

03466



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO MITOGENICO DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO HEMATOPOYETICO Y DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS PROVENIENTES DE CELULAS NORMALES Y TRANSFORMADAS EN FIBROBLASTOS Y CELULAS EPITELIALES DE RATON.

T E S I S

Que para obtener el Grado Académico

MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

p r e s e n t a

CATALINA MACHUCA RODRIGUEZ

Director de Tesis:

DR. BENNY WEISS STEIDER

México, D. F.

1993

TEMA CON  
FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**I N D I C E**

	<b>Pag.</b>
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCION</b> .....	2
<b>MARCO TEORICO</b>	
I SISTEMA HEMATOPOYETICO.....	3
II ORGANIZACION HEMATOPOYETICA.....	6
III MICROAMBIENTE HEMATOPOYETICO.....	8
IV HEMATOPOYESIS Y MEDULA OSEA.....	9
V EL CULTIVO IN VITRO DEL TEJIDO HEMATOPOYETICO.....	11
VI REGULACION DE LA HEMATOPOYESIS.....	12
VII FACTORES ESTIMULADORES DE COLONIAS.....	14
VIII RECEPTORES PARA LOS FACTORES DE CRECIMIENTO HEMATOPOYETICO.....	17
IX EFECTOS DE LOS FACTORES ESTIMULADORES DE COLONIAS SOBRE CELULAS MIELOIDES.....	22
X MACROFAGOS.....	28
XI CITOCINAS.....	29
XII INTERLEUCINA DOS.....	31
XIII FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS.....	33
XIV LAS CITOCINAS Y LA ENFERMEDAD.....	35
XV UNIONES INTERCELULARES.....	37
XVI CITOQUERATINAS.....	39
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	40
<b>HIPOTESIS</b> .....	41
<b>OBJETIVOS</b> .....	42
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	43
<b>RESULTADOS</b> .....	51
<b>DISCUSION</b> .....	85
<b>CONCLUSIONES</b> .....	90
<b>REFERENCIAS</b> .....	91
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	106

**SIMBOLOGIA UTILIZADA PARA LA ELABORACION DE CUADROS, TABLAS  
Y ANALISIS ESTADISTICOS**

---

<u>NOMBRE DEL INDUCTOR</u>	<u>SIMBOLO</u>
0 % DE SUERO FETAL BOVINO	NEG 1
5 % DE SUERO FETAL BOVINO	5%SF 2
10 % DE SUERO FETAL BOVINO	10%SF 3
PDGF, FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS	PDGF 4
IL-2, INTERLEUCINA DOS	IL-2 5
G-CSF, FACTOR ESTIMULANTE DE GRANULOCITOS	G-CSF 6
IL-3, INTERLEUCINA TRES	IL-3 7
M-CSF, FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS MACROFAGAS	M-CSF 8
GM-CSF, FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS GRANULOCITICAS Y MACROFAGAS	GM-CSF 9

---

**RESUMEN**

La producción de células sanguíneas se lleva a cabo en la médula ósea mediante el proceso de hematopoyesis cuya regulación está coordinada por una compleja red celular y molecular en la que participan elementos básicos como son las células madre hematopoyéticas, los factores estimuladores de colonias (CSF's) y el microambiente hematopoyético. Aunque se han desarrollado gran cantidad de estudios acerca del papel que las células estromales juegan en el proceso hematopoyético mediante la liberación de glicoproteínas responsables del control de la proliferación y diferenciación de células mieloides, poco se sabe acerca de la influencia que las células hematopoyéticas pudieran tener en el sistema estromal. En este estudio se presentan evidencias de la actividad proliferadora que los CSF's ejercen sobre fibroblastos y células epiteliales.

Los resultados obtenidos demuestran que los medios condicionados por células macrofágicas residentes normales y transformadas, así como el producido por el carcinoma de vejiga humana 5637 ejercen un efecto mitogénico en fibroblastos y células epiteliales, no obstante el producido por macrófagos inducidos sólo estimula la proliferación de epitelio.

Se demuestra también que los CSF's recombinantes ejercen una actividad proliferante diferente sobre epitelios y fibroblastos, ya que resulta positiva para GM-CSF y M-CSF en ambos tipos celulares, mientras que G-CSF sólo lo es para fibroblastos y el efecto ejercido por IL-3 fué moderadamente positivo únicamente en fibroblastos.

Finalmente, se discute un posible mecanismo de regulación hematopoyética en el cual, las células estromales además de proporcionar el soporte en el que las células tallo se desarrollan y producir citocinas encargadas de regular la producción sanguínea, también son capaces de responder autócrinamente a estas glicoproteínas, asegurando así la producción de novo de estos factores, así como un microambiente hematopoyético adecuado.

**INTRODUCCION**

Las células sanguíneas presentan como característica importante un alto grado de recambio celular. En el hombre adulto normal se producen entre  $140$  y  $150 \times 10^6$  en promedio de células rojas y blancas por minuto respectivamente (1). Estas células son producidas en la médula ósea y provienen de la proliferación y maduración de un grupo celular denominado tallo o pluripotencial, el cual tiene las particularidades de autorenovación y diferenciación.

Los eventos de autorenovación y proliferación de granulocitos y macrófagos son regulados por el contacto entre células del estroma de médula ósea, células madre hematopoyéticas y las citocinas denominadas factores estimulantes de colonias (CSF's) por su capacidad de inducir la formación de colonias en cultivos *in vitro* de la médula ósea (1).

Estos factores son conocidos como Interleucina 3 (IL-3), Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF), Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (G-CSF), y Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos (M-CSF).

De los cuatro factores, IL-3 tiene la propiedad de participar en la producción de otro tipo de células aparte de las mieloides como pueden ser eosinófilos, células cebadas, células eritroides y megacariocitos. GM-CSF está comprometido a la generación de granulocitos y macrófagos; mientras que G-CSF y M-CSF lo están para granulocitos y macrófagos respectivamente.

Recientemente se ha encontrado que la influencia de algunos CSF's no se restringe a células mieloides, sino que al parecer ejercen un efecto proliferante sobre células estromales (2,3).

Asimismo, considerando que en el desarrollo de las células hematopoyéticas el sistema estromal desempeña un papel fundamental al proporcionar el soporte en el que las células tallo se enlazan por medio de receptores específicos (4,5) y debido a que los CSF's son secretados por este sistema (6), el presente trabajo se enfoca a determinar si los CSF's además de cumplir con su función hematopoyética de producción de células del linaje mieloides también pueden estar involucrados en funciones de tipo regulador en el tejido estromal.

MARCO TEORICO
---------------

## I. EL SISTEMA HEMATOPOYETICO

La mayoría de las células sanguíneas maduras están destinadas a vivir sólo pocas horas (granulocitos) o semanas (eritrocitos) antes de ser capturadas y destruidas (7).

Esto significa que en un día alrededor de  $10^{13}$  células mieloides deben producirse para reemplazar a las que mueren. Este proceso de generación se conoce como hematopoyesis (8) y se manifiesta primeramente en el saco vitelino alrededor de la tercera o cuarta semana de gestación (9), acompañándose de una diferenciación de células mesoblásticas en células progenitoras hematopoyéticas que dan origen a sintetizadores de hemoglobinas embrionarias denominados eritroblastos primitivos.

Posteriormente, ya desarrollado el embrión (mitad del tercer mes de gestación), en el hígado fetal se observa diferenciación de células mesenquimáticas en células progenitoras hematopoyéticas y migración celular hematopoyética desde el saco vitelino hacia éste; la hematopoyesis hepática alcanza su nivel máximo, alrededor del tercer mes de gestación, permanece así hasta el séptimo mes en que gradualmente disminuye su nivel hasta el nacimiento. Esta fase hepática se caracteriza por la generación de todas las células sanguíneas, incluyendo eritrocitos (eritropoyesis), leucocitos (leucopoyesis), trombocitos (trombopoyesis) y puede intensificarse por contribuciones de médula ósea y bazo; éste último es más activo en la producción de linfocitos y su periodo de actividad es del tercero al sexto mes de gestación. La médula ósea comienza su actividad hematopoyética en el quinto mes de gestación y alcanza su máximo nivel en el nacimiento, momento en que comienza a ser el sitio exclusivo de producción de células sanguíneas durante la vida adulta.

En la médula ósea se reconocen células sanguíneas en varias etapas de desarrollo, así como células más primitivas actuando como precursores para los distintos linajes celulares maduros. Todos estos precursores son derivados de una célula común denominada célula progenitora pluripotencial (10).

Las células progenitoras comprenden entre el 0.01 y 0.05% del total de la población celular de la médula y poseen dos características que las distinguen de otras células hematopoyéticas: su capacidad para proliferar y producir más células progenitoras (proceso denominado autorenovación) y su potencial para llevar a cabo la diferenciación, generando al menos nueve tipos celulares maduros altamente especializados entre los que se encuentran neutrófilos, eritrocitos, eosinófilos, basófilos, plaquetas, monocitos/macrófagos, osteoclastos y linfocitos T y B.

