de identificar de que tipo de inductores se trataba. El primer factor de 45,000 daltones fue facilmente identificado ya que correspondía al G-CSF tal y como se demostró por el efecto durante este trabajo, al encontrar que inducía a la formación de colonias de granulocitos polimorfonucleados. Sin embargo, el otro factor de 17,000 daltones no presentó actividad formadora de colonias. En la literatura científica de factores reguladores de la diferenciación de granulocitos se encuentra el llamado interleucina 1 (IL-1) que tiene un peso molecular semejante. En consecuencia se creyó conveniente el determinar si este factor era IL-1 o no.

Una manera indirecta de comprobar si ésta fracción contiene IL-1 es mediante un ensayo de aumento a la inducción de la proliferación de timocitos de ratón en presencia de concavalina A. Como control positivo se utilizó interleucina-1 recombinante humana (rhIL-1) y como negativo medio de cultivo sin inductor.

Inductor	# de timocitos (X 10 <sup>5</sup> )
C	4
rhIL-1	8
MC-WR19M.1	7
Fra: 55	4
56	4.6
57	5.3
58	7
59	4.6
60	4
MC-MacR	4.4
MC-MacI	9
MCF	6
MCE	9.6

Tabla 10. Comparación del efecto a la proliferación de la Interleucina-1 con algunas de las fracciones cromatográficas del medio condicionado de la WR19M.1 y otros inductores sobre timocitos de ratón. (C) control, (rhIL-1) interleucina-1 recombinante humana, (MC-WR19M.1) medio condicionado de la línea macrofágica transformada WR19M.1, (55, 56, 57, 58, 59, 60)

fracciones cromatográficas del MC-WR19M.1, (MC-MacR) medio condicionado de macrófagos residentes, (MC-MacI) medio condicionado de macrófagos inducidos, (MCF) medio condicionado de fibroblastos de pulmón, (MCE) medio condicionado de células epiteliales de riñón; todos los inductores tuvieron concanavalina A, excepto el control sin inductor.

Nuestros resultados mostraron que el MC-WR19M.1 contenía actividad inductora de proliferación de timocitos semejante a la de rIL-1 la cual fue de casi el doble del control negativo (Tabla 10). Asimismo al analizar las fracciones cromatográficas que inducían las actividades diferenciadoras de granulocitos correspondientes al peso molecular de 17,000 daltones, encontramos una coincidencia a la actividad de IL-1. En consecuencia creemos tener evidencias para pensar que el factor de 17,000 contenido en el MC-WR19M.1 con propiedades diferenciadoras de granulocitos es justamente la IL-1. Sería conveniente en un futuro, realizar este mismo experimento con la adición de un control con concanavalina A para ver el efecto de la CoA en la proliferación de timocitos; sin embargo, tal control podría en este experimento ser representado por algunas de las fracciones que no dieron respuesta pero que si se les añadió CoA. Aunque si se desea determinar más específicamente si el factor es IL-1 u otro con actividad semejante, sería necesario proceder a una purificación del factor, creemos era de esperarse este resultado sobre todo si tomamos en cuenta que el macrófago es capaz de producir IL-1 y el MC-WR19M.1 proviene justamente de una línea de tipo macrófágico.

Por último con la finalidad de determinar si al igual que con la producción del factor G-CSF existen diferencias en la secreción de IL-1 por varios tipos de macrófagos normales, se procedió a analizar si el medio condicionado por macrófagos residentes e inducidos a la cavidad peritoneal tenían actividad de IL-1. Encontramos nuevamente que existen diferencias marcadas



entre estos dos tipos de células fagocíticas, ya que mientras el MC-MacI tenía una actividad de casi el doble comparado con el control y similar al de la IL-1 recombinante, el MC-MacR carecía de esta (Tabla 10). En este mismo experimento se incluyeron los MCF y MCE y se encontró que el MCF tenía muy poca actividad mientras que el MCE la mayor de todas.

## DISCUSION

Se sabe que en el proceso de proliferación y diferenciación de la línea monocito-macrófago, participa una familia de moléculas de naturaleza glucoprotéica denominada por sus siglas en inglés como MGI (Macrophage and Granulocyte Inducers), mejor conocida como CSFs (Colony Stimulating Factors). Se sabe que estos factores estimulan la proliferación y diferenciación no sólo de macrófagos sino también de granulocitos, y que además ejercen sus funciones a partir de células precursoras (45, 111, 119). Se tienen evidencias de que los CSF son producidos y secretados tanto por los propios macrófagos como por otros tipos celulares de tipo estromales (111, 112, 113, 114, 115). Sin embargo en este trabajo encontramos que no todas las propiedades de diferenciación (expresión de receptores Fc, fagocitosis de partículas de látex, cambio morfológico etc.) son inducidas por los CSF, sino que existe sólo una diferenciación parcial. Por tanto consideramos que deben de existir otro tipo de moléculas que junto con los CSF sean capaces de inducir la diferenciación total de los precursores mieloides a células funcionalmente maduras.

Los CSF han sido estudiados en diversos sistemas animales y aunque en todos ellos muestran propiedades activadoras similares, existe una gran heterogeneidad a nivel molecular. Esta heterogeneidad está representada por la muy variada masa molecular encontrada para estos factores, la cual se presenta con valores desde 3,000 hasta más de 200,000 daltones. Como existen muchos órganos capaces de secretar estos factores, se ha llegado a pensar que según del tejido en donde se produzcan dependerá su masa molecular. En este trabajo encontramos que las células de tipo macrófágico producen un CSF de 45,000 daltones capaz de inducir sólo a la proliferación de células de tipo granulocítico

y no de macrófagos. Por tanto consideramos que tenemos evidencia para suponer que las células de tipo macrófágico no autoregulan su proliferación (tabla 7, y figura D).

