

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

" ZARAGOZA "

EL FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE MACROFAGOS Y GRANULOCITOS RECOMBINANTE DE RATON (rmGM-CSF) PROMUEVE EN FORMA DIRECTA LA PROLIFERACION DE PRECURSORES DE MACROFAGOS PERO NO DE GRANULOCITOS EN CULTIVOS DE MEDULA OSEA *in vitro*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

JUAN JOSE MONTESINOS MONTESINOS

MEXICO. D.F.

MARZO, 1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	PAGINAS
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MARCO TEORICO	5
LA MEDULA OSEA COMO ORGANO HEMATOPOYETICO	5
PRODUCCION DE CELULAS SANGUINEAS	7
CELULAS FAGOCITICAS: CARACTERISTICAS DE MACROFAGOS Y GRANULOCITOS	12
FACTORES HEMATOPOYETICOS Y BIOLOGIA DEL GM-CSF	18
OBJETIVOS	26
MATERIAL Y METODO	27
RESULTADOS	31
DISCUSION	42
APENDICES	46
BIBLIOGRAFIA	50
AGRADECIMIENTOS	58

RESUMEN

Los macrófagos y granulocitos son células sanguíneas que participan en la respuesta inmune del organismo contra agentes patógenos. Su crecimiento y desarrollo a partir de células precursoras está regulado por factores humorales, conocidos como factores estimuladores de colonias (CSFs).

En la actualidad se ha postulado la existencia de un precursor bipotencial común para macrófagos y granulocitos, concepto originado de la simple observación de colonias formadas con ambos tipos celulares en cultivos semisólidos. Más recientemente se identificó al factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), el cual ha demostrado tener actividad proliferativa y diferenciadora sobre esta célula bipotencial. Debido a que ha resultado difícil aislar al precursor bipotencial, el mecanismo mediante el cual el GM-CSF actúa sobre esta célula, es poco conocido.

En este trabajo se evaluó el efecto del GM-CSF en la proliferación de células precursoras de médula ósea, así como el tipo de célula blanco sobre la cual actúa este factor. Los resultados demostraron que únicamente los precursores de macrófagos responden tempranamente al efecto proliferador del GM-CSF y que los granulocitos proliferan tardíamente. Por consiguiente, se aportan evidencias de que el GM-CSF tiene como blanco exclusivamente a las células precursoras de macrófagos.

Asimismo, se discute la identificación del GM-CSF como un M-CSF específico que estimula al precursor de macrófagos a proliferar y producir un factor semejante al G-CSF, el cual sería el responsable de la proliferación de precursores granulocíticos, con lo que se pone en duda la existencia de un precursor bipotencial para macrófagos y granulocitos.

Finalmente, se propone un mecanismo alternativo del proceso de regulación en la generación de macrófagos y granulocitos y de colonias formadas con ambos tipos celulares.

INTRODUCCION

La sangre es un tejido constituido por plasma y distintos tipos celulares agrupados en dos clases: células linfoides (linfocitos B y T) y células mieloides (eritrocitos, megacariocitos, granulocitos y macrófagos) (3,10).

La formación de células sanguíneas se realiza a través de un proceso conocido como hematopoyesis, el cual se lleva a cabo principalmente en la médula ósea (4,11). La médula ósea está compuesta por células estromales y células precursoras hematopoyéticas, siendo la hematopoyesis efectiva el resultado de la interacción directa entre ambos tipos celulares (19,22).

Todas las células sanguíneas maduras se derivan de una población de células madre pluripotentes localizadas en la médula ósea. Estas células pueden proliferar para producir más células tallo, o pueden comprometerse y proliferar hacia un linaje determinado (18,19). De esta forma, se mantiene la producción continua de células sanguíneas requerida por el organismo, dado que la vida media de la mayoría de las células en la sangre y en los tejidos es muy corta.

Se han desarrollado técnicas para la proliferación *in vitro* de células precursoras de médula ósea (32,33). Mediante el cultivo de células mieloides en medios adaptados, se ha registrado la presencia de células madre precursoras comprometidas o especializadas, capaces de originar *in vitro* colonias de macrófagos y granulocitos (34,35,36).

En la actualidad se sabe que existen sustancias humorales e influencias microambientales celulares locales que regulan la proliferación de células precursoras hematopoyéticas localizadas en la médula ósea. Entre estas sustancias humorales encontramos un grupo de factores de crecimiento conocidos como CSFs (del inglés, Colony Stimulating Factor) (37,38). Los factores estimuladores de colonias son una familia de glicoproteínas, que actúan a concentraciones de nanogramos y pueden servir

como cofactores para estimular a células en diferentes estadios de diferenciación celular hematopoyética de granulocitos y macrófagos (40,45,46).

Los cuatro CSFs conocidos para el linaje mielóide de ratón y humano son: a) Interleucina-3 o multifactor estimulador de colonias (IL-3 o multi-CSF); b) el factor estimulador de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), el cual tienen una influencia en la proliferación y diferenciación de células en estadios menos comprometidos; c) el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) donde la célula blanco es el granulocito; y por último d) el factor estimulador de macrófagos (M-CSF) que estimula la formación de colonias de macrófagos (69,70,71,72,73,74). En la actualidad, los genes que codifican para estos factores han sido clonados y expresados tanto en sistemas bacterianos, levaduras como en células eucarióticas (75,76).

El GM-CSF fue uno de los primeros factores de crecimiento hematopoyéticos en ser descrito, purificado y molecularmente clonado (77,78). Su nombre deriva de la habilidad que posee para inducir la proliferación y diferenciación de células progenitoras bipotenciales para formar colonias de granulocitos, macrófagos o mezcla de los dos tipos celulares (mixta) (83,84). Sin embargo, a pesar de los intentos por caracterizar a las células precursoras bipotenciales mediante la utilización de técnicas inmunológicas y de citometría de flujo, aun no se consigue este propósito. Así, una evidencia indirecta de la existencia de precursores bipotenciales ha sido la formación de colonias mixtas en cultivos de médula ósea en presencia de GM-CSF (99,100).

En trabajos realizados en el laboratorio de diferenciación celular, no se ha observado en los cultivos de médula ósea, con presencia de GM-CSF como inductor, la formación de colonias mixtas pero si de colonias de macrófagos y granulocitos por separado.

Hoy en día, no ha sido posible aislar una célula capaz de diferenciarse a macrófagos y granulocitos. Por lo tanto, el mecanismo mediante el cual el GM-CSF actúa sobre su célula blanco para generar ambos tipos celulares es poco conocido.

Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo se evaluó el efecto del GM-CSF en la proliferación de precursores de células mieloides. Específicamente, se estudio la cinética de aparición de grupos y colonias a través del tiempo en presencia de GM-CSF, así como también, el tipo de célula blanco sobre la cual actúa este factor.

MARCO TEORICO

LA MEDULA OSEA COMO ORGANO HEMATOPOYETICO.

La formación de células sanguíneas se lleva a cabo en los primeros días de vida intrauterina, a través de un proceso conocido como hematopoyesis. Este proceso se inicia en el tejido mesoblástico extraembrionario, particularmente en el saco vitelino, y se mueve posteriormente a sitios intraembrionarios; el hígado y luego el bazo, para establecerse finalmente en la médula ósea, siendo así, un fenómeno migratorio durante la vida embrionaria y fetal (1).

Aunque el bazo continua siendo órgano hematopoyético durante la fase posnatal, existe una declinación en dicha actividad, misma que se incrementa en la médula ósea y permanece constante durante la mayor parte de la vida, constituyendo así, el principal sitio hematopoyético (2).

En el interior de un hueso completamente formado, la médula existe como un tejido conectivo flojo altamente vascularizado y enriquecido celularmente. Estructuralmente, consiste de tres componentes principales: las células hematopoyéticas, que comprenden la mayoría de los elementos celulares; un componente estromal o cordón hematopoyético, altamente organizado que soporta la proliferación de las células hematopoyéticas y un sistema vascular responsable de la salida de los elementos sanguíneos de la zona medular (2,3).

Las células hematopoyéticas son transitorias en la médula, ya que al madurar se mueven hacia el torrente sanguíneo. El estroma, sin embargo, permanece y funciona como base sobre la cual los progenitores sanguíneos pueden diferenciarse y madurar. La hematopoyesis efectiva es el producto de una interrelación entre estos dos componentes (4).

Se considera que los componentes de la médula no presentan una distribución espacial, sin embargo, con el desarrollo de nuevos métodos de análisis anatómico medular se ha

morfológicamente, está en asociación con una célula reticular distinta formando una entidad reconocible (6,11).

Podemos decir que la hematopoyesis es un fenómeno que consta de dos etapas: a) la autorenovación de las células hematopoyéticas más primitivas (células tallo), con lo cual se mantiene la formación continua de elementos celulares sanguíneos (12); b) la proliferación y diferenciación de las células tallo hacia diferentes linajes, y su maduración completa para ser liberadas a la circulación en respuesta a las demandas del cuerpo (13). Así, la médula ósea es un órgano que posee el microambiente favorable para sostener y controlar la proliferación de las células sanguíneas a lo largo de toda la vida.

PRODUCCION DE CELULAS SANGUINEAS

La sangre es un tejido coloidal constituido por plasma y distintos tipos celulares (eritrocitos, linfocitos, monocitos, granulocitos y plaquetas) que se encuentran suspendidos en el plasma sanguíneo. La sangre circula por el sistema vascular realizando funciones como el transporte de oxígeno y sustancias nutritivas a todos los tejidos del cuerpo, así como de los productos de excreción y de desecho; además participa en la integración del sistema endócrino (2,10).

Los eritrocitos son los encargados de transportar la hemoglobina por todo el cuerpo llevando así el oxígeno a todo el organismo. Las plaquetas son corpúsculos derivados de células gigantes denominados megacariocitos, los cuales tienen la principal función de coagular la sangre; mientras que los leucocitos se encargan de la defensa de nuestro organismo (14,15).

Los leucocitos agrupan cinco tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos. Los tres primeros se conocen genéricamente como granulocitos, poseen numerosos lisosomas y vesículas secretoras o gránulos, recibiendo su nombre de acuerdo a sus propiedades de función. Los neutrófilos forman

establecido un patrón estructural específico (5). En un hueso tubular, existe una arteria nutriente que penetra en la cavidad de la médula a lo largo del eje central de ésta. Dicha arteria se ramifica hacia el hueso, en donde forma estructuras vasculares especializadas conocidas como sinusoides. Los sinusoides son los primeros elementos vasculares en ser eferentes y varios de ellos pueden combinarse para formar sinusoides colectivos, que se dirigen hacia el sinusoide o vena central (paralela a la arteria principal). Así, el flujo sanguíneo parte del centro de la cavidad hacia el hueso periférico y regresa nuevamente al centro (5,6).

Este patrón de flujo tiende a presentar un alto número de sinusoides en la periferia y debido a que el intercambio celular médula-torrente sanguíneo ocurre a través de las paredes de estos pequeños vasos sanguíneos, la intensidad de la hematopoyésis es máxima en la periferia, dejando la parte central del hueso con poca actividad hematopoyética (7). Debido a ello, la distribución espacial de las células hematopoyéticas muestra un gradiente de concentración definido con relación al hueso, que va desde la periferia, donde sus concentraciones son altas, hacia el centro, donde tales células disminuyen en número (6,7).

En los mamíferos todas las células hematopoyéticas proliferan extravascularmente en el compartimento o cordón hematopoyético que está formado de células reticulares y macrófagos, así como de otros componentes estromales entre los que se encuentran fibroblastos, células endoteliales y adipocitos (8,9). Tras su maduración, las células progenitoras sanguíneas atraviesan la pared de los sinusoides vasculares especializados, para así entrar al flujo sanguíneo. Las paredes de estos vasos controlan el tráfico de células y moléculas entre el compartimento hematopoyético y el vascular (10,11). Siempre en el cordón hematopoyético la formación de células sanguíneas está compartimentalizada. Así, la eritropoyesis se lleva a cabo en distintas unidades anatómicas, rodeando un macrófago central conocido como isla eritroblástica, mientras que la granulopoyesis se realiza en un foco que, aunque menos apreciable

el grupo más numeroso, engloban, lisan y digieren bacterias, siendo estas células de vida corta ya que por lo general mueren durante el ataque al agente infeccioso (16).

Por su parte, los linfocitos junto con los macrófagos constituyen básicamente el sistema inmune. Existen dos tipos de linfocitos con funciones diferentes: los linfocitos B, que producen anticuerpos como respuesta ante un antígeno dando lugar a la inmunidad humoral; y los linfocitos T, que son los responsables de la respuesta inmune celular, actuando mediante una interacción membrana-membrana al detectar al antígeno. Los monocitos son los fagocitos mononucleares circulantes que al abandonar la corriente sanguínea se transforman en macrófagos, los cuales eliminan por fagocitosis a los microorganismos invasores, cuerpos extraños y residuos celulares (16,17).

Todas las células sanguíneas que circulan en la sangre periférica son producidas en la médula ósea, en donde la mayoría de las células presentan estadios de maduración diferentes (Figura 1). No obstante, debido a que la mayoría de células sanguíneas maduras tienen una vida limitada, es necesario su continuo reemplazamiento, lo cual es una función desempeñada por elementos primitivos denominados células tallo (18,19). Las células tallo se caracterizan por su capacidad para diferenciarse a distintas líneas celulares con funciones especializadas, y su habilidad para regenerarse por sí mismas lo que permite mantener una dotación constante de células tallo (20).

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 ciertos factores puede dar origen a cada una de las principales líneas celulares sanguíneas y es capaz de renovarse por sí misma. En contraste, la teoría polifilética propone que existe una célula tallo única para cada una de los tipos celulares sanguíneos (21).