En este proceso las células progenitoras pluripotenciales originan más células restringidas al desarrollo, tales como las células formadoras de colonias mixtas multipotentes (CFC-Mix) que pueden proliferar, diferenciarse y convertirse

en células maduras de los varios linajes celulares mieloides, pero no en linfocitos T y B; o bien las células progenitoras tripotenciales tales como las células formadoras de colonias granulocito-macrófagas (GM-CFC) quienes pueden originar neutrófilos, macrófagos y osteoclastos; así como una variedad de células progenitoras unipotenciales que pueden proliferar y convertirse en células maduras de un sólo linaje (Figura 1)(7). Esta restricción progresiva en el desarrollo potencial también asegura una gran amplificación en el número celular.

Para propósitos prácticos las células progenitoras son consideradas inmortales (11) e importantes en el sistema hematopoyético por ser responsables de la regeneración hematopoyética, después de un trasplante de médula ósea o algún daño al sistema hematopoyético causado por radiación accidental o tratamiento con agentes quimioterapéuticos para enfermedades malignas (12). Si las células progenitoras estuvieran ausentes se observaría una muerte rápida, consecuencia de una pancitopenia, además, algún defecto en estos precursores en el desarrollo de un linaje anormal conduciría a una variedad de síndromes linfomielodisplásicos.



ESTRUCTURA DEL SISTEMA HEMATOPOYETICO

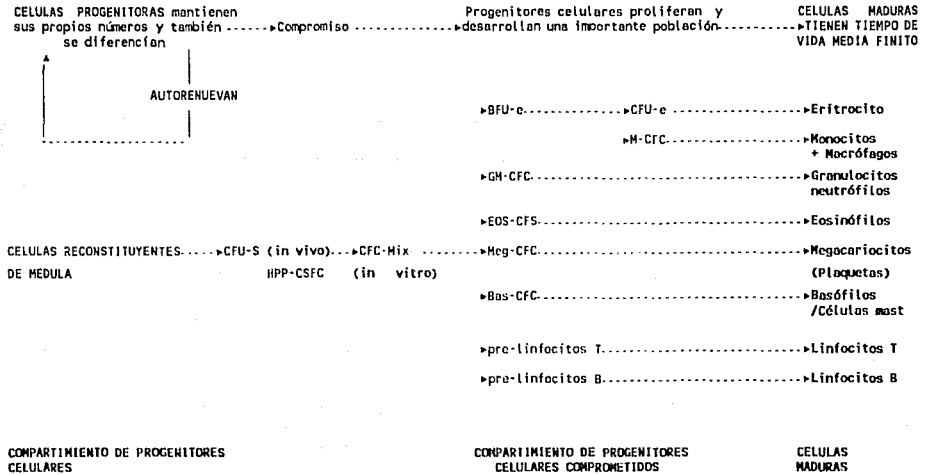


FIGURA. 1 En el compartimento de progenitores celulares se encuentran [FU-S (Unidad Formadora de Colonias del Bazo), HPP-CFC (Células formadoras de colonias con Potencial Proliferador alto), y CFC-Mix (Células Formadoras de Colonias Mixtas). Dentro de los progenitores celulares comprometidos se encuentran las BFU-e (Unidad Formadora Eritroide), CFU-e (Unidad Formadora de Colonias Eritroides), GM-CFC (Células Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos), M-CFC (Células Formadoras de Colonias Macrófagos), Eos-CFC (Células Formadoras de Colonias de Eosinófilos), Meg-CFC (Células Formadoras de Colonias de Megacariocitos) y Bas-CFC (Células Formadoras de Colonias de Basófilos (Tomado de T.M. DEXTER, C. M. HEYWORTH, 1990). Ref. # 7

## II. ORGANIZACION HEMATOPOYETICA

### ESTRUCTURA Y FUNCION DE LA MEDULA OSEA

La médula ósea representa uno de los tejidos más grandes y altamente vascularizados e inervados en el organismo. Se localiza dentro de las cavidades de los huesos (hueso cortical denso), donde aproximadamente 85% de la cavidad es ocupada por la médula y el 15% restante por los huesos medulares (huesos trabeculares) (13).

Estructuralmente la médula se divide en dos compartimientos, uno extravascular que contiene elementos celulares del parénquima y es considerado el sitio donde se lleva a cabo la hematopoyesis; el otro, un compartimiento intravascular que consiste principalmente de vasos sanguíneos de pared delgada (senos venosos) (14) donde los elementos celulares presentes son células estromales (fibroblastos, células reticulares, células endoteliales y adipocitos).

La sangre arterial cruza a través de la médula ósea por medio de una arteria que penetra hacia la luz del hueso y por la vía de la red capilar periosteal que drena hacia el seno venoso central a través de un basamento membranal fenestrado, cubierto en su lado interno por una capa de células endoteliales y externamente por células reticulares (fibroblastoides) que extienden su citoplasma en el espacio perivascular, creando una rejilla sobre la cual células hematopoyéticas se encuentran en cordones o entremetidas en los senos.

La médula ósea está desprovista de vasos linfáticos pero es rica en abastecimientos nerviosos. Estas fibras nerviosas acompañan a los vasos sanguíneos y parecen responder a presiones intramedulares resultantes de la proliferación celular por transmisión de señales a las paredes de los vasos sanguíneos, los cuales a su vez pueden ajustar el flujo sanguíneo y la liberación celular a la circulación en función de la magnitud de la proliferación celular.

Funcionalmente la médula ósea juega dos papeles preponderantes, como tejido hematopoyético primario y como órgano reticuloendotelial principal. Así, en el proceso de producción de células sanguíneas la médula ósea en adultos normales diariamente fabrica y libera a la circulación aproximadamente  $2.5 \times 10^9$  de células rojas,  $1 \times 10^9$  de granulocitos y  $2.5 \times 10^9$  de plaquetas por kilogramo de peso corporal (15).

La función reticuloendotelial de la médula ósea involucra el procesamiento de antígenos, reacciones celulares inmunes, síntesis de anticuerpos, reconocimiento y eliminación de células anormales o en senectud.

La eficiencia funcional de la médula ósea disminuye conforme aumenta la edad, es decir, un individuo al nacer presenta todas las cavidades óseas llenas

de células hematopoyéticas (médula roja), pero al transcurrir la edad gradualmente es desplazada por tejido adiposo (médula amarilla); ésto se lleva a cabo principalmente en las cavidades de los huesos periféricos. En la adolescencia la médula hematopoyética se encuentra únicamente en cavidades de los huesos localizados centralmente, tales como el esternón, vértebras, costillas, clavículas, escápula, cráneo, pélvis y terminales proximales de fémur y húmero.

A través de la vida sigue observándose disminución en la masa de médula roja, en el volumen de huesos trabeculares y en el número de elementos celulares asociados a éstos (osteocitos, células endosteales y vasos paratrabeculares).

De lo anterior se establece que en la médula ósea deben existir proporciones normales tanto de células hematopoyéticas como células de tejido adiposo (adipocitos), de no ser así, se presentarían problemas tanto de hipocelularidad como de hipercelularidad.

### III. MICROAMBIENTE HEMATOPOYETICO (MH)

La hematopoyesis ocurre en sitios de la médula ósea donde existe un microambiente especial confinado a un tejido intersticial (estroma) y delimitado por una trama de tejido vascular con abundantes elementos reticulares (16).

Las células del estroma, los factores locales de crecimiento y regulación así como diferentes componentes de matriz extracelular (ME) configuran el MH que sirve de "nicho" a la célula madre hematopoyética, modulando su entrada al ciclo celular desde Go y su diferenciación.

Entre las células que constituyen el estroma hematopoyético *in vivo* se encuentran los fibroblastos, adipocitos, monocitos-macrófagos, células reticulares (17), endoteliales, osteoblastos, osteoclastos y células mast (18). La participación de estos elementos estromales en la hematopoyesis no es clara, sin embargo se ha propuesto que los adipocitos intervienen en algunas etapas tardías de la granulopoyesis y que los fibroblastos favorecen la maduración de progenitores tempranos de la eritropoyesis y granulopoyesis a través de interacciones celulares o por la liberación de factores de crecimiento (19).

Las células estromales de médula ósea además de producir factores de crecimiento, secretan componentes de la matriz extracelular (colágena tipo I, III, IV y V), proteoglicanos, laminina y fibronectina; estos elementos intervienen activamente en el proceso hematopoyético, ya que la célula madre hematopoyética se aloja en un espacio preciso del MH.

El MH ha sido implicado en enfermedades hematológicas como anemias aplásicas y leucemia linfoblástica aguda (LLA), donde los fibroblastos leucémicos presentan un número menor de receptores para glicocorticoides comparado con células normales (20). También se ha observado que la tasa de síntesis de triglicéridos no cambia, implicando que la generación de adipocitos no se efectúe. Los componentes de matriz extracelular de médula ósea leucémica se encuentran alterados, observándose una disminución en la síntesis de fibronectina por parte de los fibroblastos, consecuentemente en el espacio hematopoyético las características de adhesión celular se modifican.