Aunque recientemente ha sido demostrado que el macrófago es capaz de secretar CSF (105, 111, 114, 119), no ha sido aclarado si este factor es también capaz de estimular otras actividades tales como las de proliferación o diferenciación en células de médula ósea (MO). En este trabajo encontramos justamente que este mismo factor es capaz de inducir la fagocitosis y diferenciación morfológica de los granulocitos.

El CSF producido por la línea de tipo macrófágico utilizada en este trabajo, no únicamente fue incapaz de inducir la proliferación de macrófagos, sino que tampoco la expresión de propiedades diferenciadoras como la de fagocitosis o la de receptores para Fc. Esto último se puede interpretar si suponemos que el medio condicionado utilizado carece de los inductores capaces de estimular la expresión de receptores Fc y el incremento de la actividad fagocítica, o porque sencillamente este medio no tenga efecto sobre células altamente diferenciadas como son los macrófagos residentes (MacR) de la cavidad peritoneal. Nosotros creemos que no existen factores inductores a la diferenciación de los MacR puesto que en nuestros ensayos el medio condicionado por fibroblastos (MCF), si estimuló la aparición de receptores Fc en este mismo tipo de células (tabla 1). Sin embargo el MCF no estimuló a un incremento de la actividad fagocítica, lo cual parece estar de acuerdo con la idea antes expuesta acerca de que el proceso de diferenciación está regulado por más de una molécula.

En otros ensayos realizados en los que se utilizaron células de la MO, encontramos que el MC-WR19M.1 no sólo es incapaz de estimular la expresión de receptores para Fc en células maduras, sino que tampoco en los precursores mieloides. Estos resultados parecen estar de acuerdo con otros recientes en 1982 (76), en los

cuales se identificó a una molécula diferente del CSF llamada FcRI que tenía la función específica de inducir a la expresión de receptores para Fc en células de MD. En consecuencia pensamos que nuestro MC-WR19M.1 carece de FcRI pero que tiene como ha sido descrito anteriormente otras moléculas capaces de inducir otro tipo de funciones de diferenciación. Si tomamos en cuenta que el CSF contenido en este medio condicionado si indujo a los granulocitos del tipo neutrófilo a desarrollar un cambio morfológico terminal al pasar de la forma en banda o dona a la segmentada o polimorfonuclear y a una abundante fagocitosis no específica, parece indicar que el CSF de macrófagos estimula a los granulocitos a ciertas funciones de diferenciación no específicas, lo que deja a otras moléculas como la FcRI la inducción de propiedades más específicas.

Es conveniente hacer notar que para este trabajo utilizamos la cromatografía por tamizado molecular del MC-WR19M.1 y que las propiedades de proliferación y diferenciación descritas se encontraron en un sólo pico de actividad de CSF correspondientes a las fracciones 44, 45 y 46. Por tanto no podemos asegurar que todas las actividades correspondían a una sola molécula, sino que todas ellas se encuentran en la misma fracción cromatográfica y por tanto poseen una masa molecular semejante. Consideramos que sería poco probable que dos o más moléculas asociadas a la proliferación y diferenciación de granulocitos se encuentren en un mismo pico cromatográfico y no presenten un peso molecular semejante, pero hasta no efectuar una purificación más a fondo de estos factores no podremos asegurarlo.

Un hecho que nos hace suponer que sea una sola molécula la que contenga actividad proliferadora y diferenciadora de granulocitos, consiste en que al utilizar una molécula extremadamente pura como lo es el G-CSF recombinante hayamos obtenido resultados semejantes. Sin embargo, la masa molecular del G-CSF es de 23,000 daltones, mientras que el del MC-WR19M.1 es de 45,000 daltones. Consideramos que la fracción de 45,000

daltones pueda tratarse de un dímero del G-CSF.

Según nuestros resultados, la molécula de 45,000 daltones es producida tanto por una línea celular de tipo macrófágico como por los macrófagos normales residentes de la cavidad peritoneal, pero no es producida por los macrófagos normales inducidos a la misma cavidad (tabla 7 y 8), lo que nos hace pensar que sólo los macrófagos con diferenciación terminal son capaces de secretar esta molécula. Esta deducción se basa en el hecho de que se supone que los macrófagos residentes son células altamente diferenciadas, mientras que los macrófagos inducidos tienen una diferenciación intermedia inmediata a la etapa monocítica existente en el torrente sanguíneo.

Sin embargo en trabajos anteriores (114, 118) se demostró que los macrófagos inducidos, si son capaces de secretar una molécula de 45,000 daltones con actividad de CSF pero sólo cuando son cultivados junto con fibroblastos o con el medio condicionado de estos (118). En este mismo trabajo se encontró que los macrófagos inducidos en ausencia de fibroblastos, eran incapaces de secretar esta molécula. Con base en lo anterior, podemos decir que los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal, así como los inducidos, si son capaces de secretar inductores de granulocitos neutrófilos (la molécula de 45,000 daltones), pero que sólo lo pueden llevar a cabo mediante un proceso de activación. En consecuencia podemos decir que el macrófago activado es capaz de regular la diferenciación morfológica y el incremento en la actividad fagocítica de los granulocitos, a parte de inducir a proliferar a sus precursores.