Mediante el estudio de ratones irradiados letalmente, se aportaron las primeras evidencias de la existencia de una célula precursora pluripotente. Al recibir un animal

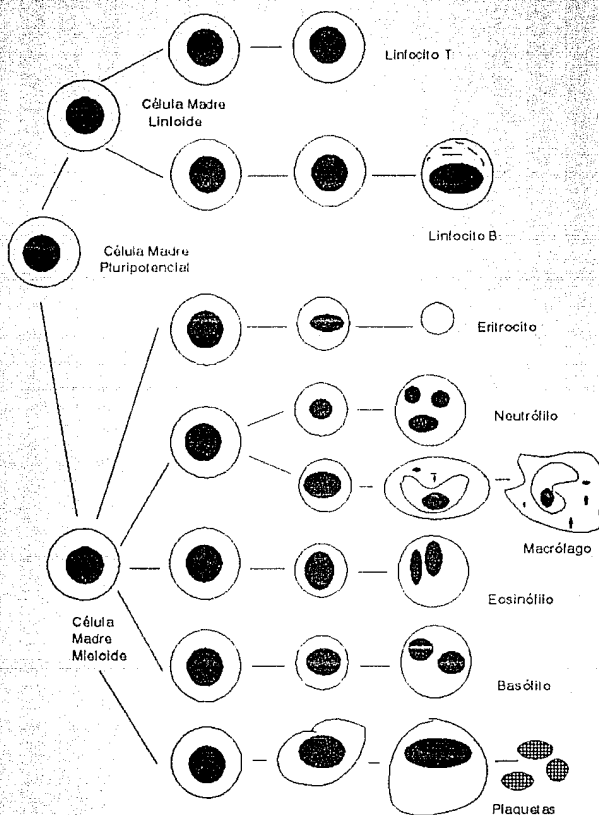


Figura 1. Maduración de las células sanguíneas. La célula madre pluripotencial da lugar a la serie linfóide (linfocitos) y mieloide (leucocitos) bajo la influencia de los factores hematopoyéticos. Este proceso se desarrolla en su mayor parte en la médula ósea. Tomado de referencia 49.

fuertes dosis radiactivas éste moría al no poder producir nuevas células sanguíneas. Sin embargo, la muerte de este animal podía evitarse mediante el suministro de una suspensión de células provenientes de médula ósea de animales sanos; los animales así tratados sobrevivían mostrando en su bazo nódulos que representaban pequeñas colonias de células precursoras de todo tipo de células sanguíneas, las cuales fueron llamadas Unidades Formadoras de Colonias del Bazo (CFU-S del inglés, Colony Forming-Unit- Spleen) (22,23).

Experimentos adicionales proporcionaron evidencias directas sobre la existencia de células tallo pluripotenciales, en donde células de médula ósea normal se irradiaron severamente, lo suficiente para causar aberraciones cromosomales, y fueron inyectadas dentro de ratones letalmente irradiados. Estas células irradiadas dieron lugar a diferentes tipos celulares con el mismo cariotipo en células hematopoyéticas de nódulos del bazo, además la suspensión celular de estos nódulos podía ser inyectada dentro de otros ratones irradiados, para formar nuevos nódulos del bazo con anormalidad cromosomal similar. Estos estudios indican que existen células en la médula que no sólo son capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares hematopoyéticos, sino de autorrenovar el tipo celular inicial (24).

Otros estudios indican que aunque la CFU-S puede generar monocitos, neutrófilos, megacariocitos y eritrocitos, no da origen a linfocitos (25). Investigaciones con marcadores cromosomales sugieren que los linfocitos y CFU-S probablemente tienen en común una célula tallo más primitiva con la capacidad de formar tanto CFU-S como progenitores linfoides (26).

Por consiguiente, 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: a) células multipotenciales primitivas, capaces de renovarse por sí mismas y diferenciarse a todas las líneas celulares sanguíneas; b) células progenitoras

comprometidas, destinadas a desarrollar a diferentes líneas celulares; y c) células maduras, con funciones especializadas que disminuyen o pierden su capacidad de proliferar (27,28,29).

A partir de la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos desarrolladas durante el siglo pasado (30,31), varios investigadores han ideado métodos para averiguar cuales son las moléculas implicadas en la proliferación y diferenciación celular (24). A mediados de este siglo se introdujo la técnica de cultivo en agar; esta matriz semisólida permite la separación de células, y facilita el estudio del proceso de diferenciación celular a partir de los precursores indiferenciados (32). Al llevarse a cabo la división celular y ante el impedimento de la migración, se produce la formación de grupos celulares denominados colonias (33,34).

Destacan los trabajos de Pluznick y Sachs realizados en 1965 (35) y de Bradley y Metcalf en 1966 (36), en los que lograron el cultivo de precursores hematopoyéticos, de los cuales se obtuvieron 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 (37).

Hoy en día, se han caracterizado varios factores que regulan la formación de células sanguíneas, entre los cuales se encuentra la eritropoyetina la cual induce la proliferación y diferenciación de los eritrocitos; la trombopoyetina estimula la proliferación de megacariocitos y el inductor de colonias de macrófagos y granulocitos (MGI, del inglés "Macrophage and Granulocyte Inducer"), también conocido como CSF (del inglés "Colony Stimulating Factor") que estimula la formación de granulocitos y macrófagos (38).

Así como se ha encontrado que existen factores estimuladores de crecimiento hematopoyético, también se ha reportado la existencia de ciertos factores secretados

por algunas células hematopoyéticas maduras que inhiben la generación de más células maduras (39). Tal es el caso de los granulocitos que son capaces de inhibir la proliferación de los CFU de la sangre periférica. Los productos de estas células como la lactoferrina y algunos derivados semejantes a las chalonas, afectan la producción y liberación de CSF (39,40) .

Es conocido que los CSF e inhibidores de la hematopoyesis regulan la proliferación y diferenciación de células precursoras hematopoyéticas, sin embargo la sólo presencia de estos agentes no es suficiente. Algunos estudios han demostrado que el suero y otros fluidos biológicos complejos, promueven la proliferación de células cultivadas *in vitro*, mediante el aporte de hormonas de crecimiento, factores de adhesión, proteínas y lípidos que influyen de manera directa sobre la proliferación celular (41,42,43).

CELULAS FAGOCITICAS: CARACTERISTICAS DE MACROFAGOS Y GRANULOCITOS.

La fagocitosis es un proceso celular que se da durante la respuesta inflamatoria, en donde algunos leucocitos engloban a microorganismos patógenos (44). Hay dos células fagocíticas en el organismo: los leucocitos polimorfonucleares (granulocitos), que son células circulantes que emigran a los sitios de inflamación y los fagocitos mononucleares (monocitos y macrófagos), que circulan en la sangre o se encuentran fijos en los tejidos y también se acumulan en los sitios de inflamación. Ambos tipos de células son capaces de reconocer e ingerir partículas, ligando solubles mediante sus receptores en la superficie celular y de digerir tales sustancias dentro de sus lisosomas secundarios (44,45).

En la actualidad se postula que los macrófagos y granulocitos se originan en la médula ósea, a partir de una célula tallo bipotencial o unidad formadora de colonias de macrófagos y granulocitos (CFU-GM, del inglés Colony Forming-Unit-Granulocyte-Macrophage), que es capaz de diferenciarse ya sea a monocito o a granulocito (46,47).

Dentro de los fagocitos mononucleares, se tienen como precursores medulares reconocibles al monoblasto y al promonocito (48). El monoblasto tiene abundante citoplasma agranular y núcleo ovoide o redondo, pudiendo estar plegado o indentado con varios nucleolos. El monoblasto al igual que el promonocito, no tienen actividad de esterasa específica (49). El promonocito, con abundante citoplasma y granulos finos presentes (lisosomas), posee un núcleo irregular y profundamente indentado (Figura 2) (48,49).

Por su parte, los monocitos revelan gránulos que contienen peroxidasa, fosfatasa ácida y arilsufatasa, lo que sugiere que estos gránulos son similares a los lisosomas de neutrófilos, pero sin fosfatasa alcalina (50). El núcleo es irregular y frecuentemente con forma de herradura o de frijol. La cromatina es difusa y lineal, en contraste de la cromatina densa de los linfocitos o granulocitos maduros (49,51).

La transición de monocito-macrófago está caracterizada por un agrandamiento celular progresivo. El núcleo se vuelve redondo, los nucleolos pueden ser vistos y en general la célula pierde actividad de peroxidasa, pero se incrementa en retículo endoplásmico, lisosomas y mitocondrias (48,52). Los macrófagos colectivamente conocidos como histiocitos, desarrollan diferentes características citoquímicas y morfológicas que dependen del sitio de maduración y del tejido de residencia. Los macrófagos no son considerados células tallo; sin embargo, se ha encontrado que algunos macrófagos pueden proliferar en el tejido, especialmente en áreas de inflamación, lo que permite incrementar su número en estos sitios (53).

Los monocitos y macrófagos fagocitan microorganismos, impidiendo su crecimiento intracelular. 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 (15,17). Después de la adhesión del microorganismo a la membrana celular del macrófago, se lleva a cabo el englobamiento

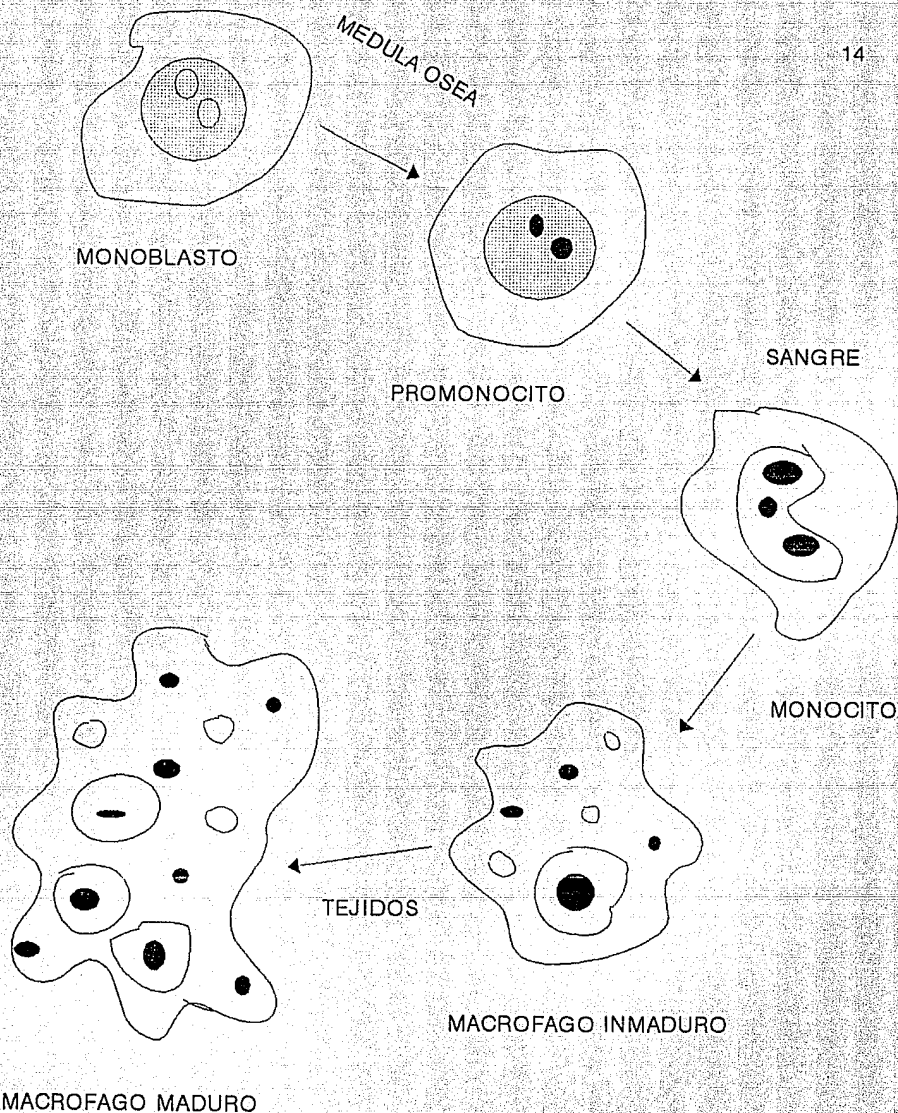


Figura 2. Maduración de macrófagos. Los monoblastos y los promonocitos son las primeras células precursoras de la serie monocito-macrófago, mismas que varían en tamaño, número de núcleos y vacuolas con respecto al macrófago maduro.

Tomado de referencia 21.

del mismo. Los lisosomas se fusionan con el fagosoma (vesícula formada por la fusión de pseudópodos membranales), en el que se liberan enzimas hidrolíticas y otras sustancias microbicidas, de las cuales las más poderosas son productos del metabolismo del oxígeno, tales como el superóxido (O_2^-), oxígeno molecular (O_2), radicales hidroxilo ($OH\cdot$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (16,17).

Por otro lado, los macrófagos activados se pueden adherir a las células tumorales y matarlas 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 (54,55).

Los macrófagos también son importantes ya que actúan como limpiadores al fagocitar restos celulares, células viejas, proteínas desnaturalizadas y complejos antígeno-anticuerpo, también eliminan sustancias tóxicas de la sangre, previniendo que éstas lleguen a los tejidos y otras partículas como factores coagulados (17,56,57).