#### IV. HEMATOPOYESIS Y MEDULA OSEA

La médula ósea está involucrada en la generación de células maduras accesorias que se encargan de la respuesta inmune no específica (21,22), así como de la producción de varios tipos de linfocitos T y B (23,24) asociados con la dinámica del sistema inmune específico. Las células accesorias incluyen aquellas especializadas presentadoras de antígenos como son macrófagos (22), células dendríticas (25), células intratímicas (26), células de Langerhans entre otras (27,28); y las células efectoras asociadas con la defensa inmunológica como los neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos (21,22), células cebadas (29,30) y células NK (31,32). El funcionamiento de estos sistemas celulares es controlado por sustancias liberadas al medio por las mismas células. En particular es importante hacer notar que los productos secretados por linfocitos, entre los que se encuentran las citocinas y las inmunoglobulinas, pueden regular las actividades de la mayoría de células de médula ósea. Las citocinas derivadas de los linfocitos T además de la regulación antes mencionada cumplen con la inducción a la proliferación de células hematopoyéticas de la médula ósea (33). Aún cuando se conoce cada vez más sobre cual tipo de célula fabrica y secreta que tipo de citocina, el mecanismo que controla su producción aún permanece sin esclarecerse.

Existen otros factores que regulan la hematopoyesis y son liberados por células extramedulares, como las formadoras del estroma, por ejemplo fibroblastos y células endoteliales. Las células madre y las progenitoras en la médula ósea no sólo están sometidas al efecto de factores de regulación secretados por las propias células hematopoyéticas, sino también por las células estromales que las rodean. En realidad los islotes de proliferación hematopoyética ocupan nichos que contienen diversos tipos de células sanguíneas, aparte de estar rodeadas por células endoteliales y fibroblásticas. El mecanismo por el cual se lleva a cabo la coordinación de este proceso no es claro, pero basta con la ocupación de los factores en tan sólo un 10% de los receptores celulares para que el factor de crecimiento ejerza su efecto.

La generación de células de la sangre representa el resultado integrado de innumerables microambientes con redes de interacción aleatoria entre las células del estroma y las células hematopoyéticas (34).

La producción de células inmunológicamente competentes en la médula ósea representa un proceso importante para tratar de explicar los mecanismos de defensa del organismo contra agentes extraños. Es justamente en este órgano donde se crean las células maduras que participan en los mecanismos de defensa del sistema inmune no específico, como los macrófagos y los granulocitos.

Estas células además de participar en mecanismos de defensa no específica como son fagocitosis y secreción de lisozimas, desempeñan también un papel en el sistema inmune específico al funcionar como células accesorias, presentadoras y procesadoras de antígenos, así como en la fabricación de citocinas importantes (Interleucina-1, IL-1). Finalmente mencionaré que es en la médula ósea donde se generan los precursores de todos los linfocitos.

Mucho de lo que se sabe acerca de la hematopoyesis, se ha aprendido a partir de experimentos *in vitro*. Debido a que las células hematopoyéticas de la médula ósea pueden dispersarse en suspensiones de células individuales por medios mecánicos simples, es posible estudiar el crecimiento y la diferenciación incluyendo la progenie de una sola célula *in vitro*.

## V. EL CULTIVO *in vitro* DEL TEJIDO HEMATOPOYETICO

Por la facilidad para obtener sangre periférica, las células sanguíneas han sido ampliamente utilizadas en Hematología Experimental. Mediante el desarrollo del cultivo *in vitro* de los tejidos hematopoyético y linfoide, se ha logrado tener un método útil para determinar los mecanismos mediante los cuales las células pueden intervenir en su propia histogénesis. Estos tejidos son cultivados utilizando factores de crecimiento externos encargados de garantizar su viabilidad y proliferación. Las células hematopoyéticas necesitan de este tipo de impulso mitótico exógeno, pues no conservan su capacidad de proliferar *in vitro* en ausencia de factores de crecimiento como lo hacen fibroblastos y células epiteliales. Gracias al desarrollo de estas técnicas, desde hace tres décadas (35,36) se ha logrado un mejor entendimiento de los mecanismos que regulan la diferenciación y proliferación de células sanguíneas normales.

Una de las ventajas que aporta esta técnica es permitir el estudio de tipos celulares individuales y determinar sus características fisiológicas, así como las relaciones que se establecen entre los diferentes tipos celulares, ya que de esta manera es posible conocer el papel regulador que unas células tienen sobre otras.

## VI. REGULACION DE LA HEMATOPOYESIS

La mielopoyesis *in vivo* e *in vitro* es regulada por un sistema integrador complejo de moléculas bioreguladoras y células que secretan y responden a estas moléculas (37).

Se ha sugerido que la regulación de la producción de células sanguíneas es función única de moléculas estimulantes, de tal manera que la retroalimentación de una respuesta proliferadora se debe esencialmente a una baja regulación en el receptor de la molécula estimulante o a la desaparición de la misma; también se ha demostrado el papel que juegan las moléculas directa o indirectamente en actividades supresivas, así como su capacidad para desencadenar la liberación de moléculas supresoras; sugiriéndose con esto, que la fabricación sanguínea establece una interacción entre estimulación y supresión molecular. Sin embargo se ha evidenciado que una molécula puede tener tanto capacidad supresora como estimuladora a la vez, dependiendo de la concentración en que se encuentre y del tipo celular con que tenga contacto.

Así la regulación proteica del proceso, en el cual seis tipos de células sanguíneas maduras (neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos y basófilos) son continuamente producidas por progenitores celulares de la médula ósea, se clasifica en dos grupos: los estimuladores (factores estimuladores de colonias, CSF's) y los inhibidores hematopoyéticos (38,39).

Dentro de los reguladores negativos de la hematopoyesis (40) se encuentran las prostaglandinas, isoferitina ácida, lactoferrina, transferrina, los interferones  $\gamma$ ,  $\beta$  y  $\alpha$ , así como los factores de necrosis tumoral (TNF's).

Las prostaglandinas representan una gran familia de compuestos estructuralmente similares con funciones diferentes (41). Las del tipo E particularmente la PGE-2 es producida por monocitos y macrófagos (42). En altas concentraciones ellas pueden suprimir la formación *in vitro* de colonias de granulocitos, granulocito-macrófagos y progenitores macrófágicos, pero en concentraciones más fisiológicas sus efectos supresores son más selectivos para el linaje monocito-macrófago (43).

Las ferritinas son proteínas enlazadas a metales con 34 subunidades, las cuales existen como isotipos de proporciones variables de subunidades pesadas y ligeras, cuyos pesos moleculares son de aproximadamente 21 y 19 kD respectivamente.

Las isoferritinas ácidas (AIF) están compuestas en gran proporción de subunidades de pesadas a ligeras; las isoferritinas básicas se componen de una gran proporción de subunidades de ligeras a pesadas (44). AIF suprime la formación de colonias *in vitro* de progenitores mieloides (CFU-gm, CFU-e, CFU-gemm) de donadores normales (45), pero no de pacientes o ratones con leucemia (46).

Las lactoferrinas (LF) son glicoproteínas unidas a metales, sintetizadas por neutrófilos inmaduros (47) y se localizan en granulos secundarios de estas células (48).



Monocitos y macrófagos presentan receptores específicos para LF quien a su vez, interviene en la regulación de la mielopoyesis mediada por estos tipos celulares (49), causando la disminución de la tasa de producción/liberación de GM-CSF de monocitos/macrófagos y de otras citocinas (IL-1), también esta disminución causa efectos sobre la activación de otras células como linfocitos T, fibroblastos y células endoteliales (50).

LF administrada exógenamente muestra efecto mielosupresor en ratones como resultado de una disminución de las CFU-gm, BFU-e y CFU-gemm del bazo y médula ósea (51).

Los efectos supresores de LF in vivo pueden ser contrarrestados por la administración de citocinas purificadas como IL-3, GM-CSF o CSF-1 (52).

Las transferrinas (TF) son glicoproteínas unidas a metales (53), que administradas a ratones in vivo ejercen actividad supresora en la hematopoyesis (51). TF intensifica la liberación de GM-CSF de poblaciones celulares adherentes de médula ósea humana y de células sanguíneas in vitro (54).

Los interferones (INF's) son una familia de glicoproteínas inducibles, producidas por células en respuesta a una infección causada por virus u otros estímulos.

Los INF's inicialmente se definieron por su actividad antivírica y posteriormente por sus efectos antiproliferadores. In vitro inhiben la formación de colonias de células progenitoras hematopoyéticas humanas y de ratón.

In vivo tanto el interferón  $\alpha$  como  $\gamma$  pueden sinergizar para suprimir la formación de colonias de CFU-gemm, BFU-e y CFU-gm (55). Además INF  $\gamma$  puede inducir la liberación de factores estimuladores de colonias de células monocíticas (56) y linfocitos T (57); suprimir la liberación de prostaglandinas (E2) e inducir la síntesis de IL-1 en monocitos.

Los INF's  $\alpha$  y  $\beta$  inhiben la endocitosis mediada por el receptor del CSF-1 en macrófagos peritoneales de ratón (58).

Los INF's han sido utilizados para entender el por qué una molécula puede tener más de una acción responsable, por ejemplo, INF's en bajas concentraciones provocan la liberación de factores de crecimiento, estimulan los antígenos clase II del complejo mayor de histocompatibilidad y estimulan la respuesta celular a factores necesarios para inhibir la proliferación de células progenitoras (59).