Por otro lado encontramos que la línea celular de tipo macrófágico es capaz de secretar al medio de cultivo una molécula diferente a la de 45,000 daltones con semejantes propiedades diferenciadoras en granulocitos. Esta molécula de 17,000 daltones no tiene sin embargo la capacidad de inducir a la formación de colonias de granulocitos. Además se ha encontrado que existe una molécula con semejante peso molecular que es secretada por los

macrófagos llamada interleucina 1 (IL-1), que además tiene la capacidad de inducir ciertas propiedades de diferenciación en células mieloides, se pensó que la molécula por nosotros detectada era justamente la IL-1, no sólo por su peso sino también por su efecto sobre timocitos de ratón y porque es secretada por el mismo tipo celular.

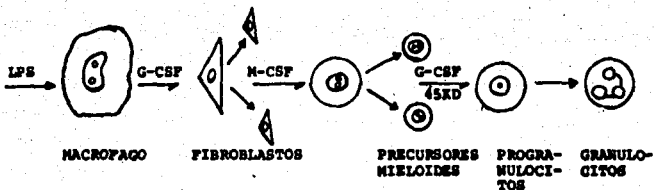
Comprobamos que la molécula de 17,000 daltones encontrada en el MC-WR19M.1, presenta un efecto similar al de la rHIL-1, al inducir la proliferación de células del timo de ratón. Este mismo efecto proliferador, lo encontramos en células epiteliales, fibroblásticas, y macrófagos inducidos, pero no en macrófagos residentes. El hecho de que los fibroblastos y las células epiteliales resultaran positivos para IL-1 en nuestros experimentos (tabla 10), no es de extrañarse, ya que se sabe que estas células son capaces de secretar esta molécula (99, 118). Sin embargo, el punto sorprendente es que mientras los MacI secretan IL-1, los MacR no lo hacen. Esto puede deberse quizás a que el macrófago inducido al no secretar la molécula de 45,000 daltones por no ser activado por el medio de fibroblastos si pueda secretar IL-1, mientras que los MacR al secretar la molécula de 45,000 daltones no son capaces de secretar la IL-1. Estas observaciones parecen indicar que la secreción de una u otra molécula depende del estado de activación de la célula, o del factor de activación.

Si se toma en cuenta que el macrófago es capaz de secretar factores de diferenciación mieloides, entonces se podría esperar que se puedan autoinducir a la diferenciación. Sin embargo en este trabajo observamos que el MC-WR19M.1 no causa efecto de autoinducción en las células de tipo macrófagico en lo referente a la expresión de receptores para Fc y al incremento de la actividad fagocítica. Evidentemente sería necesario estudiar otros parámetros de diferenciación para poder generalizar estos resultados.

A lo largo de nuestro trabajo utilizamos MO total, y por tanto no podemos saber si el efecto de activación a la proliferación de precursores mieloides y de diferenciación de granulocitos, sea debida a un efecto directo sobre estas células por las moléculas aquí descritas, o por un mecanismo indirecto. El mecanismo indirecto más conocido correspondería a aquel en el cual un factor inductor activo a una célula a secretar un segundo factor inductor, y sea justamente este último el que tenga las propiedades que se piensan residen en el primero. Por lo tanto sería conveniente en un futuro trabajar con tipos celulares más homogéneos y no con MO en donde evidentemente existe una enorme heterogeneidad celular.

Al integrar los resultados hasta aquí discutidos podemos suponer que la relación macrófago-granulocito es muy estrecha, ya que según hemos visto el macrófago desempeña un papel regulador importante de la diferenciación y proliferación de granulocitos neutrófilos. Sería muy interesante el estudiar si a su vez el granulocito es capaz de inducir en la regulación de la proliferación y diferenciación de macrófagos. Para ello sería conveniente utilizar también una línea celular de tipo mieloides y determinar si en el medio condicionado existen este tipo de moléculas.

Por último, mencionaremos que creemos pueda existir una cadena de eventos regulados por factores de inducción que intervengan en la producción de células mieloides maduras. Podemos suponer que esta cadena comienza cuando el macrófago es activado y libera factores de diferenciación y proliferación para otro tipo de células. Por ejemplo se sabe que el macrófago activa a fibroblastos a proliferar, lo cual crea en forma indirecta la secreción por los mismos fibroblastos de un factor de proliferación de precursores mieloides. Estos últimos secretarían la G-CSF de 45,000 daltones estudiada en este trabajo, la cual como vimos se encargaría de producir granulocitos altamente diferenciados (figura F).



**Fig. F. POSIBLE CADENA DE ACONTECIMIENTOS REGULADOS POR FACTORES DE INDUCCION QUE INTERVIENEN EN LA PRODUCCION DE CELULAS MIELOIDES MADURAS.**

De este modo podemos comprender la importancia que tiene los macrófagos en el sistema hematopoyético, pues no únicamente funcionan como células fagocíticas, sino también en la regulación de otras funciones, como lo sería la respuesta inmune y la de inducción de granulocitos como se ha demostrado en este trabajo.

El estudio por tanto de las moléculas secretadas por los macrófagos puede ser de gran importancia en muchas áreas de la investigación biomédica y por consiguiente en el mejoramiento del área de la salud.



Mencionaremos para terminar la posible utilidad del conocimiento de los mecanismos aquí descritos en la investigación oncológica. Como se sabe que algunas de las enfermedades hematológicas tales como las leucemias son justamente un desacoplamiento entre el mecanismo de proliferación y el mecanismo de diferenciación de estas células (120,121), entonces la aplicación clínica (como por ejemplo en las leucemias mielogramulocíticas) de factores reguladores de la proliferación y diferenciación del sistema monocito-granulocito pudiera servir de gran ayuda para crear terapias específicas para cada tipo de paciente.