Por su parte, los granulocitos o neutrófilos presentan seis estadios morfológicamente identificables en el proceso de maduración, que van desde la célula tallo unipotente al neutrófilo segmentado funcional. Estos estadios son: a)mieloblasto, b)promielocito, c)mielocito, d)metamielocito, e)granulocito en banda y f)granulocito segmentado o neutrófilo polimorfonuclear (PMN) (58) (Figura 3). 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 reemplazado gradualmente por un citoplasma voluminoso de color rosa y granular, cuando se tiñe con el colorante de Giemsa, en el estadio maduro diferenciado (58,59).

El mieloblasto, es el precursor del neutrófilo reconocible morfológicamente en etapas tempranas con un núcleo redondo u ovalado y con citoplasma agranular muy pequeño.

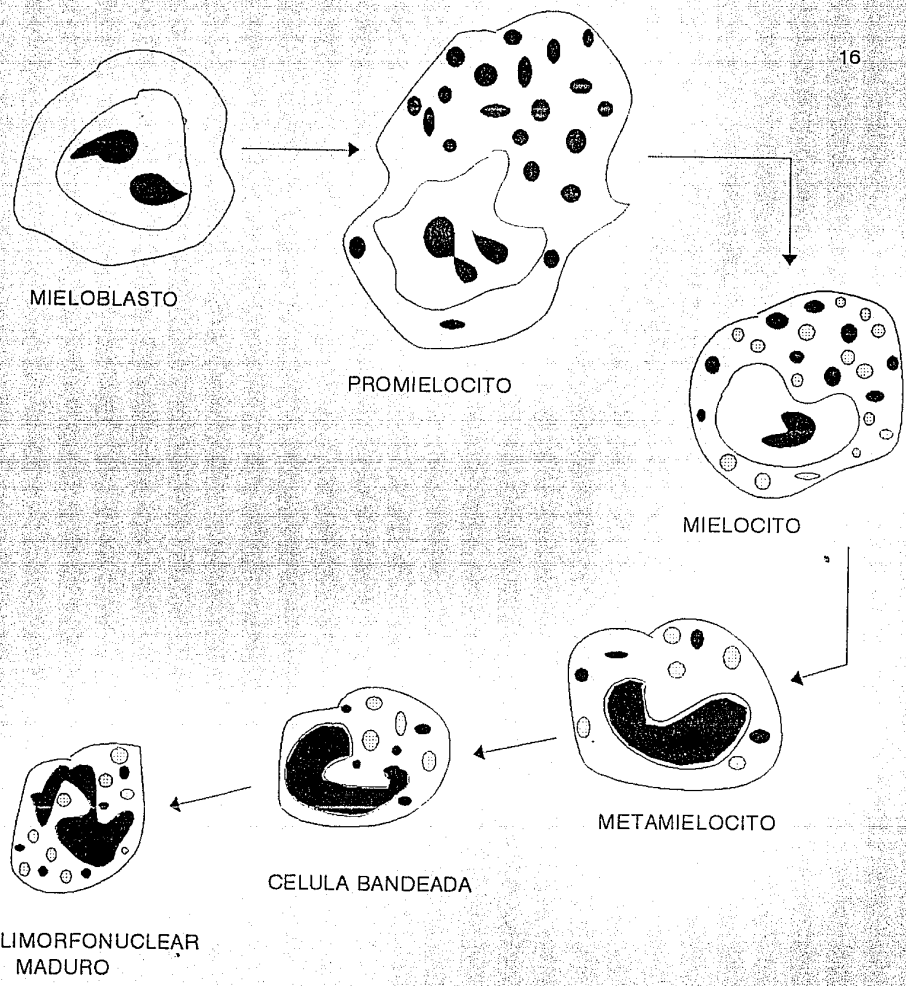


Figura 3. Maduración de granulocitos. La variación en la morfología de los granulocitos durante sus etapas de maduración se refleja principalmente en las modificaciones que sufre el núcleo Tomado de referencia 17.

El mieloblasto tiene actividad de esterasa específica demostrada por la reacción con naftol AS-D cloroacetato (58).

El promielocito es reconocido por la presencia de gránulos primarios grandes llamados azurofílicos, que contienen enzimas y otras sustancias tales como la mieloperoxidasa. El mielocito presenta un núcleo reducido en tamaño, redondo u oval y generalmente excéntrico, teniendo en su estadio final una reducción en el radio núcleo-citoplasma (60,61).

El metamielocito es ligeramente más pequeño que el mielocito y posee como característica principal una indentación que da al núcleo la forma de riñón o frijol (granulocitos humanos) o una perforación central (granulocitos de ratón). El metamielocito se convierte en granulocito en banda cuando las características de cambio morfológico en el núcleo se hacen más pronunciadas, siendo la célula más pequeña que el metamielocito. Este estadio es el primero en aparecer en la sangre (61).

Aunque el tamaño del granulocito en banda es similar al PMN, este es reconocido por un núcleo segmentado con dos o más lóbulos conectados por un delgado filamento nuclear. La mayoría de los neutrófilos presentan de dos a cinco lóbulos nucleares (60).

La respuesta inicial de los neutrófilos contra los microorganismos antigénicos se inicia con la diapédesis (marginación y adherencia), proceso por el cual el neutrófilo se adhiere al endotelio vascular y se dispersa sobre su superficie, siendo esta adherencia reversible al entrar nuevamente a la circulación. El movimiento a través del tejido es facilitado por sustancias secretadas por gránulos neutrofilicos específicos (por ejemplo colagenasa) (62,63).

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 misma. Después de que el factor quimiotáctico es ligado por el receptor de la membrana plasmática del neutrófilo, ésta induce cambios metabólicos dentro de la célula y los neutrófilos se

mueven hacia la fuente quimioatrayente (64). Dentro de estos factores se encuentra la IL-8 (interleucina 8) secretada por los macrófagos (65).

En el área de inflamación, la mayoría de los neutrófilos reconocen a la partícula como extraña y se inicia la adhesión y la fagocitosis. Algunos microorganismos o partículas pueden ser reconocidas al ser opsonizadas con anticuerpos como la inmunoglobulina G (IgG), la cual se liga a la partícula por la región Fab, mientras que la región Fc se adhiere al receptor Fc de la membrana del neutrófilo (Figura 4) (17,66).

Una vez llevado a cabo el reconocimiento y la adhesión, la partícula es rodeada por pseudópodos emitidos de la membrana citoplásmica del neutrófilo. Cuando los pseudópodos se tocan forman el fagosoma, el cual se fusiona con el lisosoma (vacuola digestiva) que contiene gránulos primarios específicos (enzimas) formando así el fagolisosoma. Esta fusión y liberación es conocida como degranulación con la que se digiere al organismo patógeno y posteriormente es exocitado (17). La mayoría de los neutrófilos mueren en el exudado inflamatorio, siendo fagocitados por los macrófagos (57).

FACTORES HEMATOPOYÉTICOS Y BIOLOGIA DEL GM-CSF

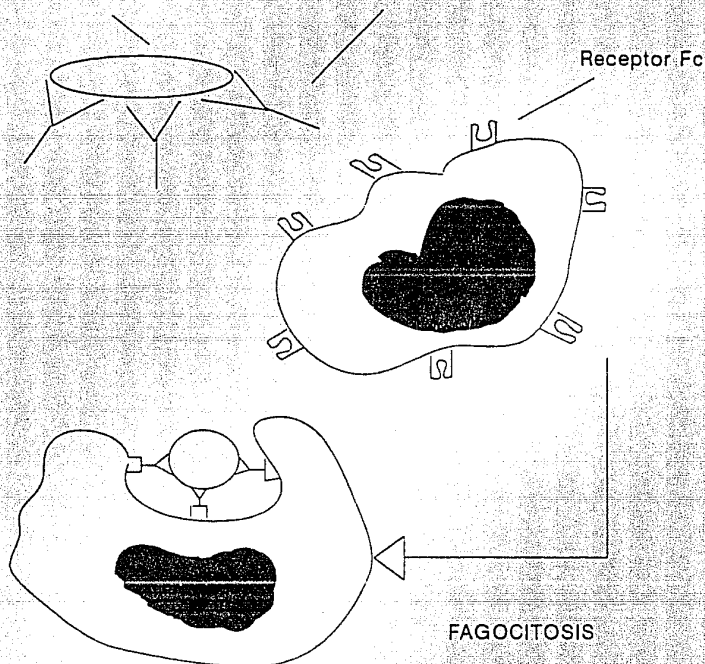
Factores hematopoyéticos.

Como hemos mencionado, los CSFs regulan la proliferación de células precursoras hematopoyéticas, e interactúan con células de estadios más diferenciados estimulando su actividad funcional (67,68).

Existen cuatro moléculas de CSF bien caracterizadas que regulan a las células mieloides: a) Interleucina 3 o multifactor estimulador de colonias (IL-3 o multi-CSF); b) el factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), ambos son definidos como factores de crecimiento de multilínea, ya que tienen una influencia positiva en la proliferación y diferenciación sobre células en estadios menos comprometidos; c) el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), donde la célula blanco es un precursor de granulocitos; y por último el factor estimulador de

Bacteria cubierta con
inmunoglobulina G

Región Fc de la inmunoglobulina G



MACROFAGO O GRANULOCITO

Figura 4. Fagocitosis. Una bacteria es cubierta con inmunoglobulina G para ser fagocitada eficientemente por un macrófago o granulocito, los cuales tienen receptores de superficie celular capaces de unir la región Fc de las moléculas de inmunoglobulina. La unión de la bacteria cubierta con anticuerpos a los receptores Fc activan el proceso de fagocitosis. Tomado de referencia 21.

colonias de macrófagos (M-CSF) que estimula la formación de colonias hacia macrófagos (Tabla 1) (69,70,71,72,73,74).

Estos factores son indispensables en la proliferación y diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas *in vitro*. Hoy en día, ha sido posible su obtención en forma recombinante a partir de los genes que los codifican (75,76).

Biología del GM-CSF

El GM-CSF fué uno de los primeros factores en ser descrito, purificado y molecularmente clonado en bacterias y levaduras. Su nombre deriva de la capacidad para estimular la proliferación y diferenciación de granulocitos y macrófagos, detectado mediante la formación de colonias de macrófagos, granulocitos o una mezcla de ambos tipos celulares en cultivos semisólidos de agar (77,78). Este factor puede ser producido por diferentes tipos celulares y bajo diferentes circunstancias. Su producción a partir del cultivo de células provenientes de varios órganos, es continua durante varios días y refleja una síntesis constante más que la liberación del factor de sitios de almacenaje intracelular, ya que dicha producción puede ser truncada por inhibidores de síntesis proteica (79,80).

La síntesis de GM-CSF requiere de la estimulación de la célula productora por otros factores; tales como antígenos, agentes inflamatorios, citocinas, etc. Concentraciones muy bajas de GM-CSF son producidos en ausencia de estimulación (81,82). Entre las fuentes celulares que producen GM-CSF se encuentran: linfocitos T, inducidos por la unión de ligandos como anticuerpos monoclonales, lectinas y antígenos al receptor del linfocito; macrófagos, siendo la señal más común para la producción del factor algunos productos de la pared celular de bacterias conocidos como lipopolisacáridos (LPS); células endoteliales, activadas con LPS y algunas citocinas tales como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina-1 (IL-1), mismas que inducen en células fibroblásticas la producción de GM-CSF (Figura 5) (83,84,85).

TABLA 1

FACTORES DE CRECIMIENTO HEMATOPOYETICO

FACTOR	PESO * MOLECULAR	FUENTE CELULAR	CELULAS QUE PRODUCE
IL-3	14-28	Linfocitos T	Eritrocitos Granulocitos Macrófagos Megacariocitos
GM-CSF	14-35	Linfocitos T Fibroblastos Endotelio Epitelio Macrófagos	Granulocitos Macrófagos
G-CSF	18-22	Endotelios Macrófagos Fibroblastos	Granulocitos
M-CSF	70-90	Macrófagos Fibroblastos Endotelios	Macrófagos

IL-3 Interleucina-3
 GM-CSF Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y
 Granulocitos
 G-CSF Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos
 M-CSF Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos
 * Peso molecular en Kilodaltones (su variación
 depende del estado de glicosilación).
 Tomado de referencia 91.

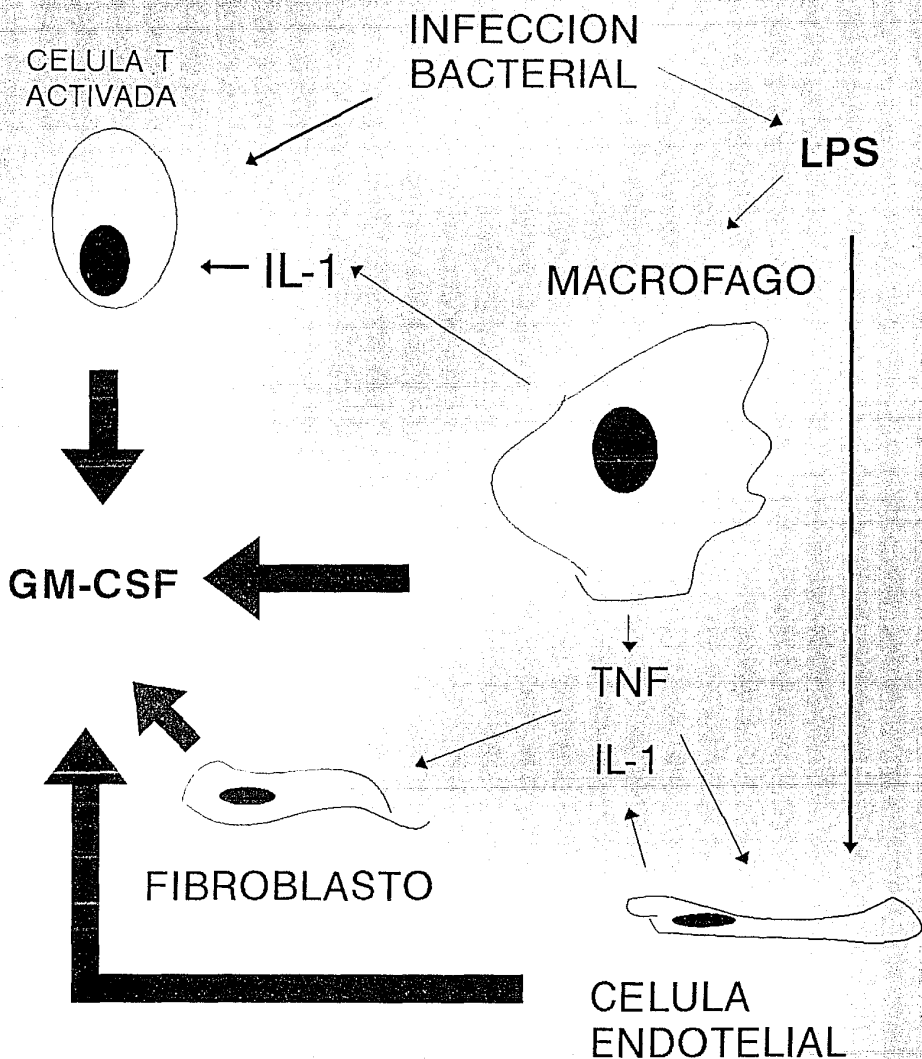


FIGURA 5. Señales que estimulan la producción de GM-CSF tras una infección bacteriana. Tomado de referencia 89.