El factor de necrosis tumoral (TNF) fué encontrado por primera vez en el suero de ratones inyectados con bacilos Calmette Guérin (59), y parece ser producido por células NK y macrófagos (60, 61). Es causante de necrosis y regresión de algunos tumores en ratones y tiene efecto estimulante sobre algunas líneas celulares tumorales (62).

TNF  $\alpha$  inhibe la formación de colonias de CFU-gemm (60) y sinergiza con INF  $\gamma$ , inhibiendo la formación de progenitores hematopoyéticos in vitro, este sinergismo se relaciona con el hecho de que INF  $\gamma$  induce o aumenta los receptores celulares para TNF (63).

## VII. LOS FACTORES ESTIMULADORES DE COLONIAS (CSF's)

Actualmente se considera que el control de la proliferación, sobrevivencia y diferenciación de células hematopoyéticas reside en un grupo de factores de crecimiento, denominados Factores Estimuladores de Colonias (CSF's) (64) (Fig. 1).

El estudio de estos factores se inicia de manera independiente en la década de los 60's con investigaciones del grupo Israelí de Sachs (35) y otro Australiano de Metcalf (36). Ambos crearon dos escuelas de pensamiento referentes a la forma en que normalmente se regula la proliferación y diferenciación de las células sanguíneas en el organismo.

Una escuela propone que los factores estimuladores se dividen en dos familias. En la primera se incluyen factores encargados exclusivamente de la proliferación celular de progenitores del linaje macrófago-granulocito; en la otra familia están exclusivamente factores responsables de la diferenciación hacia células mielo-monocíticas. A los factores proliferantes se les denomina inductor de macrófagos y granulocitos 1 (MGI-1) y a los diferenciadores MGI-2. Se propone que MGI-1 induce a su célula blanco a proliferar y producir MGI-2, el cual se encargará de la diferenciación de dicha célula (65,66,67).

La escuela Australiana considera la existencia de 4 diferentes factores de crecimiento llamados estimuladores de colonias, que actúan en diferentes estadios del desarrollo mielopoyético. Así se tiene a Interleucina 3 (IL-3) o factor estimulador de colonias multipotencial, actuando en estadios iniciales del desarrollo; otro es el Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF) el cual promueve la proliferación de colonias de estos tipos celulares y finalmente dos factores terminales G-CSF y M-CSF, dependiendo si se originan granulocitos o macrófagos.

Estos inductores y la Eritropoyetina (Epo) son los principales reguladores de la formación y función de granulocitos, macrófagos y eritrocitos (68). Recientemente se ha descubierto otro factor, conocido como SCF (Factor de células progenitoras) o factor de crecimiento de células mast, que es ligando para el receptor c-kit y actúa principalmente sobre células progenitoras mieloides (69).

Los CSF's están presentes en el suero sanguíneo y pueden ser obtenidos de medios condicionados provenientes de varios tipos celulares proliferando *in vitro* (70). Son glicoproteínas monoméricas cuyos pesos moleculares oscilan entre los 20 y 70 kD, dependiendo de las células que los producen y su grado de glicosilación (71,72). M-CSF es la única molécula dimerica de aproximadamente 14.5 kD (Tabla 1).

Los factores de crecimiento hematopoyético inicialmente se describen por su capacidad para estimular predominantemente células progenitoras inmaduras y modular la activación, función y sobrevivencia de células sanguíneas maduras del linaje mielomonocítico. Sin embargo, en los últimos años se ha evaluado su actividad biológica bajo diversas condiciones, presentando un espectro de acción más amplio (73,74), entre las que destacan su capacidad para incidir en otros tipos celulares como las células T, macrófagos, fibroblastos y células endoteliales a producir citocinas secundarias en respuesta a un estímulo

TABLA 1. PESOS MOLECULARES DE DISTINTOS CSF's EN VARIAS FUENTES

C O M P O N E N T E		PESO MOLECULAR
		(Daltones)
ORINA	HUMANA.	45,000
PULMON DE	RATON.	23,000
FIBROBLASTO DE	RATON.	
CELULAS - L.		70,000
RIÑON DE	RATON.	80,000
MEDULA OSEA DE	RATON.	73,000
SUERO DE RATON ESTI-	MULADO CON ENDOTOXINA.	42,000 - 28,000
PLACENTA	HUMANA.	23,000
MACROFAGOS PERITONEALES.		41,000
LEUCOCITOS DE RATON	ESTIMULADOS CON	
	MITOGENOS.	23,000
MUSCULO DE	RATON.	23,000
HUESO DE	"	23,000
GLANDULA DE	SALIVAL	
	RATON.	23,000
CEREBRO DE	RATON.	23,000
TIMO DE	"	23,000
BAZO DE	"	23,000
CORAZON DE	"	23,000

[ Tomada de Metcalf D, 1981]. Ref. # 70

inflamatorio o antigénico. Así mismo tanto *G-CSF* como *GM-CSF* inducen la migración y proliferación de células endoteliales humanas (75,76), e *IL-3*, *GM-CSF* y *G-CSF* promueven la formación de colonias en líneas celulares malignas (77).

Los efectos de estos factores sobre el compartimiento hematopoyético se realizan mediante su unión a receptores específicos localizados en la membrana celular de las células blanco (78,79); así para células del linaje mielóide se encuentran alrededor de 500 a 50 000 receptores por célula (Tabla 2)(80), esta unión conduce a una rápida internalización y degradación (81), desencadenando una serie de respuestas celulares que contribuyen a mantener la viabilidad celular y su progresión a través del ciclo celular.

Los mecanismos moleculares involucrados al efectuarse el acoplamiento entre células hematopoyéticas y los *CSF's* no se conocen con precisión. Se ha sugerido por ejemplo, que *IL-3* mantiene elevadas concentraciones de ATP por su efecto sobre la glicólisis (82).

Se ha observado la translocación de la proteína cinasa C (*PKC*) del citosol a la membrana celular, al estimular con *IL-3* el crecimiento celular dependiente de este factor (83). Sin embargo el mecanismo de activación de la *PKC* no se lleva a cabo vía hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato; por lo que se postula que el diacilglicerol puede ser generado por catabolismo de fosfatidil colina (84).

En células activadas con *IL-3* se ha reportado la fosforilación de treoninas en proteínas de 68, 33 y 20 kD (85); una fosforilación de serinas de una proteína de 68 kD ha sido detectada seguida del tratamiento con *IL-3* o *GM-CSF* (86). También *IL-3* promueve la fosforilación de serina en una proteína de membrana nuclear de 100 kD (87).

La fosforilación de proteínas se considera como un mecanismo de regulación del crecimiento, sobrevivencia y progreso a través del ciclo celular de progenitores celulares mieloides, en respuesta a factores de crecimiento con receptores de la familia tirosina-cinasas (*RTK*) (88, 89).

Se ha sugerido que una señal molecular común asociada a proliferación celular dada por los *CSF's*, es la activación del sistema antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que conduce a un incremento del pH intracelular y subsecuentemente a la síntesis de DNA (90).

TABLA 2. CARACTERISTICAS DE LOS RECEPTORES DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO HEMATOPOYETICOS

	PROMEDIO DEL NUMERO DE RECEPTORES POR CELULA	KD (pM)		REGULADO A LA BAJA POR	LOCALIZACION CROMOSOMICA
		ALTA AFINIDAD	BAJA AFINIDAD		
GM-CSF	50 - 1000	20 - 100	700 - 1200	IL-3, GM-CSF, TPA, FMLP	REGION X-Y PSEUDOAUTOSOMICA
IL-3	10 - 3000	50 - 200	600 - 1000	IL-3	-----
G-CSF	300 - 2000	100 - 500	-----	IL-3, GM-CSF, FMLP, TPA, LPS	-----
EPO	13 - 4000	40 - 130	290 - 700	*IL-3, *EPO,	19P
CSF-1	4600 - 50000	40 - *400	-----	*IL-3, *GM-CSF, *CSF-1, *TPA, *LPS	5q33.1
C-KIT	-----	-----	-----	-----	4q11.21
					4q31.34

\* = DATOS RELACIONADOS CON CELULAS DE RATON.

TPA = 12-O-TETRADECANOIL-FORBOL-13 ACETATO.

FMLP = F MET-LEU-FENIL

LPS = LIPOPOLISACARIDO

### VIII. RECEPTORES PARA LOS FACTORES DE CRECIMIENTO HEMATOPOYETICO

---

A partir del desarrollo de técnicas de clonación molecular, y de las semejanzas observadas en sus dominios de enlace y la vía que conduce a la fosforilación proteica, los receptores para CSF's se agrupan en dos familias. La primera denominada superfamilia de los factores de crecimiento hematopoyético (HRS) (91,92) y la segunda, de los receptores tirosina-cinasa (93)(Fig. 2).