## APENDICE I

### Medio Mínimo Esencial de Eagle

Este medio se utilizó para mantener a los cultivos celulares en condiciones normales in vitro. El medio está constituido de los siguientes componentes químicos:

AMINOACIDOS	CONCENTRACION (mg/l)
L-arginina	84.00
L-cistina	62.57
L-glutamina	584.00
Glicina	30.00
L-histidina HCL.H <sub>2</sub> O	42.00
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-triptofano	16.00
L-tirosina (sal disódica)	104.20
L-valina	94.00

VITAMINAS	CONCENTRACION (mg/l)
D-Ca pantotenato	4.00
Cloruro de colina	4.00
Acido fólico	7.20
Inositol	7.20
Nicotinamida	4.00

Piridoxal. HCL	4.00
Riboflavina	0.40
Tiamina	4.00

SALES INORGANICAS	CONCENTRACION (mg/l)
Cloruro de calcio anhidro	200.00
Nitrato de hierro III nohidratado	0.10
Cloruro de potasio	400.00
Sulfato de magnesio anhidro	97.67
Cloruro de sodio	6400.00
Fosfato monocésdico monohidratado	125.00

OTROS COMPUESTOS	CONCENTRACION (mg/l)
1-GLUCOSA	4500.00
Rojo fenol	15.00

#### Preparacion del medio Eagle:

Se mide un volumen de agua bidestilada 5% menor al volumen de medio total deseado, para ello se utilizan 2 matraces. Se adicionan 13.4 g/l del medio de Eagle en polvo (Gibco Laboratorios, U.S.A.), se agita suavemente, y se agregan 3.7 g de bicarbonato de sodio, 100 u/ml de penicilina y 100 microgramos/ml de estreptomocina. Se complementa el volumen deseado con agua bidestilada, se ajusta el pH entre 0.2 y 0.3 menos del que se desea, que es de 7.2 (esto se hace con ácido clórhídico) y se esteriliza por filtración con bióxido de carbono, el cual se pasa a través de una membrana con poro de 0.22 micrometros.

## APENDICE II

Preparación de solución amortiguadora de fosfatos (SAF):  
Esta solución se usó para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante períodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato.

SALES	CONCENTRACION (g/l)
Cloruro de sodio	8.00
Cloruro de potasio	0.20
Fosfato monácido de sodio	2.16
Fosfato diácido de potasio	0.20

Se diluyen las sales en 900 ml de agua bidestilada; en seguida se ajusta a un pH de 7.2 a 7.4 y se afora a un volumen final de 1,000 ml. Se procede a esterilizar la solución a través de filtros de membrana (Millipore, U.S.A.) con un diámetro de poro de 22 micrometros. Finalmente la solución se almacenó a una temperatura de 4 grados centígrados hasta el momento de su uso.

## APENDICE III

### SOLUCION DE ELSEVER

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

Compuestos	Concentración (g/l)
Dextrosa	20.50
Citrato de sodio dihidratado	8.00
Acido cítrico monohidratado	0.55
Cloruro de sodio	4.20

En 900 ml de agua destilada se disolvieron sucesivamente cada una de las sustancias, posteriormente se aforo a un volumen de 1,000 ml, ajustando previamente el pH a 6.1. La solución se esterilizó en autoclave, almacenándose finalmente se almacenó a 4 C hasta su uso. Esta solución se utilizó para colocar los eritrocitos de carnero en una proporción de 1:1.

#### APENDICE IV

##### Preparacion del caseinato de sodio.

Se toman 10 gramos de caseinato de sodio y se disuelven en 50 ml de SAF. Una vez disuelta, se añaden otros 50 ml de SAF y se esteriliza durante 15 minutos en autoclave.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 - Grobsteins C. 1967. Mechanisms of organogenetic tissue interaction. *Cancer Ints. Monogr.* 26:279.
- 2 - Haw W.A. 1970. *Tratado de Histología. Interamericana, Mexico.* pp 279.
- 3 - Hilman R., Finch A.C., Boggs R.F, Winkelstein A., y Jørdet A.L. 1977. *Manual de Hematología. El Manual Moderno, Mexico.* pp 1-39.
- 4 - Leavell S.R. y Thorup Jr. A.O. 1978. *Hematología Clínica. Interamericana, México.* pp 1-20
- 5 - Backer A.J., McCulloch E.A. y Till J.E. 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197: 452.
- 6 - Curry J.L., Trentin J.J. y Cheng U. 1967. Hemopoietic spleen colony studies. III. Hemopoietic nature of spleen colonies induced by lymph-node or thymus cells, with or without phytohemagglutinin. *J. Immunol.* 99:907.
- 7 - Trentin J., Wolf M. y Cheng U. 1967. Antibody production by mice populated with limited numbers of clones of lymphoid cell precursors. *J. Immunol.* 98:1326.
- 8 - Waheed A. y Shaddock K.R. 1979. Purification and properties of L cell-derived colony stimulin factor. *J. Lab. Clin. Med.* 94:180.
- 9 - Luria E. 1979. Hematopoietic and lymphoid tissue in culture. *Bureau, New York.* pp 44-61.
- 10 - Po'nka P.O., Cin'atl J. y Ne'cos E. 1978. Contribution to the technique of mouse bone marrow cell culture in semisolid agar. *Folia Biol. (Praha)* 24:69.
- 11 - Sach L. 1970. In vitro control of growth and development of hematopoietic cell clones. In: *Regulation of hematopoiesis. Cap. 10.* Ed. Alberts Gordon Appleton-Century-Crofts. New York. pp 217-230.