La estructura del GM-CSF humano, de ratón y simio han sido determinadas por análisis secuencial de aminoácidos y por deducción a partir de la secuencia de nucleótidos de clones de DNA. En cada especie, la proteína nativa es precedida por una secuencia hidrofóbica de 25 aminoácidos. El GM-CSF de ratón comprende 124 aminoácidos, mientras que el de humano y simio poseen tres aminoácidos más, teniendo ambos 127 residuos en total. Ambos tipos poseen dos enlaces α -helices necesarios para la actividad biológica del factor (86,87).

El GM-CSF de ratón y humano comparten únicamente 56% de secuencias de aminoácidos idénticas, lo que hace pensar que el GM-CSF es uno de los factores de crecimiento mieloides menos conservados. Así, debido a la baja identidad en secuenciación entre el GM-CSF de ratón y humano, no existe actividad cruzada entre las dos especies (88,89). El GM-CSF aislado de ratón y humano, posee cadenas glucosídicas que le dan un peso aproximado de 23 kilodaltones (kD). Los datos indican que los carbohidratos unidos a la proteína no son necesarios para la actividad biológica del GM-CSF y por el contrario disminuyen su afinidad por su receptor (78,90), sin embargo son necesarios para su estabilidad y solubilidad (91).

La unión del GM-CSF a su receptor, se ha observado en una gran variedad de células, que incluyen líneas linfoides y mieloides, así como tejido hematopoyético normal, células de exudado peritoneal, bazo y médula ósea (92,93). Se han descrito dos tipos de receptores para el GM-CSF: un número bajo de receptores de alta afinidad (10-100 receptores/célula) y un número mayor de receptores de baja afinidad (300-500 receptores/célula), ambos con un peso de 50 kD (94,95).

El receptor para GM-CSF puede ser modulado de manera negativa sobre células de médula ósea por altas concentraciones de IL-3 y M-CSF, no obstante el mecanismo por el cual se realiza esta transmodulación indirecta de receptores aún no se conoce (96,97). El mismo GM-CSF también puede mediar la regulación de la expresión de sus receptores membranales; dicha modulación se ha observado en células de linaje monocítico, donde

se observa un decremento en el número de los mismos con la diferenciación, pero siempre con una adecuada cantidad en células maduras (arriba de 100 por célula) (98).

La acción primaria del GM-CSF sobre células hematopoyéticas normales es estimular la sobrevivencia, proliferación y diferenciación hacia linajes monocito y granulocito (99,100). Se le considera como un factor de tipo local ya que se produce en áreas específicas de respuesta inflamatoria contra agentes patógenos, donde actúa aumentando la funcionalidad biológica de las células fagocíticas. Asimismo, promueve la proliferación de precursores granulocíticos y la liberación de agentes citotóxicos, e incluso de otros factores como IL-1 y TNF, que a su vez estimulan el reclutamiento de células defensoras, por lo que también se le asigna una actividad inmunomodulatoria en los sitios de infección (101,102).

En cultivos *in vitro* de médula ósea de ratón, existe dependencia entre la morfología de las colonias obtenidas y la cantidad de GM-CSF de ratón (rmGM-CSF) presente. Así, tenemos que colonias de macrófagos se forman a bajas concentraciones, mientras que colonias de granulocitos y macrófagos-granulocitos, aparecen consecutivamente al incrementar la cantidad de factor (103).

Sin embargo, en trabajos realizados en el laboratorio de diferenciación celular (datos no publicados), se ha encontrado que en esos mismos cultivos (al utilizar como inductor de proliferación el medio condicionado de células epiteliales con presencia de GM-CSF natural y el GM-CSF natural purificado y recombinante en altas concentraciones), no se ha observado la formación de colonias mixtas (macrófagos-granulocitos) provenientes supuestamente de un precursor común (precursor bipotencial), pero sí de colonias de macrófagos y granulocitos por separado.

De hecho, a pesar de utilizar técnicas de anticuerpos dirigidos contra proteínas específicas de superficie o densidad celular así como de dispersión de luz, no ha sido posible caracterizar y aislar la célula capaz de diferenciarse a macrófagos y granulocitos en presencia de GM-CSF (104,105).

Por otro lado, se ha observado que al utilizar factores estimuladores de colonias recombinantes purificados, en los experimentos de proliferación celular hematopoyética, se puede dar la secreción de otros factores activos por las mismas células blanco (80), y ejercer su efecto de manera individual o sinérgica sobre los precursores celulares en el cultivo.

Por consiguiente, en la actualidad el mecanismo mediante el cual el GM-CSF actúa sobre su célula blanco para generar macrófagos y granulocitos, es poco conocido.

Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo se evaluó el efecto del GM-CSF en la proliferación de células precursoras de médula ósea de ratón, específicamente en la cinética de respuesta de precursores mieloides. Además, se estudió la respuesta proliferativa y de diferenciación de las células precursoras inducidas de manera temprana y tardía por GM-CSF, al transferirlas a un nuevo cultivo en presencia de un sólo factor, y aislarlos así de la acción de factores secundarios que pudieran intervenir en el comprometimiento de dichos precursores a un linaje determinado.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

1. Estudiar el efecto de GM-CSF en la proliferación de células precursoras de médula ósea de ratón.
2. Determinar el tipo de célula blanco que tiene el GM-CSF en la proliferación de médula ósea de ratón.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar si la concentración de rmGM-CSF influye en la proliferación de precursores bipotenciales y/o monopotenciales
 - 1a. Determinar el número de colonias que se desarrollan en presencia de diferentes concentraciones de rmGM-CSF.
 - 1b. Determinar los tipos de colonias que se forman en presencia de diferentes concentraciones de rmGM-CSF.
- 2.1 Evaluar la cinética de aparición (en días) de grupos y colonias de granulocitos y macrófagos con células de médula ósea en respuesta al rmGM-CSF.
 - 2.1a. Determinar el número de grupos y colonias que se forman con rmGM-CSF a través del tiempo.
 - 2.1b. Determinar el tipo de células que forman los grupos y colonias que se obtienen con rmGM-CSF a través del tiempo.
- 2.2 Evaluar el tipo de colonias que generan los primeros grupos de células que se forman en respuesta al rmGM-CSF.
- 2.3 Evaluar el tipo de colonias que generan los grupos de células que se forman tardíamente en respuesta al rmGM-CSF.

MATERIAL Y METODO

MATERIAL BIOLÓGICO

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratones CD-1 de 6 a 8 semanas de edad de ambos sexos, como donadores de células de médula ósea.

CONDICIONES DE CULTIVO

Para el cultivo *in vitro* de las células de médula ósea se utilizaron cajas de petri 35 x 10 mm (Costar, USA) y placas de cultivo de 24 pozos de 16 mm de diámetro (Costar, USA). Las células fueron cultivadas bajo una atmósfera de 10% CO₂ a 37 °C en aire y humedad saturante en Medio de Eagle Modificado Dulbecco (MEMD, Sigma Chemical Co. USA) (Apéndice 1) suplementado con 10% de Suero de Caballo (SC, Sigma Chemical Co. USA), previamente desactivado a 56 °C por 30 min. Se agregó al MEMD antes del cultivo estreptomicina (100 µ/ml, penicilina G (100 U/ml) y bicarbonato de sodio (3.7 g/l), ajustando a un pH de 7.2 y filtrando para fines de esterilidad con filtros de membrana (Millipore, USA.), con un poro de 0.22 µ de diámetro.

OBTENCION DE CELULAS DE MEDULA OSEA

Se sacrificaron los ratones por descervicación, se extrajeron los fémurs los cuales se colocaron en una caja de Petri con MEMD. Al fémur se le perforó ambas epífisis y con ayuda de una jeringa de 1 ml se le hizo fluir MEMD de un extremo a otro para extraer todas las células de la médula. Se colocaron las células en tubos cónicos para posteriormente lavarlos dos veces con MEMD mediante centrifugación a 500 g por 5 min. La cantidad de células se determinó por conteo en un hemocitómetro (American Optical, USA).

ENSAYOS DE CSF

Para el ensayo de inducción a la formación de colonias se utilizó la técnica de doble capa en agar (106). Para la primera capa (con presencia de inductor) se preparó agar al 0.6 % en agua bidestilada y se esterilizó en autoclave durante 15 min, posteriormente se mantuvo a una temperatura de 56 °C, se mezcló con 20 % de ME, 20 % de SC y 20 % de MEMD doblemente concentrado (2X), obteniéndose un volumen final de 2.5 ml para colocarse en cajas de Petri y 1 ml para pozos de cultivo de 24. Se esperó que transcurrieran 20 min para facilitar la gelificación antes de agregar la segunda capa de agar. La segunda capa se preparó utilizando agar al 0.4% en agua bidestilada, se colocaron 300,000 o 100,000 células de médula ósea en MEMD, dependiendo del tamaño de la caja de cultivo; en esta capa se utilizó 10 % de SC, 50 % de ME conteniendo células de médula ósea, 20 % de ME (2X) y 20 % de agar. Después de haber colocado la segunda capa se esperó 20 min para que se gelificara y se incubó por un periodo de 7 días. Se consideró una colonia cuando estaba formada por más de 20 células y grupos cuando fueron de 2 a 19 células, las cuales se contaron con ayuda de un microscopio invertido (American Optical, USA).

MORFOLOGIA CELULAR DE LOS GRUPOS Y COLONIAS

La evaluación de la morfología de las colonias obtenidas en la técnica de doble capa de agar se hizo con una modificación de las técnicas de Moezzil (106). Brevemente, la capa de agar en donde se forman los grupos y colonias se extrajo con un papel filtro Whatman del No.2, y se transfirió a un portaobjetos dejándolo secar a temperatura ambiente. Posteriormente, el papel filtro se retiró cuidadosamente. Los grupos y colonias que se encontraron en el portaobjetos se fijaron con metanol y se tiñeron con giemsa (para la identificación de colonias) o con la tinción citoquímica de cloroacetato esterasa (para la identificación de grupos de células precursoras) (Apéndice 2) (58). Aquellas colonias consistentes de células con núcleos en banda o segmentados fueron considerados como

granulocitos, mientras que cuando las células eran de mayor tamaño, citoplasma vacuolado y mononucleadas fueron consideradas de morfología macrofágica. Por su parte, los grupos que resultaron positivos a la tinción con cloroacetato esterasa (coloración roja brillante), fueron identificados como precursores de granulocitos, mientras que aquellos que presentaron coloración marrón, se les consideró como precursores macrofágicos.

CINETICA DE FORMACION DE COLONIAS DE GRANULOCITOS Y MACROFAGOS

Con el fin de establecer la concentración de GM-CSF a la cual se observara formación de colonias de macrófagos-granulocitos (mixtas), se sembraron células de médula ósea de ratón por medio de la técnica de agar, en presencia del factor GM-CSF recombinante de ratón (rmGM-CSF) a diferentes concentraciones (0.2, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 y 20.0 ng/ml). Después de siete días de cultivo, se evaluó el número de colonias generadas, asimismo se realizó el análisis morfológico e histoquímico de las colonias.

CINETICA DE APARICION (EN DIAS) DE GRUPOS Y COLONIAS DE GRANULOCITOS Y MACROFAGOS.

Para llevar a cabo la cinética de respuesta de precursores mieloides al GM-CSF, se sembraron células de médula ósea de ratón en presencia de rmGM-CSF, y en los cultivos del primero al séptimo día se les evaluó en la formación de grupos y colonias bajo el microscopio invertido. Igualmente, se realizó el análisis morfológico e histoquímico de los grupos y colonias.

TIPOS DE COLONIAS QUE GENERAN LOS PRIMEROS GRUPOS DE CELULAS EN UN SEGUNDO ESTIMULO CON GM-CSF Y G-CSF.

Se sembraron células de médula ósea estimuladas con rmGM-CSF, que después de dos y cuatro días de cultivo los grupos formados fueron transferidos por micromanipulación

(usando una pipeta Pasteur y con la ayuda de un microscopio invertido) a una nueva bicapa con GM-CSF. Asimismo, para verificar si en los grupos de dos días se encontraban presentes precursores granulocíticos, transferimos dichos grupos a un nuevo cultivo con rhG-CSF (400 ng/ml) como inductor. Se evaluó el número de colonias obtenidas y se realizó el análisis morfológico e histoquímico de las colonias.