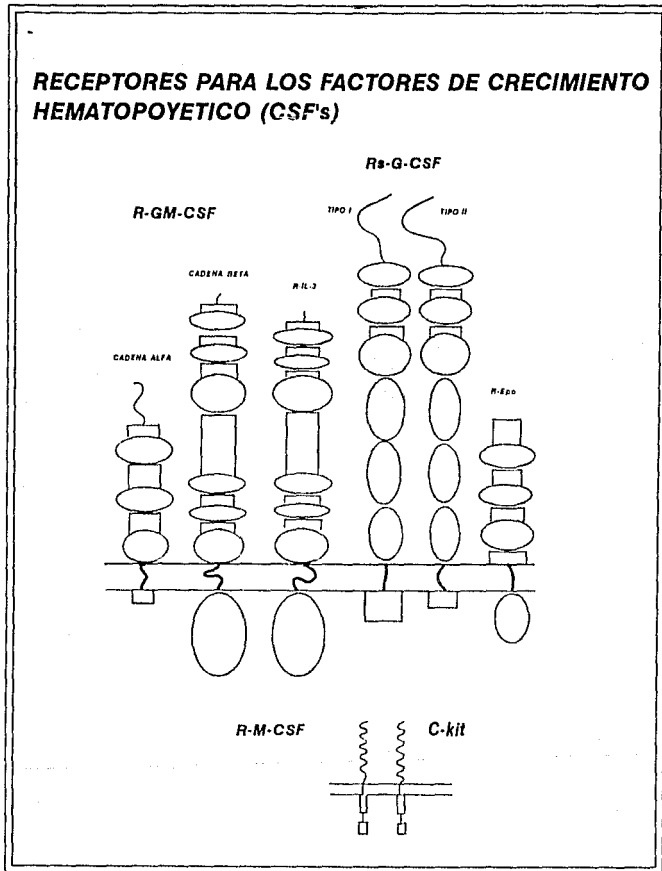
Dentro de la familia HRS se incluye a las citocinas 2 (cadena  $\beta$ ), 3,4,6 y 7, GM-CSF, G-CSF, Eritropoyetina (Epo), así como a los receptores para la hormona de crecimiento (GRH) y prolactina (PRL) (94). Las características principales que comparten los miembros de esta superfamilia son: baja expresión, presencia de subunidades múltiples y la existencia de proteínas de enlace de alta y baja afinidad, así como una homología en la región extracelular amino terminal, la cual tiene una extensión aproximada de 210 aminoácidos (aa), caracterizándose dos pares de cisteínas, algunos triptófanos y la secuencia Ser-Try-X-Ser-Try (siendo X un aa no conservado) en la porción C-terminal (95,96,97). El dominio intracelular varía en tamaño, presentándose desde los muy cortos como en GM-CSF (54 aa) hasta los muy largos en IL-4 (568 aa) (98) (Figura 2). A excepción del receptor para G-CSF (G-CSF-R) (99), los dominios citoplásmicos de la HRS no contienen sitios potenciales de fosforilación para las PKC, considerándose que los segmentos intracelulares no tienen función catalítica y sólo sirven como superficies de contacto para enzimas celulares o moléculas mensajeras que amplifiquen o redirijan la señal del enlace.

Ha sido determinada la localización génica para algunos de los receptores pertenecientes a esta superfamilia, así como para la mayoría de los CSF's y ciertas interleucinas (100,101). Cabe destacar que la mayoría de los CSF's, a excepción del G-CSF que se encuentra en el cromosoma 17, se localizan en el cromosoma 5 junto con los genes para IL-4, IL-5, SCF, receptor para el N-CSF y PDGF (102,103).

GM-CSF presenta receptores de alta y baja afinidad, aún cuando su expresión depende del tipo celular, por ejemplo en granulocitos y monocitos humanos, el factor se une al receptor de baja afinidad (104,105), mientras que en líneas no hematopoyéticas se puede unir a ambos tipos (106). Los mecanismos por los cuales se da la expresión diferencial en estos receptores no se conocen, aún cuando se ha determinado que ambas formas son funcionales (107).

El receptor para GM-CSF es un polipéptido de 400 aa, con dominio transmembranal de 27 aa, dominio extracelular glicosilado y una porción intracitoplásmica de 54 aa (Fig 2). Su peso molecular oscila entre 45 y 80 kD, dependiendo del número de carbohidratos unidos a los sitios de N-glicosilación en el dominio extracelular.

La internalización del complejo ligando receptor, modula la respuesta de las células blanco al GM-CSF (108), este mecanismo asegura que las células se mantengan refractarias a la reestimulación por el ligando, hasta que nuevos enlaces proteicos se resinteticen y reexpresen sobre la superficie celular. La reexpresión del receptor seguida de una baja regulación, se lleva a cabo rápidamente a través del reciclaje o nueva síntesis del receptor (109).



**FIG. 2** RECEPTORES QUE PERTENECEN A LA SUPERFAMILIA DE RECEPTORES [HRS], DOS PATRONES DISTINTOS ENLACE ESTAN CONTENIDOS EN EL DOMINIO DE ENLACE EXTRACELULAR, UN CONJUNTO AMINO TERMINAL DE CUATRO CISTEINAS [OVALOS PEQUEÑOS VACIOS] Y UN PATRON YUXTAPUESTO DE MEMBRANA DE TRP-SER-X-TRP-SER [OVALOS GRANDES], ESTOS PATRONES SON DUPLICADOS EN EL CASO DE R-IL-3, Y DE LA CADENA B DEL R-GM-CSF. TANTO EL RECEPTOR TIPO I Y II DE G-CSF CONTIENEN UNA REGION AMINO TERMINAL QUE PERTENECE A LA SUPERFAMILIA Ig [SEMICIRCULOS] Y TRES VECES REPETIDO EL MODULO DEL TIPO III DE FIBRONECTINA EN LA REGION DE YUXTAMEMBRA: A [OVALOS CON RAYAS VERTICALES], LOS DOMINIOS CITOPLASMICOS DIFIEREN GRANDEMENTE EN LONGITUD; R-Epo, R-IL-3 Y LA CADENA B DE R-GM-CSF TIENEN UN ALTO PORCENTAJE DE SERINA Y RESIDUOS DE PROLINA [OVALOS GRANDES VACIOS]. LA CADENA  $\alpha$  DEL R-GM-CSF TIENE UNA COLA CITOPLASMICA CORTA, LOS TIPOS I Y II DE R-G-CSF SOLO DIFIEREN EN LA LONGITUD DE SUS REGIONES CITOPLASMICAS. B) LOS RECEPTORES PERTENECIENTES A LA SUBCLASE III DE LA FAMILIA DE LAS RTK, TANTO EL R-CSF Y c-kit TIENE CINCO INMUNOGLOBULINAS REPETIDAS [SEMICIRCULOS] EN EL DOMINIO EXTRACELULAR, EL DOMINIO CITOPLASMICOS DE LOS DOS RECEPTORES CONTIENE UN DOMINIO TIROSINA-CINASA [AREAS CUADRADAS NEGRAS] INTERRUPTIDO POR SECUENCIAS DE INSERCIÓN HIDROFILICAS DE DIFERENTE LONGITUD.

Aunque **GM-CSF** ejerce sus efectos sobre células en diversos estadios de diferenciación, se observa que el ligando generalmente se une al receptor de alta afinidad y que los mecanismos de transducción de señales van a ser distintos, dependiendo de como **GM-CSF** actúe sobre las células blanco, por ejemplo, en células **HL-60** donde funciona como diferenciador se induce la activación del fosfatidil inositol y la translocación de la **PKC** (110). Sin embargo cuando ejerce actividad mitogénica, por ejemplo en la línea celular **M-07e**, estimula un incremento en el pH intracelular consecuencia de un antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (111) y la inducción de fosforilación de tirosinas (112).

**IL-3** se une a receptores de alta y baja afinidad, con pocas excepciones en células humanas se expresa el receptor de alta afinidad (113,114,115).

El receptor de baja afinidad para **IL-3** de ratón, es una proteína transmembranal, de dominio extracelular y citoplásmico con 417, 26 y 416 aa respectivamente (116).

El receptor para **IL-3** comparte con los receptores para **Epo.**, **IL-4** y la cadena  $\beta$  del receptor para **IL-2**, un dominio intracelular rico en serinas y prolina, lo cual sugiere una vía de señalización de transducción común (117).

Los eventos intracelulares desencadenados por la activación del receptor para **IL-3** no se conocen con exactitud, se observa sin embargo una inducción de la actividad tirosinas cinasas (118). Además, tanto en líneas humanas y de ratón dependientes de **IL-3** se presenta un aumento en la actividad ornitino descarboxilasa (**ODC**), misma que es precedida por la alcalinización del citoplasma vía la activación del sistema de intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (119).

De lo anterior se deduce que las señales de transducción que se efectúan al activarse los receptores para **GM-CSF** e **IL-3** en células humanas son las mismas, sin embargo esto no es concluyente, requiriéndose diseñar estudios sobre células que posean un sólo tipo de receptor.

Las células del sistema hematopoyético presentan receptores para más de un **CSF**, permitiendo que más de un factor pueda actuar simultáneamente sobre la respuesta celular. Esta forma de acción puede ser aditiva o competitiva y se ha observado que tanto en el sistema humano como de ratón, **GM-CSF** e **IL-3** ejercen efectos paralelos sobre progenitores hematopoyéticos de médula ósea (120). La expresión de uno o ambos receptores depende del estado de maduración de las células hematopoyéticas y la vía de diferenciación de éstas; una característica de los sistemas humanos es que, cuando ambos receptores están coexpresados, se presenta una reactividad cruzada, esta coexpresión por parte de los receptores de alta afinidad ha sido observada en monocitos, eosinófilos, basófilos, y células de leucemia mieloblástica aguda (**AML**) (113,121,122).