- 12 - Rol S., Engh G.U.D. y Visser J. 1977. A technique for staining hemopoietic colonies in agar cultures. Munksgaard, Copenhagen, Denmark. 75:551.
- 13 - Salmon E.S. y Buick N.R. 1979. Preparation of permanent slides of intact soft-agar colony cultures of hematopoietic and tumor stem cells. Cancer Res. 39:1133.
- 14 - Pluznick D. y Sachs L. 1965. The cloning of normal mast cells in tissue cultures. J. Cell. Comp. Physiol. 66:319.
- 15 - Bradley T., y Metcalf D. 1966. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. J. Exp. Biol. Med. Sci. 44:287.
- 16 - Burges A. y Metcalf D. 1979. Purification and characterization of cell specific colony stimulating factor. In: Hematopoietic Cell Differentiation. Academic Press, New York, pp 35-48.
- 17 - Burges A. y Metcalf D. 1980. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. Blood. 56:947.
- 18 - Metcalf D. 1971. Acute antigen-induced elevation of serum colony stimulating factor (CSF) levels. Immun. 21:427.
- 19 - Metcalf D., Johnson G.R. y Burges A. 1980. Direct stimulation by purified GM-CSF of the proliferation of multipotential and erithroid precursor cell. Blood. 55:138.
- 20 - Steward C. y Lin H. 1978. Macrophage growth factor and its relationship to colony stimulating factor. J. Reticuloendothel. Soc. 4:269.
- 21 - Metcalf D. y Nicole N.A. 1983. Proliferative effects of purified granulocyte colony-stimulating-factor (G-CSF) on normal mouse hemopoietic cells. J. Cell. Physiol. 116:198.
- 22 - Till J.E. y McCulloch E.A. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat Res. 14:213.
- 23 - Lotem J. y Sachs L. 1984. Control of in vivo differentiation of myeloid leukemic cells. IV. Inhibition of leukemia development by myeloid differentiation-inducing protein. Int. J. Cancer. 33:147.

- 24 - Shikita M. 1983. Effect of various immunomodulators on the production of granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in mouse spleen cell cultures. *J. Pharmacobio.* 6:415.
- 25 - Metcalf D. y Foster R. 1967. Behavior on transfer of serum stimulated bone marrow colonies. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 126:158.
- 26 - Stanley E., Robinson W. y Ada G. 1968. Properties of colony stimulating factors in leukemic and normal mouse serum. *Exp. Biol. Med. Sci.* 46:757.
- 27 - Motoyoshi K., Takakuku F., Mizogouchi M. y Miura Y. 1978. Purification and some properties of colony stimulating factor from normal human urine. *Blood.* 51:1012.
- 28 - Cabrera P.G. 1984. Determinación de la masa molecular y pH isoeléctrico del factor inductor a la proliferación y diferenciación de macrófagos y granulocitos (MGI) contenido en medios condicionados por una línea leucémica de tipo macrófágico. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. Depto. Biología.
- 29 - Betz J.S. y Henson M.P. 1978. Macrophage stimulation by bacterial lipopolisaccharides. II. Evidence for differentiation signal delivered by lipid A and by protein rich fraction of lipopolisaccharides. *J. Exp. Med.* 148:557.
- 30 - Lotem J., Lipton J.H. y Sachs L. 1980. Separation of different molecular forms of macrophage and granulocyte-inducing protein from normal and leukemic myeloid cells. *Int. J. Cancer* 25:763.
- 31 - Stanley E. 1978. Induction of macrophage production and proliferation by a purified colony stimulating factor. *Nature.* 274:5667.
- 32 - Broxmeyer H.E., Gentile P., Bognacki J. y Ralph P. 1983. Lactoferrin, transferrin and acid isoferitin regulatory molecules with potential therapeutic value in leukemia. *Blood.* 9:83.
- 33 - Cline J.M. y Fitch H.J. 1978. Inhibitors of granulopoiesis. In: *Hematopoietic Cell Differentiation.*



Academic Press, pp 461.

- 34 - Ogawa M., Porter P.N. y Nakahata T. 1983. Renewal and commitment to differentiation of hemopoietic stem cells (an interpretative review). *Blood*. 61:828.
- 35 - Magli M.C., Iscove N.H. y Odartchenko N. 1982. Transient nature of early haemopoietic spleen colonies. *Nature*. 295:527.
- 36 - Guesenberry P. y Levitt L. 1979. Hematopoietic stem cell. *N. Engl. J. Med.* 301:755.
- 37 - McCulloch E.A. The cellular basis of the genetically determined hematopoietic defect in anemic mice of genotype SI/SI. *Blood*. 26:399.
- 38 - Bernstein S.E. 1970. Tissue transplantation as an analytic and therapeutic tool in hereditary anemias. *Am. J. Surg.* 119:448.
- 39 - Eastment E. y Ruscetti F.W. 1981. Generation of erythropoiesis in long-term bone marrow suspension cultures. *J. Supramolec. Struct. Cell. Biochem.* 17:111.
- 40 - Becker A.J., McCulloch E.A. y Till J.E. 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 197:452.
- 41 - Prchal J.T., Throckmoe D.W., Carroll A.J., Fuson E.W., Gans R.A. y Prchal J.F. 1978. A common progenitor for human myeloid and lymphoid cells. *Nature*. 274:590.
- 42 - Fialkow P.J., Denman A.M., Jacobson R.J. y Lowenthal M.N. 1978. Chronic myelocytic leukemia: Origin of some lymphocytes from leukemia stem cells. *J. Clin. Invest.* 62:815.
- 43 - Martin P.J., Najfeld U., Hansen J.A., Penfold G.K. Jacobson R.J. y Fialkow P.J. 1980. Involvement of the B-lymphoid system in chronic myelogenous leukemia. *Nature*. 287:49.
- 44 - Chikkappa G. y Phillips P.G. 1984. Regulation of normal human blood neutrophilic, macrophagic, and eosinophilic committed stem cell proliferation by autologous blood T lymphocytes subsets. *Blood*. 63:356.