ANALISIS DE DATOS

El estudio de la naturaleza de la formación de los tipos celulares sanguíneos (macrófagos y granulocitos), se caracterizó como un modelo teórico, mecánico o explicativo (112,113). En el se describen una serie de datos, que por su naturaleza teórica compleja no se pueden explicar por medio de un modelo empírico o estadístico (113). Sin embargo, aunque el modelo general es teórico, se utilizó para la cinética de formación de colonias de granulocitos y macrófagos, un análisis de regresión ya que se presupuso una dependencia del número de colonias con respecto al incremento de la concentración de GM-CSF.

VARIOS

Los experimentos realizados se llevaron a cabo por duplicado y al menos dos veces en experimentos independientes. Los resultados mostrados en las tablas son el promedio de dichos experimentos. Un cultivo sin inductor siempre fué añadido. Los Factores Estimuladores de Colonias de Macrófagos y Granulocitos (rmGM-CSF; actividad específica 1×10^6 U/mg) y Estimulador de Colonias de Granulocitos recombinante humano (rhG-CSF; actividad específica 10×10^6 U/mg) utilizados en este trabajo fueron donados por Dr. Guillis de Immunex, USA.

RESULTADOS

EVIDENCIA DE QUE EN CULTIVOS DE MEDULA OSEA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE rmGM-CSF, SE FAVORECE UNICAMENTE LA FORMACION DE COLONIAS DE MACROFAGOS Y GRANULOCITOS PERO NO DE COLONIAS MIXTAS.

Con respecto a la cinética de formación de colonias de granulocitos y macrófagos a diferentes concentraciones, los resultados obtenidos demostraron, que entre 0.2 y 5 ng/ml de rmGM-CSF existió poca variación en el número de colonias (105 a 193 colonias) en comparación de 0.2 y 10 ng/ml (105 y 310 respectivamente), obteniéndose la mayor proliferación a 20 ng/ml (345 colonias). Asimismo, se encontró dependencia significativa de tipo exponencial entre el número de colonias obtenidas y la concentración de rmGM-CSF utilizada ($p < 0.01$, Fisher) (Tabla 2; Gráfica 1).

Después de la identificación de las colonias obtenidas en la curva de dosis respuesta con rmGM-CSF se observó que a las concentraciones de 0.2 a 5 ng/ml se favoreció la formación de colonias de macrófagos (entre 60 y 82%), en relación a los porcentajes obtenidos de colonias de granulocitos (de 2 a 30%). Mientras que, al utilizar 10 ng/ml se observó una respuesta similar de colonias de macrófagos y granulocitos (49 y 42%, respectivamente), la cual fue más notoria a la concentración de 20 ng/ml (51% y 47%).

Es importante hacer notar, que en el conteo morfológico no se identificaron colonias mixtas (macrófagos-granulocitos) en ninguna de las concentraciones trabajadas (Tabla 3; Gráfica 2).

Después de los anteriores resultados se decidió escoger la concentración de 20 ng/ml para llevar a cabo los siguientes ensayos de este trabajo, ya que indujo una buena proliferación así como un porcentaje similar de macrófagos y granulocitos.

TABLA 2

NUMERO DE COLONIAS FORMADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE rmGM-CSF (ng/ml).

(-)	0
0.2	105
0.5	114
1	142
2.5	166
5	193
10	310
20	345

SIMBOLOGIA:

(-) Control negativo. Sin inductor.

rmGM-CSF Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y Granulocitos recombinante de ratón

ANALISIS ESTADISTICO

El número de colonias es dependiente del aumento de la concentración de GM-CSF.

$$y = e^{(4.85843 + 0.058463 x)}$$

r = 0.91, p < 0.01, Análisis de regresión esponencial, F.

GRAFICA 1
NUMERO DE COLONIAS FORMADAS CON DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE rmGM-CSF.

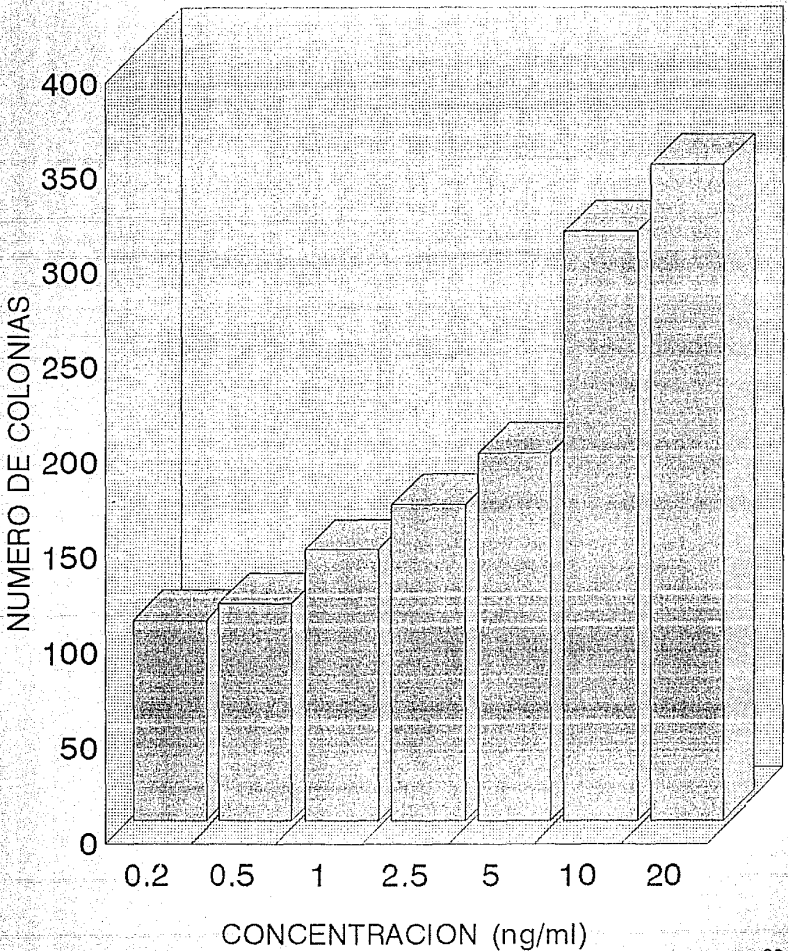


TABLA 3

MORFOLOGIA CELULAR DE COLONIAS OBTENIDAS A PARTIR DE
DIFERENTES CONCENTRACIONES DE rmGM-CSF.

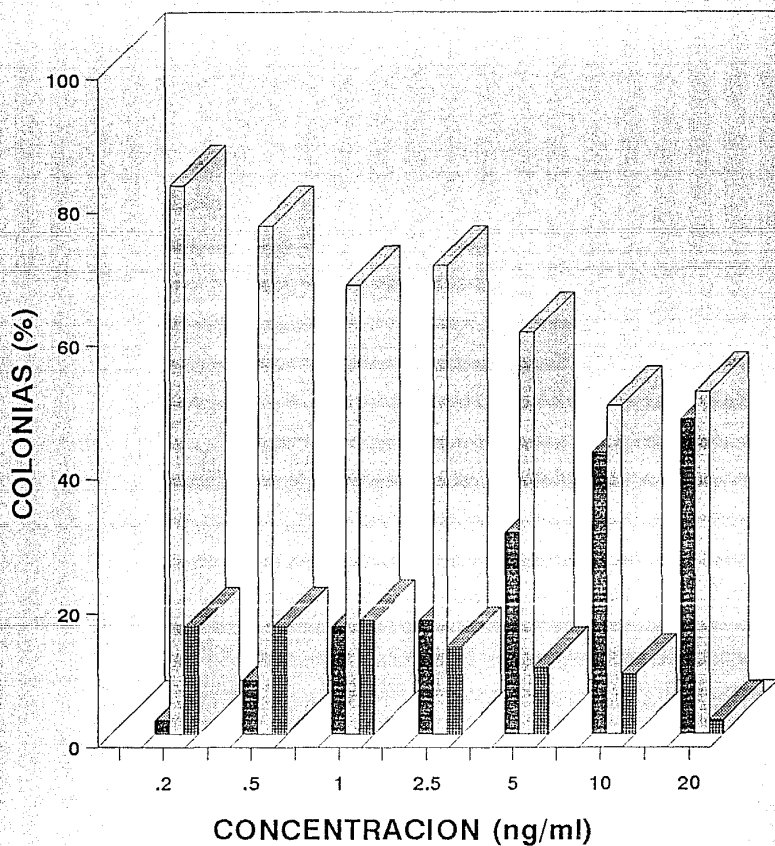
rmGM-CSF ng/ml	NUMERO DE COLONIAS (PORCENTAJE)				
	GRANULOCITOS			MACROFAGOS	BLASTOS
	BANDA	SEGMENTADOS	TOTALES		
0.2	1(1)	1(1)	2(2)	78(82)	15(16)
0.5	3(3)	5(5)	8(8)	77(76)	17(16)
1	8(7)	10(9)	18(16)	78(67)	20(17)
2.5	6(5)	15(12)	21(17)	86(70)	15(13)
5	6(4)	39(26)	45(30)	90(60)	16(10)
10	12(8)	52(34)	64(42)	74(49)	13(9)
20	5(5)	45(42)	50(47)	55(51)	2(2)

SIMBOLOGIA:

rmGM-CSF Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y
Granulocitos recombinante de ratón.

GRAFICA 2

TIPOS DE COLONIAS FORMADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE rmGM-CSF



■ GRANULOCITOS □ MACROFAGOS ■ BLASTOS

EVIDENCIA DE QUE LOS PRECURSORES DE MACROFAGOS RESPONDEN ANTES QUE LOS DE GRANULOCITOS EN CULTIVOS DE MEDULA OSEA DE RATON INDUCIDOS CON rmGM-CSF.

Una vez que se determinó la concentración de rmGM-CSF a usar en los ensayos, el siguiente objetivo fue evaluar el tipo de células de médula ósea que responden tempranamente al estímulo proliferador de rmGM-CSF. Para lo cual, se llevó a cabo la cinética de aparición (en días) de grupos y colonias de granulocitos y macrófagos.

Se encontró que a los dos primeros días de incubación con 20 ng/ml de rmGM-CSF, existió un alto porcentaje de precursores de macrófagos (97%) y que después de 24 horas (tercer día) se formó una cantidad considerable de precursores de granulocitos (31%). Al cuarto día, el porcentaje de grupos de ambos tipos celulares fué muy similar (46% de macrófagos y 42% de granulocitos), mismos que disminuyeron a los días 5, 6 y 7 para dar lugar a la formación de colonias de los tipos correspondientes (Tabla 4; Gráfica 3).

Las colonias de macrófagos aparecieron a partir del tercero y cuarto día (2 y 12% respectivamente), mientras que las colonias de granulocitos se formaron hasta el quinto (19%), en donde no obstante, hubo un mayor porcentaje de colonias de macrófagos (48%). Asimismo, observamos que las colonias de ambos tipos celulares tienden a ser semejantes al séptimo día (55% macrofágicas y 44% granulocíticas) (Tabla 4; Gráfica 3).

EVIDENCIA DE QUE LOS PRECURSORES DE MACROFAGOS SON LAS UNICAS CELULAS QUE RESPONDEN AL rmGM-CSF EN CULTIVOS DE MEDULA OSEA DE RATON.

Después de establecer que los grupos y colonias de macrófagos aparecen antes que los granulocitos en cultivos de médula ósea inducidos con rmGM-CSF, se analizó si los grupos de células que respondieron en los primeros días estaban formados efectivamente por precursores de macrófagos. Con este fin se evaluó los tipos de colonias que generan

TABLA 4

MORFOLOGIA CELULAR DE GRUPOS Y COLONIAS DE
LA CINETICA DE PROLIFERACION DE rmGM-CSF EN FUNCION
DEL TIEMPO

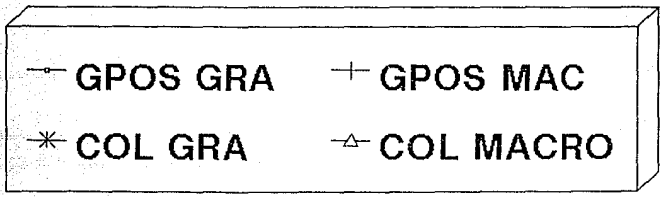
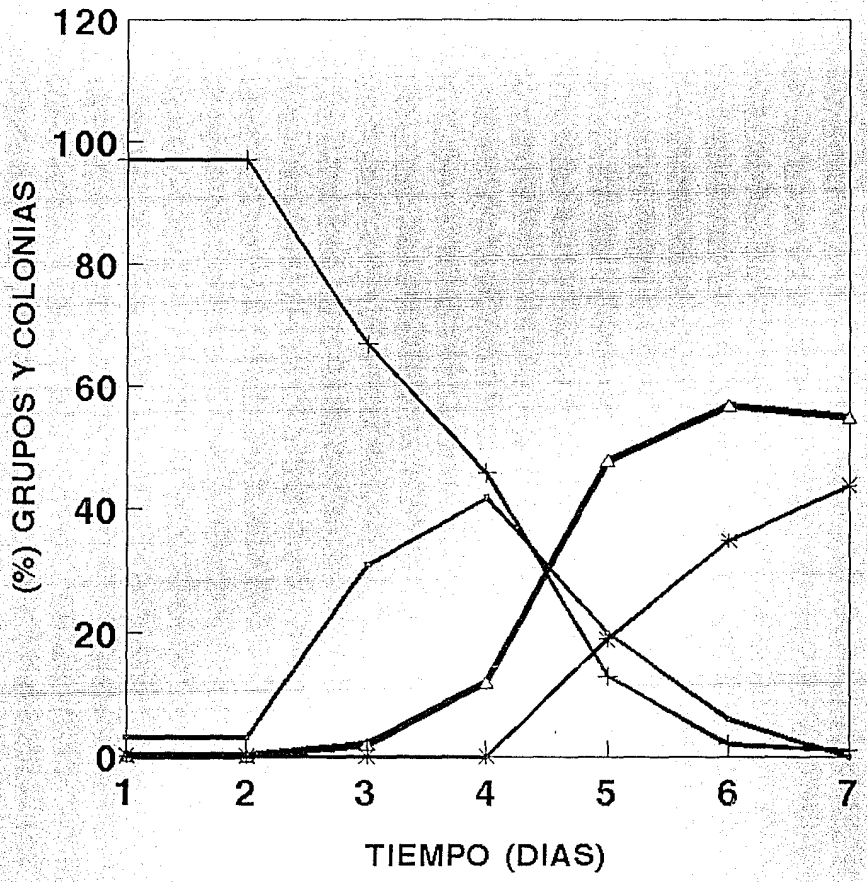
DIA	No. GRUPOS (%)		No. COLONIAS (%)	
	PREC MAC	PREC GRA	MAC	GRA
1	130(97)	4(3)	0(0)	0(0)
2	280(97)	9(3)	0(0)	0(0)
3	296(67)	140(31)	9(2)	0(0)
4	250(46)	230(42)	65(12)	0(0)
5	64(13)	105(20)	250(48)	98(19)
6	10(2)	32(6)	295(57)	176(35)
7	4(1)	0(0)	283(55)	226(44)

SIMBOLOGIA:

MAC Macrófagos.
 GRA Granulocitos.
 PREC MAC Precusores de macrófagos.
 PREC GRA Precusores de granulocitos.