Para que se realice una inhibición recíproca en los receptores para **IL-3** y **GM-CSF**, es necesario que ambos receptores se presenten en la superficie celular, lo que hace pensar que cuando están coexpresados, también físicamente están asociados, así cuando **GM-CSF** se une al receptor, le transmite información al receptor de **IL-3** para que no responda a **IL-3** y viceversa (123).

Se ha propuesto alternativamente que tanto **GM-CSF** e **IL-3** se asocian a un complejo receptor que consta de dos distintos dominios de enlace de baja afinidad para ambos ligandos y de una estructura común que les confiere alta afinidad y reactividad cruzada.



G-CSF muestra tres receptores distintos, los tipos I y II poseen secuencias transmembranales y extracelulares idénticas, difiriendo sólo en la longitud de sus regiones citoplásmicas, siendo más larga para el tipo I; el tercer receptor carece del dominio transmembranal y consecuentemente tiene alteraciones en el sistema de transducción (124).

El dominio intracelular idéntico para los receptores I y II consiste de 96 aa residuales, variando sólo en la longitud de sus secuencias carboxilo terminal en ambos receptores, se considera que el más pequeño funciona en el transporte del ligando, mientras que la forma mayor interviene en los mecanismos de señal de transducción.

El dominio extracelular consta de tres regiones, una amino terminal perteneciente a la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) (125); un residuo de la región definida por HRS el cual contiene el sitio de enlace-ligando para el receptor G-CSF y un residuo repetido 3 veces similar al dominio tipo III de fibronectina (126), esta región le confiere al receptor funciones de adhesión y reconocimiento celular.

Dentro de la familia de receptores tirosina-cinasa subclase III se encuentran los receptores para M-CSF, PDGF y el ligando del receptor c-kit conocido como factor celular progenitor (SCF). Estos receptores presentan un gran dominio extracelular enlace-ligando glicosilado, una región hidrofóbica simple de transmembrana y un dominio citoplásmico que contiene una secuencia catalítica de tirosinas, este último se encuentra altamente conservado en todos los receptores tirosina-cinasa, así como la secuencia GlyXGlyXXGLyXlys (15-20), misma que representa parte del sitio de unión para el ATP (127,128).

Esta familia de receptores se ha subdividido en cuatro subclases en función de sus características estructurales y similitud de secuencia (129). Así para la subclase I se tiene la presencia de dos secuencias repetidas ricas en cisteínas en el dominio extracelular, un ejemplo lo es el factor de crecimiento epidérmico; la subclase II se caracteriza por presentar una estructura heterodimérica unida a un puente disulfuro (como el receptor de insulina); la subclase III y IV (factor de crecimiento de fibroblastos) muestran repeticiones similares a inmunoglobulinas en sus dominios extracelulares. Los receptores de la subclase III son codificados por oncogenes celulares conocidos.

La familia de receptores tirosina cinasa, presentan mecanismos de activación similares, donde la unión de receptor a su ligando conduce a una alteración conformacional en el dominio extracelular del receptor y en consecuencia a una oligomerización del mismo (130) y activación de cinasas (131) que catalizan la fosforilación de residuos de tirosina y de sustratos intracelulares.

Los monocitos-macrófagos y sus precursores comprometidos de la médula ósea, expresan sólo una clase de receptores de alta afinidad R-CSF-1 codificado por el proto-oncogene c-fms. El receptor humano, es una glicoproteína transmembranal de 972 aa (132) con un segmento extracelular amino terminal de 512 aa donde se encuentra el dominio enlace ligando; además una región hidrofóbica de 25 aa distribuida en la membrana y un dominio intracelular de 435 aa donde se localizan todas las secuencias para la activación de tirosinas cinasas.

Esta glicoproteína en ausencia de ligando es relativamente estable, con una vida media de 3 a 4 horas (133). Sin embargo, una vez formado el complejo ligando-receptor se lleva a cabo una rápida internalización y degradación en los lisosomas. La tasa de renovación del receptor puede acelerarse por medio de ésteres de forbol y lipopolisacáridos, mismos que activan a las proteínas cinasas (134).

Se ha observado que existe para los factores de crecimiento hematopoyético una transmodulación en sus receptores, es decir, una jerarquización en la modulación de éstos, que se lleva a cabo al unirse los factores a sus receptores específicos en el orden siguiente: IL-3 modula a todos los receptores, *GM-CSF* a los receptores para *G-CSF* y *M-CSF*, *M-CSF* al receptor para *GM-CSF* y finalmente *G-CSF* al receptor para *M-CSF* (135).

## IX. EFECTOS DE LOS FACTORES ESTIMULADORES DE COLONIAS SOBRE CÉLULAS MIELOIDES

---

La importancia biológica de los factores estimuladores de colonias en el control de la proliferación y diferenciación de células sanguíneas del linaje mieloides ha sido demostrada tanto *in vivo* como *in vitro*. Al efectuar cultivos de células de médula ósea desprovistos de estos factores, se observa un decremento en los niveles de ATP intracelular (136,137) seguido de muerte celular. La aplicación exógena de estas glicoproteínas *in vivo* incrementa el número de leucocitos, observándose una relación dosis-dependiente tanto para GM-CSF y G-CSF (138,139). Los CSF's favorecen diversas funciones biológicas en células hematopoyéticas, principalmente del linaje granulocito-macrófago, entre las que destacan actividades bactericida, citotóxica y antitumórica (120,140).

IL-3 es producida por los linfocitos T CD4+ activados y es capaz de formar colonias multilineales de células derivadas de médula ósea provenientes de una sola célula, las cuales contienen eritrocitos, granulocitos, monocitos y megacariocitos en distintos niveles de diferenciación (141)(Tabla 3).

Esta citocina en bajas concentraciones puede estimular la proliferación y diferenciación en células del linaje granulocito-macrófago y en alta dosis favorece el crecimiento de progenitores de eosinófilos, megacariocitos basófilos y células mast (142,143). También posee la capacidad para estimular a células precursoras pluripotentes como la CFU-S y CFU-mix, así como ayudar al crecimiento de células leucémicas de pacientes con leucemia mieloides aguda (LMA) (144,145). Las actividades biológicas de IL-3 observadas *in vitro* no se correlacionan *in vivo*, ya que en pacientes con LMA tratados con IL-3 recombinante humana sólo se detecta un incremento celular de la serie granulocito-macrófago sin afectar a otros progenitores mieloides (146).

IL-3 ejerce sus efectos en la fase G1 del ciclo celular (147) induciendo cambios morfológicos como aumento en tamaño, dispersión y vacuolización en células derivadas de médula ósea y macrófagos peritoneales (148).

GM-CSF es una glicoproteína de 144 aa que incluye 17 residuos para la secuencia de señal; este factor es producido por linfocitos T activados, fibroblastos, macrófagos, células epiteliales; y células estromales y endoteliales estimuladas por IL-1 (149).

GM-CSF *in vitro* estimula neutrófilos, macrófagos, y eosinófilos (150) e interactúa con progenitores tempranos, apoya la proliferación de progenitores eritroides en presencia de IL-3 y Epo (151-152). El espectro de actividades biológicas ejercidas por este factor está en función de su concentración, ya que en bajas dosis ayuda principalmente al desarrollo de colonias de tipo macrófágico; y al aumentarse en 10 veces ésta, se desarrollan colonias de granulocitos (153). Si la concentración se eleva en un rango aún mayor se favorecerá el crecimiento de progenitores eritroides, basófilos, células mast, y megacariocitos. Se considera al GM-CSF como un factor clonogénico para células de LMA (154).

TABLA 3. CARACTERISTICAS DE INTERLEUCINA III  
(IL-3)

**NOMENCLATURA**

FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS MULTIPOTENCIAL; FACTOR ESTIMULANTE DE CELULAS PERSISTENTES (P); FACTOR DE CRECIMIENTO DE CELULAS MAST; ACTIVIDAD PROMOTORA DE ESTALLAMIENTO; ACTIVIDAD ESTIMULANTE TIROSINA 1; ACTIVIDAD ESTIMULANTE DE CELULAS QUE PRODUCEN HISTAMINA; FACTOR DE CRECIMIENTO CELULAR HEMATOPOYETICO; FACTOR DE CRECIMIENTO HEMATOPOYETICO MULTILINAJE; ACTIVIDAD ESTIMULANTE DE CFU's; FACTOR ACTIVANTE DE CELULAS PROGENITORAS; HEMATOPOYETINA 2; ACTIVIDAD SINERGISTICA; CSF-2 $\alpha$  y -28.