- 45 - McKenzie S.F. 1985. Textbook of Hematology. Lea & Febiger, USA, pp 11-81.
- 46 - Winthrope M.M. 1981. Clinical Hematology. 8th. Philadelphia, Lea & Febiger, USA, 1895pp.
- 47 - Biggs L.W., Sturm P. y Bell A. 1970. The morphology of human blood cells. 4th Ed. North Chicago, Abbott Laboratories, pp 567.
- 48 - Babior B.M. y Stessel T.P. 1984. Hematology a pathophysiological approach. Churchill Livingstone, New York, pp 378.
- 49 - Barrett J.T. 1978. Textbook of Immunology. 3rd Ed. St. Louis, C.V. Mosby, pp 481.
- 50 - Bennet B. 1966. Isolation and cultivation in vitro of macrophages from various sources in the mouse. Am. J. Path. 48:75.
- 51 - Padawer J. 1973. The peritoneal cavity as a site for studying cell-cell and cell-virus interactions. J. Reticuloendothel. Soc. 14:462.
- 52 - Davis R.H. y McGowan L. 1968. Comparative peritoneal cellular content as related to species and sex. Anat. Rec. 162:357.
- 53 - Daems W.Th. 1980. Peritoneal macrophages. In: The Reticulo Endothelial System. Vol.1 (Carr I., Daems W.Th. eds.) Plenum press. USA.
- 54 - Monroy A. 1983. Activación de precursores mieloides para la producción de macrófagos y granulocitos peritoneales y la formación de receptores Fc. Tesis profesional. ENEP-Zaragoza UNAM.
- 55 - Lin H. 1981. Peritoneal exudate cells, II Kinetics of appearance of colony-forming cells. J. Cell. Physiol. 84:159.
- 56 - Fudenberg H. 1979. Manual de Inmunología Clínica. El Manual Moderno. México. pp 1112.
- 57 - Pink R., Wang A.C., y Fudenberg H.H. 1971. Antibody variability. Ann. Rev. Med. 22:145.
- 58 - Porter R.R. 1959. The hydrolysis of rabbit gamma globulin

- and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.* 73:119.
- 59 - Wintrobe M.M. 1974. Lymphocyte function. In: *Clinical Hematology*. 7th. edition. Lea & Febiger, USA. pp 1896.
- 60 - Putnam F.W., Titani K., Wikler M. y Shinoda T. 1967. Structure and evolution of kappa and lambda light chains. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 32:9.
- 61 - Edelman G.M., Cunnigh B.A., Gall W.E., Gottlieb P.D., Rutishav U. y Waxdal M.J. 1969. The covalent structure of an entire gamma G immunoglobulin molec. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 63:78.
- 62 - Lane B.C., Kanmitch J., Mitchell M.S. y Cooper S.M. 1980. Structural evidence for distinct IgG subclass. Specific Fc receptors on mouse peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* 152:114.
- 63 - McKeever P.E. y Spicer S.S. 1980. Surface receptors of mononuclear phagocytes. In: *The Reticulo-endothelial system*. Vol.1. Ed. Carr I. y Daems W.T. Plenum Press.
- 64 - 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.
- 65 - Diamond B., Yaryurat J.A. y Merlis S. 1974. Site of binding of mouse IgG2b to the Fc receptor on mouse macrophage. *J. Exp. Med.* 150:721.
- 66 - Knyszynski A. y Danon D. 1977. Association and dissociation of aggregated IgG from rat peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* 145:1368.
- 67 - Jancik J.M. y Schaver R. 1978. Sequestration of neuraminidase-treated erythrocytes. Studies on its topographic, morphologic and immunologic aspects. *Cell. Tissue Res.* 186: 209.
- 68 - Schwartz R.H., Dickler H.B., Sachs D.H. y Schwartz B.D. 1976. Studies of Ia antigens on murine peritoneal macrophage. *Scand. J. Immunol.* 5:731.

- 69 - Wagner D. y Noltenius H.W. 1983. Clinical evaluation of the EA-rosette test in the early detection of cervical cancer. *Acta Cytologica*. 27:4.
- 70 - Elner V.M., Hass A.J., Davis H.R. y Glasgow S. 1983. An avidin-biotin-peroxidase method for Fc receptors of macrophage isolated from and in sections of rat lung. *J. Histochemistry*. 31:9.
- 71 - Fornosek L., Kopecek J. y Uetvicka A. 1983. An advantageous method for detection of Fc-receptors an for studying Fc-receptors-mediated phagocytosis. *Immunology Letters*. 7:29.
- 72 - Calcagno M., Perez J.R., Waldo M.G., Cabrera G. y Weiss-Steider B. 1982. Evidence of the existence of a factor that induces Fc receptors on bone marrow cells. *Blood*. 59:4.
- 73 - Fragoso A., Arciga M.A., Calcagno M. y Weiss-Steider B. 1985. Determination of the inducers of Fc (FcRI) and C3 (C3RI) receptors on myeloid cells in several media from human and mouse origen, and the identification of the macrophage as the cell that produces these factors. *Exp. Hematol*. 13:163.
- 74 - Anderson C.L., Guyre P.M., Whitin J.C., Ryan D.H., Looney R.J. y Fanger M.W. 1987. Monoclonal-antibodies to Fc receptors for IgG on human mononuclear phagocytes - antibody characterization and induction of superoxide production in a monocyte cell-line. *J.Biol. Chem*. 261:12856.
- 75 - Dougherty G.J., Selvendr Y., Murdoch S., Palmer D.G. y Hagg N. 1987. The human mononuclear phagocyte high-affinity Fc receptor, FcRI, defined by a monoclonal-antibody, 10.1. *Eur. J. Immunol*. 17:1453.
- 76 - Kurlander R.J. y Batker J. 1982. The binding of human immunoglobulin-G1 monomer and small, covalently cross-linked polymers of immunoglobulin-G1 to human peripheral-blood monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Inv.* 69:1.