GRAFICA 3

CINETICA DE APARICION DE GRUPOS Y COLONIAS DE MACROFAGOS Y GRANULOCITOS.



los grupos de células de dos días de cultivo con rmGM-CSF cuando son transferidos a un segundo estímulo con rmGM-CSF y rhG-CSF.

Los resultados mostraron que los grupos transferidos nuevamente a una bicapa con rmGM-CSF, además de proliferar presentaron en su gran mayoría morfología de tipo macrofágica (96%), mientras que aquellos transferidos en presencia de rhG-CSF no formaron ninguna colonia (Tabla 5).

Por otro lado, además de los grupos de células de 2 días, determinamos el tipo de progenitores presentes en aquellos de cuatro días de incubación con rmGM-CSF; para lo cual dichos grupos fueron transferidos a nuevas bicapas con rmGM-CSF y rhG-CSF como inductores.

Los resultados obtenidos demostraron que los grupos de células transferidas a los 4 días a una nueva bicapa con rmGM-CSF, respondieron formando un porcentaje similar de colonias de macrófagos y granulocitos (41 y 33% respectivamente), al igual que el control con células recién obtenidas de médula ósea en presencia de GM-CSF (57% macrófagos y 42% granulocitos) (Tabla 6).

Asimismo, los grupos transferidos a los cuatro 4 días, en presencia de rhG-CSF, formaron un mayor porcentaje de colonias de granulocitos (77%) con respecto a las colonias de macrófagos (23%), lo cual resultó semejante con los porcentajes obtenidos al cultivar médula ósea total en presencia de rhG-CSF (74% granulocitos y 26% macrófagos) (Tabla 6).

TABLA 5

MORFOLOGIA CELULAR DE COLONIAS FORMADAS A PARTIR DE GRUPOS
CELULARES TRANSFERIDOS DESPUES DE 2 DIAS EN CULTIVO CON
rmGM-CSF.

PRIMER INDUCTOR	SEGUNDO INDUCTOR	NUMERO DE COLONIAS (PORCENTAJE)				
		GRANULOCITOS		MACROFAGOS BLASTOS		
		BANDA	SEGMENTADOS	TOTAL		
rmGM-CSF	--	12(18)	54(36)	66(44)	77(51)	7(5)
rhG-CSF	--	8(8)	88(84)	96(92)	8(8)	0(0)
rmGM-CSF	rmGM-CSF	0(0)	1(4)	1(4)	23(96)	0(0)
rmGM-CSF	rhG-CSF	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

SIMBOLOGIA:

rmGM-CSF. Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y
Granulocitos recombinante de ratón.

rhG-CSF. Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos
recombinante humano.

TABLA 6

MORFOLOGIA CELULAR DE COLONIAS FORMADAS A PARTIR DE GRUPOS
CELULARES TRANSFERIDOS DESPUES DE 4 DIAS EN CULTIVO CON
rmGM-CSF.

PRIMER INDUCTOR	SEGUNDO INDUCTOR	NUMERO DE COLONIAS (PORCENTAJE)				
		GRANULOCITOS		MACROFAGOS BLASTOS		
		BANDA	SEGMENTADOS	TOTAL		
rmGM-CSF	--	23 (22)	22 (20)	45 (42)	60 (57)	1 (1)
rhG-CSF	--	0 (0)	59 (74)	59 (74)	21 (26)	0 (0)
rmGM-CSF	rmGM-CSF	0 (0)	4 (33)	4 (33)	5 (41)	3 (26)
rmGM-CSF	rhG-CSF	0 (0)	27 (77)	27 (77)	8 (23)	0 (0)

SIMBOLOGIA:

rmGM-CSF. Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y
Granulocitos recombinante de ratón.

rhG-CSF. Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos
recombinante humano.

DISCUSION

Uno de los principales objetivos del estudio de las células en cultivo es determinar sus funciones y actividades más inmediatas, con el fin de interpretar la relación que guarda con su ambiente natural, y de esta forma facilitar el entendimiento de los procesos biológicos en que toman parte (107). El cultivo *in vitro* de células hematopoyéticas tuvo sus inicios a mediados de los años sesenta, con Leo Sachs (35) y Donald Metcalf (36) al implementar las técnicas de cultivo en medio semisólido con células de bazo y médula ósea, respectivamente. Esta técnica no ha modificado sus principios básicos, desde su introducción hace 26 años, sin embargo, ha sido la base para saber que la proliferación de células sanguíneas está regulada por diferentes factores estimuladores de colonias (CSFs) (66,67).

En la actualidad se ha postulado la existencia de un precursor bipotencial común para macrófagos y granulocitos, concepto originado de la simple observación de colonias formadas con ambos tipos celulares en cultivos semisólidos (75). Recientemente un factor obtenido de manera recombinante denominado GM-CSF, ha mostrado tener actividad proliferativa y diferenciadora sobre esta célula bipotencial (77,78). A pesar de que se tienen evidencias indirectas de la existencia de la célula bipotencial, ha resultado difícil identificar esta célula, aún con los avances técnicos encaminados a aislar dicha célula precursora (104,105). En consecuencia, el mecanismo mediante el cual el GM-CSF actúa sobre la célula bipotencial para generar los tres tipos de colonias reportadas: granulocitos, macrófagos y granulocitos-macrófagos (mixtas) es poco conocido.

Por consiguiente, dado que no se ha demostrado la existencia de la célula bipotencial ni la acción directa de GM-CFSF sobre la misma, la finalidad de este trabajo fué determinar si la célula blanco del GM-CSF exhibe características monopotenciales, así como también establecer si factores secundarios participan en la formación de los diferentes tipos de colonias presentes en un cultivo de médula ósea inducidos por este factor.

Los resultados obtenidos en el presente estudio aportan evidencias de que el GM-CSF tiene como blanco exclusivamente a las células precursoras de macrófagos y que la respuesta de los precursores de granulocitos para formar colonias, es debida al efecto de otro factor producido de manera secundaria.

La primera aseveración referente a la respuesta exclusiva del macrófago al GM-CSF, es sustentada por los resultados obtenidos en la cinética de proliferación, donde los precursores monocito-macrófagos respondieron tempranamente al efecto del GM-CSF (Tabla 4, Gráfica 3). Estos resultados fueron confirmados posteriormente, ya que al aislar estos grupos de precursores de cualquier influencia de otro factor secretado por las células presentes en el cultivo, y colocarlos nuevamente en presencia GM-CSF, éstos se diferenciaron casi exclusivamente hacia macrófagos (Tabla 5).

La segunda aseveración es apoyada por el hecho de que los precursores granulocíticos aparecieron tardíamente en un cultivo con GM-CSF (Tabla 4, Gráfica 3) lo cual hace pensar que la formación de los grupos de granulocitos pueden ser un efecto propiciado por la acción de un factor proliferador de granulocitos (G-CSF) secretado por los macrófagos en proliferación. Lo anterior es sustentado por trabajos previos realizados en el laboratorio de Diferenciación, en donde se ha demostrado que una línea leucémica de tipo macrofágica WR19M.1, así como macrófagos normales, son capaces de secretar actividad de G-CSF (58,108), además en trabajos recientes se encontró que el lisado de colonias de macrófagos inducidos con GM-CSF posee actividad parecida al G-CSF (109). No se puede descartar la posibilidad de que la respuesta tardía de los precursores granulocíticos al GM-CSF, se deba a que estas células tengan una interfase larga y por consiguiente tarden en dividirse. Sin embargo, esta posibilidad se ve reducida, ya que al realizar cinéticas de aparición de granulocitos con G-CSF en nuestro laboratorio (datos no mostrados), éstas responden a la proliferación desde el primer día de incubación, lo que indica que este tipo celular no tiene una interfase larga.

Asimismo, también se pudo observar que las células que responden tardíamente al efecto proliferador del GM-CSF, al transferirlas a un cultivo con G-CSF forman colonias de manera similar a aquellas obtenidas con G-CSF recombinante (Tabla 6). Lo anterior implica que un factor con actividad de G-CSF participa en la proliferación y maduración final de dichos precursores, en cultivos de médula ósea inducidos por GM-CSF.

Los anteriores resultados pueden ser interpretados como una evidencia de que la célula blanco del GM-CSF es el precursor de macrófagos, es decir, un precursor monopotencial.

Por consiguiente, se puede decir que el GM-CSF es tan sólo un inductor de macrófagos con la propiedad de estimular su proliferación y propiciar la secreción de un factor con actividad semejante al G-CSF, que a su vez induce la proliferación de precursores granulocíticos. De esta forma, en un cultivo de médula ósea con presencia de GM-CSF la formación de colonias se produce a través de la respuesta de precursores individuales de macrófagos y granulocitos por separado, y no mediante la activación de un precursor común para ambos tipos celulares inducido por GM-CSF. De hecho, investigaciones publicadas por otros grupos de trabajo, han demostrado que la administración de rhGM-CSF en tratamientos clínicos, produce una fuerte respuesta de monocitos y una mucho más tardía por parte de granulocitos (110).

Por otro lado, tomando como base estos resultados y los antecedentes de que el macrófago produce y secreta un factor con actividad semejante a G-CSF y quimioatrayentes para granulocitos como la Interleucina-8 (56,65,108), se propone un posible mecanismo para la formación de colonias mixtas inducidas por GM-CSF que han observado y reportado otros autores. Este modelo es el siguiente: el precursor de macrófagos responde al GM-CSF proliferando y a la vez secretando G-CSF así como IL-8; éstos interactúan con los precursores de granulocitos que se encuentran en su cercanía formando una colonia mezclada con la de macrófagos, para finalmente dar la apariencia

de una colonia mixta. Para demostrar este modelo, será necesario utilizar anticuerpo contra G-CSF en un cultivo con células precursoras mieloides en presencia de GM-CSF, para observar si se bloquea la proliferación de granulocitos.

Hoy en día, a pesar de varios intentos por aislar la supuesta célula precursora bipotencial, capaz de diferenciarse hacia macrófagos y granulocitos, aún no se consigue este propósito. Por lo tanto, todavía no se establece con seguridad como se generan los macrófagos y granulocitos estimulados con GM-CSF. De ahí que estemos proponiendo un mecanismo alternativo por medio del cual se formen los macrófagos y granulocitos en presencia del GM-CSF.

El hecho de que el GM-CSF tenga como célula blanco al precursor de macrófagos, abre dos expectativas en la Hematología tanto a nivel básico como clínico:

a) identificar al GM-CSF como un M-CSF específico que estimula al precursor de macrófagos a proliferar y producir un factor semejante al G-CSF, lo cual pone en duda la existencia de una célula precursora bipotencial como blanco del GM-CSF; b) proporcionar una nueva alternativa del proceso de regulación en la generación de células macrofágicas y granulocíticas, así como su estrecha interrelación existente. Lo anterior sería de gran importancia para los hematólogos y oncólogos, ya que en la actualidad se utiliza clínicamente al GM-CSF en la recuperación de pacientes inmunodeprimidos (111), pero sin conocer de manera clara el mecanismo de acción de este factor sobre células mieloides. Así, al determinar que el GM-CSF sólo promueve la proliferación y diferenciación de precursores de macrófagos, posiblemente se conseguiría una mejor respuesta de dichos pacientes, al combinar su administración temprana con factores proliferadores de granulocitos como el G-CSF, permitiendo con ello una recuperación mas pronta.

Finalmente, es conveniente remarcar que las contribuciones en investigación básica, contribuyen al conocimiento de la forma en que se llevan a cabo los procesos biológicos normalmente, y ésta pueda ser la pauta para comprender como se dan los procesos patológicos.

APENDICES

APANDICE 1

MEDIO MINIMO ESENCIAL DE EAGLE.