**FUENTES**

LINFOCITOS T ACTIVADOS; CELULAS MAST ACTIVADAS POR CRUZAMIENTO CON MOLECULAS IgE UNIDAS A RECEPTORES IgE-Fc DE CELULAS MAST. SE SINTETIZA NORMALMENTE POR ESTIMULOS INMUNOLOGICOS Y PUEDE CONSIDERARSE COMO MOLECULA DE STRESS O EMERGENCIA. CELULAS NK (ACTIVADAS) CELULAS MAST (ACTIVADAS). EN RATONES CIERTAS LEUCEMIAS O SARCOMAS (CELULAS MAST/MEGACARIOCITOS, CELULAS MAST, MONOCITOS O MIELOIDES NO DIFERENCIADAS) MOSTRANDO REAREGLOS PATOLOGICOS DEL GENE IL-3 CON PRODUCCION DE IL-3, Y AUTOESTIMULACION DEL CRECIMIENTO.

**CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS**

PESO MOLECULAR DE PROTEINA RECOMBINANTE DERIVADA DE LEVADURA POR SDS-PAGE: 15 - 17 kDa; ESTRUCTURA SECUNDARIA EN SU MAYORIA HELICOIDAL; LONGITUD POLIPEPTIDICA DE 133 AMINOACIDOS; PUENTE DE DISULFURO: UNO (16, 84); CARBOHIDRATO: DOS SITIOS DE ENLACE N; AMINO TERMINAL CON ALANINA; CARBOXILO TERMINAL CON FENILALANINA.

**RECEPTORES**

PRESENTES EN PROGENITORES DE MEDULA OSEA, MACROFAGOS, CELULAS MAST, EOSINOFILOS, MEGACARIOCITOS, BASOFILOS, Y CIERTAS LEUCEMIAS MIELOIDES. EL RECEPTOR ES UN DIMERO. EN EL HUMANO, LA CADENA  $\beta$  DEL RECEPTOR ES COMPARTIDA CON LA CADENA  $\alpha$  DEL RECEPTOR IL-3, LA CADENA  $\alpha$  DEL RECEPTOR GM-CSF, Y PROBABLEMENTE LA CADENA  $\alpha$  DEL RECEPTOR IL-5. EN RATON EL RECEPTOR IL-3 TIENE UNA CADENA  $\beta$  UNICA QUE ESTA CERCANAMENTE RELACIONADA A UNA CADENA  $\beta$  SIMILAR COMPARTIDA POR LOS RECEPTORES IL-5 Y GM-CSF.

**EFFECTOS BIOLÓGICOS IN VITRO**

ESTIMULA EL CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION DE CELULAS PROGENITORAS HEMATOPOYETICAS PLURIPOTENCIALES; PROGENITORAS DE: NEUTROFILOS, MACROFAGOS, MEGACARIOCITOS, ERITROCITOS, EOSINOFILOS, BASOFILOS, CELULAS MAST; PARECE ESTIMULAR EL CRECIMIENTO DE UN SUBCONJUNTO DE LINFOCITOS T; ESTIMULA LA FUNCION DE CELULAS MADURAS: CELULAS MAST, BASOFILOS, EOSINOFILOS, MACROFAGOS.

**EFFECTOS BIOLÓGICOS IN VIVO**

FUNCIONA COMO UN PUENTE DE UNION ENTRE EL SISTEMA INMUNE Y EL SISTEMA HEMATOPOYETICO, ESTIMULANDO LA GENERACION Y FUNCIONAMIENTO DE LAS CELULAS SANGUINEAS. INCREMENTA EL NUMERO DE CELULAS PROGENITORAS HEMATOPOYETICAS MULTIPOTENCIALES, DE CELULAS PROGENITORAS HEMATOPOYETICAS DE LINAJES MULTIPLES Y DE CELULAS MAST EN PIEL, BAZO, E HIGADO. ESTIMULA EL INCREMENTO DE BASOFILOS Y EOSINOFILOS EN SANGRE PERIFERICA Y EN ALGUNOS ESTUDIOS DE MONOCITOS Y NEUTROFILOS, PUEDE OCASIONAR AUMENTO DE LOS NIVELES DE PLAQUETAS.

**EFFECTOS SOBRE LA HEMATOPOYESIS**

ESTIMULACION DE LA HEMATOPOYESIS; UTIL EN EL MANEJO DE ANEMIA APLASICA; PUEDE PREVENIR LA MUERTE EN RATONES CON ANEMIA AGUDA, INDUCIDOS POR ANTICUERPOS DE ANTI-CELULAS ROJAS. EN RATONES CON LEUCEMIAS MIELOIDES O MONOCITICAS EN QUE LA ACTIVACION DEL GENE IL-3 HA SIDO UN EVENTO ONCOGENICO CLAVE. ANTICUERPOS ANTI-IL3 PUEDEN BLOQUEAR EL CRECIMIENTO DE ESTAS LEUCEMIAS; EN CIERTAS INFECCIONES VIRALES PUEDE SER DE VALOR LA ADMINISTRACION DE ANTICUERPOS ANTI-IL-3; EN ENFERMEDADES DE ALERGIA, ANTAGONISTAS DE IL-3, INCLUYENDO ANTICUERPOS IL-3, PUEDEN SUPRIMIR LA PRODUCCION Y ACTIVACION DE BASOFILOS Y EOSINOFILOS.

**GM-CSF** *in vivo* estimula las cuentas leucocitarias de granulocitos y macrófagos sin afectar a otros linajes celulares, por ello se le ha empleado en el área clínica en pacientes granulocitopénicos o con enfermedades congénitas de granulocitos (138). Este factor además de incrementar el número de neutrófilos, intensifica la citotoxicidad neutrofilica en células infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) (155-156)(Tabla 4).

**G-CSF** es producido por células endoteliales, fibroblastos y macrófagos inducidos por IL-1, factor de necrosis tumoral (TNF  $\alpha$ ) o endotoxinas bacterianas (157); en bajas concentraciones promueve la proliferación y desarrollo de células progenitoras a formar colonias de neutrófilos, mientras que en altas dosis se observan colonias de granulocitos-macrófagos o macrófagos (153). A diferencia de los otros CSF's este factor se encuentra en circulación, por tanto, su acción puede ser ejercida a distancia, es decir puede presentarse una liberación de neutrófilos de la médula ósea influenciada por reacciones inflamatorias (159).

**G-CSF** ha sido empleado clínicamente en pacientes granulocitopénicos o con enfermedades congénitas de este linaje observándose que la inducción de granulocitos es dosis-dependiente (160-162)(Tabla 5).

Actualmente esta glicoproteína se administra a pacientes que han sido sometidos a una citorreducción hematopoyética como consecuencia de quimioterapia o radioterapia y conjuntamente con trasplante autólogo de médula ósea reduce el tiempo de recuperación neutrofilica (163).

**M-CSF** también denominado CSF-1 es una glicoproteína producida por fibroblastos y sintetizada por células endoteliales y macrófagos inducidos por otras citocinas (164,165)(Tabla 6).

**M-CSF** similarmente al **GM-CSF** no se encuentra circulando en sangre y por tanto su síntesis dentro de la cavidad medular es la responsable de sus efectos en la estimulación de colonias.

A diferencia de los CSF's mencionados anteriormente, el **M-CSF** *in vitro* muestra una alta especificidad hacia el linaje monocito-macrófago (166-167). Este factor regula la entrada de fagocitos mononucleares a la fase S de ciclo celular (168); los macrófagos maduros dependen de esta proteína para mantener funciones biológicas como, síntesis de proteínas, protección contra infecciones virales, estimulación de actividad tumórica e inducción de citocinas secundarias como IL-1 (169), prostaglandinas y activador de plasminógeno (170-172), además estimula la ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en macrófagos derivados de médula ósea (173).

El uso del **M-CSF** *in vivo* no se ha generalizado, debido al bajo número de monocitos en sangre periférica después de su administración. Sin embargo en algunos tratamientos post-trasplante de médula ósea se ha observado una recuperación más rápida de leucocitos en pacientes sometidos a este factor (184).

**TABLA 4. CARACTERISTICAS DEL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS GRANULOCITICO-MACROFAGAS (GM-CSF)**

**NOMENCLATURA**

FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS  $\alpha$ ; PLURIPOYETINA  $\alpha$

**FUENTES**

CELULAS T ACTIVADAS; MACROFAGOS; FIBROBLASTOS; CELULAS ENDOTELIALES

**CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS**

PESO MOLECULAR: SDS-PAGE: 18 -32 kD; ESTRUCTURA SECUNDARIA: PROTEINA GLOBULAR COMPACTA CONTIENIENDO DOS HELICES  $\alpha$  Y ESTRUCTURAS PLANAS  $\beta$ ; FORMA: MONOMERICA; ESTRUCTURA CRISTALINA: ORTOROMBICA; PUNTO ISOELECTRICO: 3.4 - 4.5; LONGITUD DE AMINOACIDOS: 127; PUENTES DISULFURO: DOS (54,96) (88,121); CARBOHIDRATOS: H(19) (29+0); AMINOTERMINAL: MET; CARBOXILO TERMINAL: GLU; SENSIBILIDAD DE PROTEASA: TRIPSINA (NO), QUIMIOTRIPSINA (NO); ESTABILIDAD: MAS DE 6 MESES A 4°C; ESTABILIDAD AL CALOR: 10 min A 56 °C; ESTABILIDAD AL pH: ESTABLE ABAJO DE pH = 7. IMPORTANCIA DEL CARBOHIDRATO: GM-CSF NO GLICOSILADO TIENE ALTA ACTIVIDAD BIOLOGICA. GM-CSF ALTAMENTE GLICOSILADO TIENE BAJA AFINIDAD DEL RECEPTOR.