- 77 - Jones D.H., Looney R.J. y Anderson C.L. 1985. 2 distinct classes of IgG Fc-receptors on a human monocyte line (U937) defined by differences in binding of murine IgG subclasses at low ionic-strength. *J. Immunol.* 135:3348.
- 78 - Looney R.J., Abraham G.N. y Anderson C.L. 1986. Human-monocytes and U937 cells bear 2 distinct Fc-receptors for IgG. *J. Immunol.* 136:1641.
- 79 - Vaughn M., Taylor M. y Mohanaku T. 1985. Characterization of human IgG Fc-receptors. *J. Immunol.* 135:4059.
- 80 - Stengelin S. 1988. Isolation of cDNAs for 2 distinct human Fc-receptors by ligand affinity cloning. *J. EMBO.* 7:1053.
- 81 - Hibbs M.L., Bonadonn L., Scott P.M., McKenzie I.F. y Hogarth P.M. 1988. Molecular-cloning of a human immunoglobulin-G Fc-receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 85:2240.
- 82 - Stuart S.G., Trounstein M.L., Vaux D.J.T., Koch T., Martens C.L., Mellman I. y Moore K.W. 1987. Isolation and expression of cDNA clones encoding a human receptor for IgG (Fc-gamma-RII). *J. Exp. Med.* 166:1668.
- 83 - Anderson, C.L. y Looney, R.J. 1986. Human-leukocyte IgG Fc receptors. *Immunol. Today* 7:264.
- 84 - Hogg N. 1988. The structure and function of Fc-receptors. *Immunol. Today* 9:185.
- 85 - Unkeless J.C. 1988. Structure and function of human and murine receptors for IgG. (Review). *Annu. Rev. Immunol.* 6:251.
- 86 - Selvaraj P., Rosse W.F., Silber R. y Springer T.A. 1988. The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in peroxysmal-nocturnal hemoglobinuria. *Nature.* 333:565.
- 87 - Simmons D. y Seed B. 1988. The Fc gamma receptor of natural-killer cells is a phospholipid-linked membrane-protein. *Nature.* 333:568.
- 88 - Perussia B., Acuto O., Terhorst C., Faust J., Lazerius R., Fanning V. y Trinchie G. 1983. Human natural killer cells analysed by b73.1 a monoclonal-antibody blocking Fc-receptor function. 2. Studies of b73.1 antibody-antigen

- interaction on the lymphocyte membrane. J. Immunol. 130:2142.
- 89 - Rossman M.D., Chien P., Cassinini A., Elias J.A., Holian A. y Schreibe A.D. 1986. The binding of monomeric IgG to human-blood monocytes and alveolar macrophages. Am. Rev. Respir. Dis. 133: 292.
- 90 - Fries L.F., Brickman C.M. y Frank M.M. 1983. Monocyte receptors for the Fc portion of IgG increase in number in autoimmune hemolytic-anemia and other hemolytic states and are decreased by glucocorticoids therapy. J. Immunol. 131:1240.
- 91 - Perussia B., Dayton S.T., Lazarus R., Fanning V. y Trinchieri G. 1983. Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG<sub>1</sub> on human monocytic and myeloid cells. J. Exp. Med. 158:1092
- 92 - Petroni K.C., et.al. 1980. Modulation of human polymorphonuclear leukocyte IgG Fc-receptors and Fc-receptors-mediated functions by INF-gamma and glucocorticoids. J. Immunol.140:3467.
- 93 - Liesveld J.J., Aboud C.N., Looney R.J., Ryan D.H. y Brennan J.K. 1988. Expression of IgG-Fc receptors in myeloid leukemic cell lines-effect of colony stimulating factors and cytokines. J. Immunol. 140:1527.
- 94 - Fleit H.B., Wright S.D. y McKelless J.C. 1982. Human neutrophil Fc-gamma-receptor distribution and structure. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 79:3275.
- 95 - Clarkson S.B. y Dry P.A. 1989. CD-14 developmentally regulated IgG Fc-receptors on cultured human-monocytes. Exp. Med. 167:408.
- 96 - Lehninger A.L. 1979. BIOQUIMICA. Oeogr. Colod. Barcelona. pp 1117.
- 97 - Smith E.L. 1977. PRINCIPIOS DE BIOQUIMICA. 4ta.ed. México. pp 1185.
- 98 - Larrick J.W. 1989. Native interleukin 1 inhibitors. Immunol. Today 10(2):33.