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

AMINOACIDOS	CONCENTRACION (mg/ml)
L-Arginina	84.0
L-Cistina	62.57
L-Glutamina	584.0
Glicina	30.0
L-Histidina	42.0
L-Isoleucina	105.0
L-Leucina	105.0
L-Lisina.HCL	146.0
L-Metionina	30.0
L-Fenilalanina	66.0
L-Serina	42.0
L-Treonina	95.0
L-Triptófano	16.0
L-Tirosina (Sal Disódica)	104.6
L-Valina	94.0
 VITAMINAS	
D-Ca Pantotenato	4.0
Cloruro de Colina	4.0
Acido Fólico	7.2
Inositol	7.2
Nicotinamida	4.0
Peridoxal.HCL	4.0
Riboflavina	0.4
Tiamina	4.0
 SALES INORGANICAS	
Cloruro de Calcio Anhidro	200.0
Nitrato de Hierro III Monohidratado	0.1
Cloruro de Potasio	400.0
Sulfato de Magnesio Anhidro	97.67
Cloruro de Sodio	6400.0
Fosfato Monosódico Monohidratado	125.0

OTROS COMPUESTOS

L-Glucosa	4500.0
Rojo Fenol	15.0

Mediante agitación se diluyen en agua bidestilada 13.4 g/l del medio Eagle en polvo, se adicionan 3.4 g/l de bicarbonato de sodio, asimismo se agregan antibióticos: Penicilina G 100 u/ml y Estreptomycin 100 mcg/ml. Posteriormente se afora a un volumen de 1000 ml y se agita hasta disolver el polvo procurando no sobreagitar. El pH del medio se ajusta a 6.9 y se esteriliza por filtración con bióxido de carbono, pasándola a través de una membrana millipore con poros de 0.22 micras. Finalmente el medio se almacena a 4 °C hasta el momento de su uso.

Apéndice 2.

TECNICA CITOQUIMICA DE CLOROACETATO ESTERASA.

La técnica de tinción de cloroacetato esterasa, se utilizó para la identificación de precursores y células maduras granulocíticas. Se basa en la actividad de enzimas esterases presentes en estos tipos celulares, identificada en base a una coloración en forma de gránulos rojos brillantes en el citoplasma de dichas células.

AGENTES QUIMICOS**1. Buffer de Formalin-acetona (pH 6.6) como fijador:**

a) Disolver en H ₂ O	300.0 ml
1) Na ₂ HPO ₄	200.0 mg
2) KH ₂ PO ₄	1.0 g
b) Adicionar	
1) acetona	450.0 ml
2) 40% formalina	250.0 ml

2. Solución 2N de Acido Clorhídrico (HCL)

a. Disolver 12N HCL	4.2 ml
b. en agua destilada	20.8 ml

3. Solución de New Fuchsin

a. Disolver New Fuchsin	1.0 g
b. en solución 2N de HCL	25.0 ml

Filtrar cuando se haya enfriado. Cubrir de la luz. Estable por 2 meses.

4. Solución de nitrito de sodio al 4%

a. Disolver nitrito de sodio	1.0 g
b. en agua destilada	25.0 ml

La solución se debe refrigerar (4-10°C) y prepararse cada 7 días.

5. Solución New Fuchsin hexazotizada.

La hexazotización es realizada al mezclar volúmenes iguales de la solución de New Fuchsin y la solución de nitrito de sodio al 4% por un minuto antes de usarse. (Use 0.5 ml new fuchsin/0.5 ml nitrito de sodio al 4%).

6. Solución de Naphtol AS-D Cloroacetato.

- a. Disolver naphtol AS-D Cloroacetato 10.0 mg
 b. en N-N, dimethyl formamida 5.0 ml

Estable en refrigeración (4-10°C). Estable por 2 meses.

7. Buffer fosfato, pH 7.73:

- a. Disolver Na₂HPO₄ 8.52 g
 b. y KH₂PO₄ 0.9 g
 c. en agua destilada 1000.0 ml

Estable por 6 meses.

8. Hematoxilina de Meyer (Sigma)

Procedimiento.

1. Se fija la preparación con el buffer de formalin-acetona por 30 segundos. Se lava con agua y se deja secar.

2. Se incuba la preparación fijada a temperatura ambiente por 30 minutos en:

Caja de Petri

Buffer de fosfato, pH 7.73	9.5 ml
Solución de New Fuchsin hexazotizada (prepar justo antes de usarse)	0.1 ml
Solución de naphtol AS-D cloroacetato	0.5 ml

No se filtra la solución.

3. Se lava con agua y se contratiñe con hematoxilina de Meyer por 10 min.

4. Se lava con agua y se deja secar.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Brow, B. A. 1976. Blood Cells. En: Hematology: principles and procedure. Lea and Febiger, Philadelphia, USA. Cap. 5: pp 29-70.
- 2.- Weiss, L. 1977. Leucocytes. En: Histology. Lippincott, New York, USA. Cap 10: pp 260-288.
- 3.-Fawcett, W. M. 1987. Células fagocíticas. En: Tratado de Histología. Eds. Crosier, T. y Gurney, P. Mc. Graw Hill, México, Cap. 3: pp 111-122.
- 4.- Allen, T. D. 1984. The essential cells of the haemopoietic microenvironment. *Exp Haematol* 12:517-521.
- 5.- Lord, B. I. 1991. Long-term effects of 239Plutonium and 224Radium on the distribution and performance of pluripotent hemopoietic progenitors cells and their regulatory microenvironment. *Int J Radiat Biol* 59:211-227.
- 6.- Lee, M.Y., Fukunaga R., Lee T.J., Lottsfeldt J.L. y Nagata S. 1991. Bone modulation in sustained hematopoietic stimulation in mice. *Blood* 77 (10):2135-2141.
- 7.- Lorimore, S. A. 1990. Synergistic interactions allow colony formation, in vitro, by murine hemopoietic stem cell. *Leuk Res* 14:481-490.
- 8.- Norman, T. 1989. "Regulation of epithelial Cell Growth in vitro" Functional Epithelial Cells in Culture. UCLA School of Medicine, L.A. California, USA. 165-191.
- 9.- Dexter, T. M. 1976. Differentiation and proliferation of hematopoietic cells in culture. *Methods Cell Biol* 14:387-405.
- 10.- Harris, J.R. 1991. The Flow of granular Organelles in Leukocyte Differentiation. En: *Blood Cell Biochemistry*. Ed. Harris, J. Plenum Press, New York, USA. Cap 8: pp 173-204.
- 11.- Katzen, A.N. 1992. Comparison of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-1 production from human peripheral blood mononuclear cells as measured by specific radioimmunoassays. *Eur Cytokine Netw* 3 (4):365-372.
- 12.- Smith, L.G., Weissman I.L. y Heimfeld S. 1991. Clonal analysis of hematopoietic stem-cell differentiation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2788-2792.
- 13.- Heath, K.J., Smith, G.A., Hsu, W.L. y Rathjen, D.P. 1990. Growth and differentiation factors of pluripotential stem cells. *J Cell Sci* 13 (Suppl. 13):75-85.
- 14.- Arai, K.I., Lee, F. y Miyajima, A. 1992. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* 59:783-836.
- 15.- Peterson, V.M., Hansbrough, J. y Buerk, C. 1992. Regulation of granulopoiesis following severe thermal injury. *J Trauma* 23:19-24.
- 16.- Cannistra, A. 1988. Regulation of the production and function of Granulocytes and Monocytes. *Seminars in Hematology* 25 (3):173-188.

- 17.- Klein, J. 1990. Regulation of the immune response. En: Immunology. Blackwell Scientific Publications. Boston, USA. Cap. 7: pp 386-392.
- 18.- Messner, H., Lin, B. y Jamal, N. 1984. Myeloid and Lymphoid departure of human pluripotent Hematopoietic Progenitors (CFU-GEMM). Prog in Clin and Biol Res 148:45-49.
- 19.- Dexter, T.M., Simmons, P., Purnell, R.A., Spooncer, E. y Schofield, R. 1984. The Regulation of Hematopoietic Cell Development By the Stromal Cell environment and Diffusible Regulatory Molecules. Prog in Clin and Biol Res 148:657-765.
- 20.- Just, U., Stocking, C., Spooncer, E., Dexter, M.T. y Ostertag, W. 1990. Expression of the GM-CSF gene after retroviral transfer in hematopoietic stem cell lines induces synchronous granulocyte-macrophage differentiation. Proc Natl Acad Sci USA. 82:292-296.
- 21.- Abbas, K. 1991. Cytokines. En: Cellular and molecular Immunology. Ed. Wonsiewicz, J. W. B. Saunders Company. Philadelphia, USA. Cap. 11: pp 225-244.
- 22.- Spangrude, G.J., Smith, L., Uchida, N., Ikuta, K., Heimfeld, S., Friedman, J. y Weissman, I.L. 1991. Mouse hematopoietic stem cell. Blood 78 (6):1395-1402.
- 23.- Norman, I. 1990. Haematopoiesis: Searching for stem cells. Nature 347 (62):126-127.
- 24.- Quesenberry, P. 1990. Hematopoietic Stem Cells, and Growth Factors. Hematology 15 (8):223-228.
- 25.- Prchal, J. T., Frieman, H., Denis, M., Nathan, C.F., Wang, M., y Zalman, L.S. 1978. A common progenitor for human myeloid and lymphoid cells. Nature 274:590-598.
- 26.- Becker, A. J., Weiden, P.L. y Peetre, C. 1980. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. Nature 197:452-460.
- 27.- Morstyn, G. y Burgess, A.W. 1988. Hemopoietic growth factors: A review. Cancer Research 48:5624-5633.
- 28.- Metcalf, D., Koyasu, S., Nicola, N.A., Byrne, P.V. y Morgan, C.J. 1982. Clonal analysis of progenitor cell commitment to granulocyte or macrophage production. J Cell Physiol 11:275-283.
- 29.- Metcalf, D. 1989. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in hemopoietic cells. Nature 339:27-30.
- 30.- Borrows, M.T. 1910. The cultivation of Tissue of the chick embryo outside the body. JAMA 55:205-215.
- 31.- Maximov, A.A. 1924. Relation of blood cells to connective tissue and endothelium. Physiol Rev 4:535-540.

- 32.- Sachs, L. 1970. In vitro control of growth and development of hematopoietic cell clones. En: Regulation of hematopoiesis. Eds. Gordon, A. Appleton-Century-Crofts, New York, USA. Cap. 10: pp 217-230.
- 33.- Bol, S., LeBeau, M., Birchenall, M. y Rettenmier, C. 1977. A technique for staining hemopoietic colonies in agar cultures. *Munksgard* 75:551-556.
- 34.- 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* 39:1133-1142.
- 35.- Pluznick, D. y Sachs, L. 1965. The cloning of normal mast cells in tissue cultures. *J Cell Comp Physiol* 66:319-323.
- 36.- Bradley, T. y Metcalf, D. 1966. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *J Exp Biol Med Sci* 44:287-299.
- 37.- Burges, A. y Metcalf, D. 1978. Purification and characterization of cell specific colony stimulating factor. En: Hematopoietic cell Differentiation. Eds. Fenichel, R. y Chiry, A. Academic Press. New York, USA. Cap. 6: pp 35-48.
- 38.- Guilbert, L. y Iscove N. 1992. The effects in vivo of GM-CSF. *Gene* 51:269-274.
- 39.- Sachs, L. 1983. Constitutive Gene Expression and the Uncoupling of controls in Leukemia. En: Regulatory Proteins that Control Growth and Differentiation in Normal and Leukemic Myeloid Cell, Normal and neoplastic Hematopoiesis. Ed. Breneman, C. Alan R Liss Inc, New York. USA. Cap. 7: pp 57-85.
- 40.- Moore, M.A. 1991. Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. *Blood* 78: 2223-2234.
- 41.- Bacigalupo, A., Podesta, M., Vant, lint M., Vimercati, R., Cirri, R., y Rossi, E. 1981. Serum Aplastic Anemia Correlation of in vitro test with clinical response to the immuno suppression in 20 Patients. *Brit Jour of Hematol* 47:423-433.
- 42.- Orly, J., Sato, G. y Erickson, G.F. 1980. Serum suppresses the expression of hormonally induced functions in cultured granulosa cells. *Cell* 20:817-827.
- 43.- Hammond, S.L. y Ham, R.G., 1984. Serum-free growth of human mammary epithelial cells: Rapid clonal growth in defined medium and extended serial passage with pituitary extract. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5435-5439.
- 44.- Gold, D.W. y Hacking, W.H. 1982. Monocytes y macrophages development. *Phagocytic Cell* 1:13-130.
- 45.- Souza, M.L., Lang, R., Wong, P., Cleveland, J. y Hume, C. 1986. Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor: Effect on normal and leukemic myeloid cells. *Science* 232: 531-535.
- 46.- Metcalf, D. 1985. Malignant transformation of a Growth Factor-dependent myeloid cell line by Abelson virus without evidence of an autocrine mechanism. *Cell* 41:677-683.
- 47.- Burgess, A.W., y Metcalf, D. 1980. The Nature and Action of Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factors. *Blood* 56 (6):947-956.

- 48.- Stanley, E.R., Guilbert, I.J., Tushinski, R.J. y Bartelmez, J. 1983. CSF-1 a mononuclear Phagocyte lineage-specific homopietic growth factor. *J Cell Biochem* 21:151-156.
- 49.- Zucker-Franklin, R. 1988. Neutrophils. En: *Atlas of Blood Cells, function and pathology*. Eds. Beutler, E. y Castoldi, G. Ermes, Milan, Italy. Cap 5: pp 159-188.
- 50.- Oppenheim, J.J. 1986. Role of the leukocytes in host defense. En: *Leukocytes and Host Defense*. Eds. Oppenheim, J. y Jacobs, M. Alan R. Liss, USA. Cap. 8: pp 347-357.
- 51.- Santini, V. 1991. Induction of Granulocytic Maturation in Acute Myeloid Leukemia by G-CSF and Retinoic Acid. *Leuk Res* 15 (5):341-350.
- 52.- Mc Niece, I., Williams, N. y Johnson P. 1992. Regulation of gene expression of GM-CSF in normal and malignant hemopoietic cells. *Blood Cells* 74:421-427.
- 53.- Das, S.K. y Stanley, E.R. 1989. Structure-function studies of a colony stimulating factor (CSF-1). *J Biol Chem* 257:136-143.
- 54.-Ralph, P. y Nakoinz, I. 1987. Stimulation of macrophage tumoricidal activity by the growth and differentiation factor CSF-1. *Cell Immunol* 105:270-278.
- 55.-Wing, E.J., Waheed, A., Shadduck, R.K., Nagle, L.S. y Sthepenson, K. 1989. Effect of colony stimulating factor on murine macrophages. Induction of anti-tumor activity. *J Clin Invest* 69:270-280.
- 56.-Nathan, C.F. 1989. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79:319-326.
- 57.- Gordon, S., Fraser, I., Nath, D., Hughes, D. y Clarke S. 1992. Macrophages in tissues and in vitro. *Current Opinion in Immunology* 4:25-32.
- 58.- Li, C.Y. 1973. Esterases in human Leukocytes. *J Histochem Cytochem* 21:1-7.
- 59.- Sun, T., Li, C.Y. y Yam, L. 1985. *Atlas of Cytochemistry and Immunochemistry of Hematologic Neoplasms*. ASCP Press, USA. Cap. 3:23-27.
- 60.- Yam, L.T. 1971. Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am J Clin Pathol* 55:283-293.
- 61.- Heyworth, M.C. y Ian, L.O. 1988. The response of haematopoietic cells to growth factors: developmental implications of synergistic interactions. *J Cell Science* 91:239-247.
- 62.- Klein, H., Sonada, Y., Messner, H., Sieff, C. y Koefler, H. 1990. Synthesis of granulocyte colony-stimulating factor and its requirement for terminal divisions in chronic myelogenous leukemia. *J Exp Med* 171: 1785-1790.
- 63.- Rauvala, T. 1983. Cell Surface Carbohydrate and cell adhesion. *TIRBS* 21:323-325.
- 64.- Zigmond, S.H. y Hirsch, J.G. 1973. Leukocyte locomotion and chemotaxis. *J Exp Med* 137:456-465.

- 65.- Mukaida, N., Shiroo, M. y Matsushima, K. 1989. Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *J Immunology* 143 (4):1366-1371.
- 66.- Piquet-Pellorce, C. 1992. Cytokines and T-cell subsets. *Eur Cytokine Netw* 3 (3):343-346.
- 67.- Roy, S., Feldmann, M. y Hawrylowicz. 1992. Upregulation of HLA class II, but not intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) by granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) or Interleukin-3 (IL-3) in synergy with dexamethasone. *Eur Cytokine Netw* 3 (4):373-380.
- 68.- Arend, W. y Malyak, M. 1992. The biologic role of naturally-occurring cytokine inhibitors. *Br J Rheumatol* 2:49-58.
- 69.- Sieff, A., Mason, D., Mufson, R. y Chantry, D. 1990. Human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: a multilineage hematopoietin. *Science* 230:1171-1173.
- 70.- Broxmeyer, H.E. y Kamen, R. 1987. Comparative effects in vivo of recombinant murine interleukin 3, natural murine colony-stimulating factor-1, and recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on myelopoiesis in mice. *J Clin Invest* 79:721-730.
- 71.- Gasson, J. 1991. Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 77:1131-1132.
- 72.- Shirafuji, N., Bayne, E., Amento, E. y Portillo, G. 1990. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Stimulates Human Mature Neutrophilic Granulocytes to Produce Interferon. *Blood* 75:17-19.
- 73.- Sherr, J.C. 1990. Regulation of mononuclear phagocyte proliferation by colony-stimulating factor-1. *Int J Cell Cloning* 8 (Suppl):46-62.
- 74.- Falk, L.A. y Vogel, S.N. 1988. Comparison of bone marrow progenitors responsive to granulocyte-macrophage colony stimulating factor and macrophage colony stimulating factor-1. *J Leuk Biol* 43:148-157.
- 75.- Jornal, C.T. y Lemischka, I.R. 1990. Clonal and systemic analysis of longterm hematopoiesis in the mouse. *Genes y Development* 4:220-232.
- 76.- Heyworth, C., Moses, H. Cornwell, R. y Taffet, S. 1990. The biochemistry and biology of the myeloid haemopoietic cell growth factors. *J Cell Sci* 12 (Suppl 13):57-66.
- 77.- Kaushansky, K. 1990. Molecular modeling of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Int J Cell Cloning* 8 (suppl 1):26-34.
- 78.- Kaushansky, K. 1987. Role of carbohydrate in the function of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Biochemistry* 26:4861-4867.
- 79.- Nicola, N., Burgess, A. y Metcalf, D. 1979. Similar molecular properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factors produced by different mouse organs in vitro and in vivo. *J Biol Chemistry* 254 (12):5290-5299.

- 80.- Heyworth, C.M., Poning, I. y Dexter, M. 1991. The response of haemopoietic cells to growth factors: developmental implications of synergistic interactions. *J Cell Science* 14:239-247.
- 81.- DeNichilo, M., Murray, P., McKenzie, D. y Swain, S. 1991. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a stimulant of platelet-activating factor and superoxide anion generation by human neutrophils. *J Biol Chem* 266:4896-4902.
- 82.-Metcalf, D., Burgess, G.R., Johnson, G.R., Nicola, N.A., Nice, E.C., DeLaMarter, J., Thatcher, D.R. y Mermod, J.J. 1986. In vitro actions on hemopoietic cells of recombinant murine GM-CSF purified after production in *Escherichia coli*: comparison with purified native GM-CSF. *J Cell Physiol* 128: 421-431.
- 83.- Lusic, A.J., Quon, D.H. y Golde, D.W. 1981. Purification and characterization of a human T-Lymphocyte-Derived Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood* 57:67-75.
- 84.- Hamilton, J. 1987. Molecular mechanism of signal transduction in macrophages. *Immunol Today* 8:151-158.
- 85.- Bussolino, F., Coffman, R., Ohara, J. y Paul, W. 1989. Granulocyte- and granulocyte macrophage colony stimulating factor induce human endothelial cells to migrate and proliferative. *Nature* 337:471-473.
- 86.-Metcalf, D., Lebman, D., Lee, F., Shrader, D. y Rousset, F. 1986. Biologic properties in vitro of a recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 67:37-45.
- 87.- Dexter, T.M., Simmons, P., Spooncer, E. y Schofield, R. 1984. The regulation of hemopoietic cell development by the stromal cell environment and diffusible regulatory molecules. *Cell Immunol* 120:291-297.
- 88.- Hogge, D.E., Cashman, J.D., Humphries, R.K. y Eaves, C.J. 1991. Differential and synergistic effects of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoiesis in human long-term marrow cultures. *Blood* 77 (3):493-499.
- 89.- Dexter, T.M., Garland, M. y Testa, N. 1990. Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor. En: *Colony-Stimulating Factors: Molecular and Cellular Biology*. Eds. Dexter, T.M., Garland, M. y Testa, N. Marcel Dekker, New York, USA. Cap. 4:111-153.
- 90.- LaBranche, C., Lieberman, A., Munker, R. y Gasson, J. 1990. Deletion of carboxy-terminal residues of murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor results in a loss of biologic activity and altered glycosylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 276:153-159.
- 91.- Habenicht, A. 1990. Hemopoietic Growth and Differentiation Factors. En: *Growth factor, Differentiation factors, and Cytokines*. Ed. Habenicht, A. Springer-Verlag, Berlin, Germany. Cap. 2:177-188.
- 92.- Hayashida, K. 1990. Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:9655-9659.

- 93.- Brizzi, M.F., Heldin, C., Basu, M. y Bertics, P. 1990. Expression and modulation of IL-3 and GM-CSF receptors in human growth factor dependent leukaemic cells. *Br J Haematol* 76:203-209.
- 94.- Crosier, KE. 1991. A functional isoform of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor has a unusual cytoplasmic domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:7744-7748.
- 95.- Kitamura, T., Brown, M., Carpenter, G., Chen, W. y Irvine, R. 1991. Reconstitution of functional receptors for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): Evidence that the protein encoded by the AIC2B cDNA is a subunit of the murine GM-CSF receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:5082-5086.
- 96.- Lopez, A.F. 1990. Human Interleukin-3 inhibits the binding of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and Interleukin-5 to basophils and strongly enhances their functional activity. *J Cell Physiol* 145:69-77.
- 97.- Hattersley, G. y Chambers, T.J. 1990. Effects of interleukin 3 and of granulocyte-macrophage and macrophage colony stimulating factors on osteoclast differentiation from mouse hemopoietic tissue. *J Cell Physiol* 142:201-209.
- 98.- Walker, F. y Burgess, W. 1987. Internalisation and recycling of the Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) receptor on a murine myelomonocytic Leukemia. *J Cell Physiol* 130:255-261.
- 99.- Edwards, S.W., Watson, F., MacLeod, R. y Davies, J. 1990. Receptor expression and oxidaseactivity in human neutrophils: regulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and dependence upon protein biosynthesis. *Bioscience Reports* 10 (4):234-240.
- 100.- Gregory, S.H., Magee, D.M. y Wing, E.J. 1991. The role of colony-stimulating factors in host defenses. *Exp Biology and Medicine* 14:349-360.
- 101.- Moore, R.N., Oppenheim, J.J., Farrar, J.J., Carter, C.S., Waheed, A. y Shadduck, R.K. 1980. Production of lymphocyte-activating factor (Interlekin 1) by macrophages activated with colony-stimulating factors. *J Immunol* 125:1302-1309.
- 102.- Warren, M.K. y Rallh, P. 1988. Macrophage-Granulocyte growth factor stimulates human monocyte production of interferon, tumor necrosis factor, and colony stimulating activity. *J Immunol* 137:2281-2290.
- 103.- Aglietta, M., Larry, C. y Lasky, M. 1990. rh-GM-CSF: Target cell and Kinetics of response. in *The role of biologics in cancer and AIDS, Congress Centrum, Hamburg*.
- 104.- Smith, C., Moore, M., Wrechner, D. y Rechavi, G. 1991. Purification and partial characterization of a human hematopoietic precursor population. *Blood* 77 (10):2122-2128.
- 105.- Muller-Sieburg, C. 1991. Separation of Pluripotent Stem Cells and early B Lymphocyte Precursors with Antibody Fall-3. *J Exp Med* 174:161-168.
- 106.- Moezzil, J., Ali-Osman, F. y Murphy, M.J. 1986. Rapid Method for permanent slide preparation of colonies in soft agar cultures. *Int J Cell Cloning* 4:368-372.

- 107.- Larsen, A., Curtis, B., Gough, N. y Davis, T. 1990. Expression cloning of a human granulocyte colony-stimulating factor; a structural mosaic of hematopoietin receptor, immunoglobulin and fibronectin domains. *J Exp Med* 172:1559-1570.
- 108.- Mendoza, F., Caceres, R., Santiago, E., Mora L., Sánchez, L., Corona, T., Machuca, C., Zambrano, R., Martinez, R., y Weiss-Steider, B. 1990. Evidence that G-CSF is a Fibroblast Growth Factor That Induces Granulocytes to Increase Phagocytosis and to present a mature Morphology, and that macrophages secrete 45-kd molecules with these activities as well as with G-CSF-like Activity. *Exp Hem* 18:903-910.
- 109.- Mora, L., Santiago, E., Montesinos, J. 1992. Evidencia de que la célula blanco del factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos es el precursor de macrófagos. *Revista Médica del Hospital General* 55 (2):41-47.
- 110.- Lord, B.I., Gurney, H., Chang, J., Thatcher, N., Crowther, D. y Dexter, T.M. 1992. Haemopoietic cell kinetics in humans treated with rhGM-CSF. *Int J Cancer* 50: 26-31.
- 111.- Herrmann, F., Schulz, G, Lindemann, A., Crosier, K.E. y Brizzi, M. 1989. Hematopoietic response in patients with advanced malignancy treated with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Clin Oncol* 7:159-167.
- 112.- Riggs, D.S. 1963. The mathematical approach to physiological problems: a critical primer. The MIT Press, Cambridge, Massachusetts.
- 113.- Spain, J.D. 1982. BASIC microcomputer models in biology. Addison-Wesley Publishing Co., London.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Benny Weiss Steider y a la M. en C. Ma. de Lourdes Mora García por su excelente asesoría, apoyo y confianza para la realización del presente trabajo.

Asimismo agradezco al M. en I.B.S.H. Alberto Monroy García, a la M. en I.B.S.H. Angélica Flores Ramírez al M. en C. Carlos Bautista Reyes, al M. en C. Salvador Hernández Aviles por la excelente revisión crítica de la tesis, y sus acertadas observaciones y útiles consejos.

De la misma forma agradezco al Dr. Guillis de Immunex, USA por la donación de rmGM-CSF y rhG-CSF utilizados en este trabajo.

Manifiesto mi más profundo agradecimiento al M. en C. Edelmiro Santiago Osorio, al M. en C. Jorge Flavio Mendoza, a la M. en C. Rosalva Rangel por sus enseñanzas y consejos durante la realización de la tesis.

Deseo expresar mi agradecimiento a todos mis compañeros del Laboratorio de Diferenciación Celular por su apoyo en la realización de esta tesis, en especial al Biólogo Miguel Angel Ramírez Romero por su valiosa colaboración y consejos.

También doy las gracias a los Srs. Ranulfo Pedraza y José Chavarria por su colaboración técnica.