- 99 - Dinarello C.A. 1987. Current concepts: lymphokines. The New Engl J. Med 317(15):940.
- 100 - Atkins E. 1960. Pathogenesis of fever. Physiol. Rev. 40:580.
- 101 - Beck G., Habicht G.S., Senach J.L. y Miller F. 1986. Interleukin-1: a common endogenous mediator of inflammation and the local Schwartzman reaction. J Immunol. 136:3025.
- 102 - Hunninghake G.W., Glazier A.J., Monick M.M. y Dinarello C.A. 1987. Interleukin-1 is a chemotactic factor for human T-lymphocytes. Am. Rev. Respir. Dis. 135:66.
- 103 - Czuprynski C.J. y Brown J.F. 1987. Purified human and recombinant murine interleukin-1 *alfa* induced accumulation of inflammatory peritoneal neutrophils and mononuclear phagocytes: possible contributions to antibacterial resistance. Microb. Pathogen. 3:377.
- 104 - Fragoso A., Arciga M.A., Calcagno M. y Weiss-Steider B. 1985. Determination of the inducers of Fc (FcRI) and C3 (C3RI) receptors on myeloid cells in several media from human and mouse origin, and the identification of the macrophage as the cell that produces these factors. Exp. Hematol. 13:163.
- 105 - Sullivan R., Lipkin E.W., Bell R., Larsen N.E. y McCarroll L.H. 1985. The kinetics of the production of granulocyte-monocyte colony stimulin activity (GM-CSA) by isolated human monocytes: response to bacterial endotoxin. Prog. Clin. Biol. Res. 184:173.
- 106 - Heyworth C.M., Ponting I.L.O. y Dexter T.M. 1988. The response of haemopoietic cells to growth factors: developmental implications of synergistic interactions. J. Cell Science 91:329.
- 107 - Broxmeyer H.E., Williams D.E., Cooper S., Hengoc G. y Ralph P. 1988. Recombinant human granulocyte-colony stimulating factors and recombinant human macrophage-colony stimulating factor synergize in vivo to enhance proliferation of granulocyte-macrophage, erythroid, and

- multipotential progenitor cells in mice. *J. Cellular Biochemistry* 38:127.
- 108 - Ramsey R. y Hays E.F. 1979. Factors promoting colony stimulating activity (CSA) production in macrophages and epithelial cells. *Exp. Hematol.* 7(5):245.
- 109 - Quesenberry P.J. 1983. Synergistic hematopoietic growth factors. *Int. J. Cell. Cloning* 4:3.
- 110 - Cline H.J. y Golde D.W. 1979. Controlling the production of blood cells. *Blood* 53:157.
- 111 - Ernst T.J., Ritchie A.R., Demetri G.D. y Griffin J.D. 1989. Regulation of granulocyte-and-monocyte-colony stimulating factor mRNA levels in human blood monocytes is mediated primarily at a post-transcriptional level. *J. Biological Chemistry* 264(10):5790.
- 112 - Dexter T.M. 1982. Stromal cell associated haemopoiesis. *J. Cell. Physiol. Suppl.* 1:87.
- 113 - Spooner E., Heyworth C.M., Dunn A. y Dexter T.M. 1986. Self-renewal and differentiation of interleukin-3 dependent multipotent stem cells are modulated by stromal cells and serum factors. *Int. J. Cell. Cloning* 4:3.
- 114 - Zanbrano I.R., Cáceres J.R., Mendoza J.F., Santiago E., Mora L.M., Morales M.G., Corona M.T. y Weiss-Steider B. 1989. Evidences that fibroblast and epithelial cells produce a specific type of macrophage and granulocyte inducer, also known as colony-stimulating factor, and that monocyte-macrophages can produce another factor with proliferative inducing activity on myeloid cells and differentiative activity on macrophages. In: *Molecular and cellular controls of haematopoiesis* Vol. 554 (Donald Orlic) p 141-155. ANN. N.Y. ACAD. SCI.
- 115 - Naughton B.A. y Naughton G.K. 1989. Hematopoiesis on nylon mesh templates: comparative long-term bone marrow culture and the influence of stromal support cells. In: *Molecular and cellular controls of haematopoiesis*. Vol. 554. (Donald Orlic) p 125-140. ANN. N.Y. ACAD. SCI.



- 116 - Duesenberry P.J., McNiece I.K., McGrath H.E., Tameles D.S., Baber G.B. y Deacon D.H. 1989. Stromal regulation of hematopoiesis. In: Molecular and cellular controls of haematopoiesis. Vol. 554. (Donald Orlic) p 116-124. ANN. N.Y. ACAD. SCI.
- 117 - Rich I.N. 1988. The macrophage as a production site for hematopoietic regulator molecules: sensing and responding to normal and pathophysiological signals. *Anticancer Res* 8:1015.
- 118 - Zanbrano I.R., Cáceres J.R., Méndez J.F., Santiago E., Mora L.M., Marin T.N.J. y Weiss-Steider B 1989. Evidence that the macrophage-granulocyte inducer (MGI) is produced during cell proliferation, stored in G0, released in G1, cell specific, and induces the secretion of other colony-stimulating activities (CSA). *Exp. Hematol.* 17:267.
- 119 - Dexter T.M. 1987. Growth factors involved in haemopoiesis. *J. Cell. Science* 88:1.
- 120 - Sachs L. 1982. Normal development programmes in myeloid leukaemia: regulatory proteins in the control of growth and differentiation. *Cancer Surv* 1(2):321.
- 121 - Lotem J. y Sachs L. 1983. Coupling of growth and differentiation in normal myeloid precursors and the breakdown of this coupling in leukemia. *Int. J. Cancer* 32:127.