**RECEPTORES**

DISTRIBUCION DE RECEPTORES:  
 CELULAS HEMATOPOYETICAS: MONOCITOS, NEUTROFILOS, EOSINOFILOS, Y SUS PROGENITORES.  
 CELULAS NO HEMATOPOYETICAS: FIBROBLASTOS, LINEAS CELULARES DE SARCOMA OSTEOGENICO, LINEAS CELULARES DE CARCINOMA DE GLANDULA MAMARIA, LINEAS CELULARES DE CARCINOMA DE CELULAS PEQUEÑAS DE PULMON, CELULAS ENDOTELIALES, CELULAS SIMILARES A LAS OSTEOBLASTICAS, PLACENTA, CELULAS Cos DE SIMIO TRANSFORMADAS SV-40

**EFFECTOS BIOLOGICOS IN VITRO**

FACTOR DE SOBREVIVENCIA; FACTOR DE CRECIMIENTO; FACTOR DE DIFERENCIACION; ACTIVACION DE CELULAS MADURAS

**EFFECTOS BIOLOGICOS IN VIVO**

CITOTOXICIDAD; FAGOCITOSIS; ADHESION CELULAR; QUIMIOATRAYENTE

**EFFECTOS SOBRE LA HEMATOPOYESIS**

QUIMIOTERAPIA DE CANCER, TRANSPLANTE DE MEDULA OSEA, ANEMIA DE MIELODISPLASIA/APLASTICA, LEUCEMIA MIELOGENA AGUDA, TERAPIA ASOCIADA-AIDS, REACCIONES ADVERSAS DE GM-CSF, ENFERMEDADES INFECCIOSAS, ESTADOS NEUTROPENICOS CONGENITOS SELECCIONADOS Y RESPUESTAS BIOLOGICAS PARA MODIFICAR CIERTOS TUMORES.

TABLA 5. CARACTERISTICAS DEL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS GRANULOCITICAS (G-CSF)

#### NOMENCLATURA

CSF-B, PLURIPYETINA (pCSF)

#### FUENTES CELULARES

CELULAS ESTROMALES; MACROFAGOS; FIBROBLASTOS; CELULAS ENDOTELIALES; LINEA CELULAR 5637 DE CARCINOMA DE VEJIGA HUMANA

#### CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS

PESO MOLECULAR: SDS-PAGE 19600; FILTRACION EN GEL: 32000 aprox.; ESTRUCTURA SECUNDARIA: ABUNDANTE  $\alpha$  HELICE Y POCO DE HELICE PLANA  $\beta$ ; ESTRUCTURA CRISTALINA NO RESUELTA; LONGITUD DE AMINOACIDOS: 174; PUENTES DE DISULFURO: DOS (36,42 Y 64,74); CARBOHIDRATOS: ENLACES-O (TREONINA-133); AMINO TERMINAL DE TREONINA; CARBOXILO TERMINAL: PROOLINA; SENSIBILIDAD A PROTEASA: *S.aureus* V-8 (PARCIALMENTE), PEPSINA, SUBTILISINA, PEPSINA, Y TRIPSINA (PARCIALMENTE); ESTABILIDAD A 4 °C.

#### RECEPTORES

CELULAS INMADURAS Y MADURAS MIELOIDES; ALGUNAS LINEAS CELULARES DE CELULAS SCLC y CELULAS ENDOTELIALES.

#### EFFECTOS BIOLÓGICOS IN VITRO

EN PROGENITORES HEMATOPOYETICOS TEMPRANOS SINERGIZA CON IL-3 PARA APOYAR LA PROLIFERACION DE CELULAS PROGENITORAS TEMPRANAS. EN PROGENITORES MIELOIDES BAJA LA PROLIFERACION/DIFERENCIACION DE LINAJE NEUTROFILICO. EN NEUTROFILOS LLEVA A CABO LA INDUCCION DEL ANION SUPEROXIDO, ADHESION, INTENSIFICA LA LIBERACION DEL ACIDO ARAQUIDONICO, FAGOCITOSIS, ENLACE DE FMLP Y ADCC. EN CELULAS LEUCEMICAS, PUEDE CAUSAR EL CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION DE ALGUNAS LINEAS CELULARES LEUCEMICAS MIELOIDES. SOBRE LINEAS CELULARES TUMORALES Y EN LA PROLIFERACION Y HIGRACION DE CELULAS ENDOTELIALES.

#### EFFECTOS BIOLÓGICOS IN VIVO

EN LINAJE GRANULOCITICO SOBRE LA MIELOPOYESIS; SOBRE PROGENITORES DE OTROS LINAJES HEMATOPOYETICOS SON TAMBIEN PROPORCIONALMENTE INCREMENTADOS EN MEDULA; AUMENTA LA MIELOPOYESIS EN BAZO, HIGADO, Y NODULOS LINFATICOS DE ANIMALES QUE RECIBEN DOSIS MAYORES O IGUALES A 10  $\mu$ g/Kg/DIA; REDUCE LA MORTALIDAD EN RATONES NEUTROPENICOS, Y ACTUA CON UNA VARIEDAD DE AGENTES MICROBIANOS Y FUNGICIDAS.

#### EFFECTOS SOBRE LA HEMATOPOYESIS

APLICACIONES EN TRATAMIENTO EN CANCER; EN SEVERAS NEUTROPENIAS CRONICAS; ENFERMEDADES INFECCIOSAS (APLICADAS A NEUTROPENIA Y NO APLICADAS A ESTA).

TABLA 6. CARACTERISTICAS DEL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS MACROFAGAS (M-CSF)

#### NOMENCLATURA

FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS (CSF), FACTOR DE CRECIMIENTO DE MACROFAGOS (MGF), INDUCTOR GRANULOCITO MACROFAGO IH (MGI-IM), FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS MACROFAGAS (M-CSF).

#### FUENTES

FIBROBLASTOS, CELULAS ENDOTELIALES, CELULAS DE EPITELIO COLUMNAR UTERINO DURANTE LA GESTACION, MONOCITOS ESTIMULADOS, CELULAS ESTROMALES DE MEDULA OSEA, QUERATINOCITOS, CELULAS EPITELIALES TIMICAS, OSTEOBLASTOS, ASTROCITOS, PREADIPOCITOS, NIOBLASTOS, CELULAS MESOTELIALES, LINFOCITOS T ACTIVADOS, LINFOCITOS B ACTIVADOS, LINEA CELULAR T LINFOIDE, LINEA CELULAR B LINFOIDE, CELULAS DE RATON L-929, CELULAS LEUCEMICAS MIELOBLASTICAS AGUDAS, CELULAS DE LEUCEMIA LINFOBLASTICA, CELULAS DE MIELOMA, LINEA CELULAR DE LA ENFERMEDAD DE HODGKIN, CELULAS DE MIELOMA MULTIPLE, CARCINOMA PANCREATICO, ADENOCARCINOMAS DE PULMON, MAMA, OVARIO, Y ENDOMETRIO.

#### CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS

M-CSF TIENE UN PESO MOLECULAR DE 45 A 90 kD; ESTRUCTURA CUATERNARIA HOMODIMERICA, ENLACES DISULFURO REQUERIDOS PARA EL MANTENIMIENTO DEL ESTADO DIMERICO; PUNTO ISOELECTRICO DE 3 A 5; LONGITUD DE LA CADENA DE AMINOACIDOS VARIABLE, LONGITUD MINIMA 150 AMINOACIDOS; CON PUENTE DISULFURO; CARBOHIDRATOS CON UNIONES DE COMPLEJO AMINO, Y UNIONES O (ENLACES); ACIDO GLUTAMICO COMO AMINO TERMINAL; EL CARBOXILO TERMINAL ES DESCONOCIDO; NO ES SENSIBLE A TRIPSINA Y PAPAINA, SI LO ES A QUIMOTRIPSINA Y SUBTILISINA. PRESENTA UNA ESTABILIDAD DE 6 MESES A 4°C; SU ESTABILIDAD AL CALOR ES 30 min A 50°C; ES ESTABLE A UN pH DE 2 A 12 A 4°C.

#### RECEPTORES

EN FAGOCITOS MONONUCLEARES, CELULAS HEMATOPOYETICAS MULTIPOTENCIALES, CELULAS DECIDUALES, CELULAS TROFOBlasticas, CELULAS MICROGLIALES, NIOBLASTOS, SUBCONJUNTO DE CELULAS MIELOIDES DE LEUCEMIA AGUDA.

#### EFFECTOS BIOLÓGICOS IN VITRO

M-CSF DE HUMANO ES ACTIVO SOBRE CELULAS DE RATA Y RATONES. M-CSF DE RATON ES ACTIVO SOBRE CELULAS DE RATA E INACTIVO SOBRE CELULAS HUMANAS. M-CSF ACTUA SOBRE MONOCITOS Y MACROFAGOS, ESTIMULANDO LA SOBREVIVENCIA Y PROLIFERACION (EN RATONES PERO NO EN HUMANOS); ESTIMULA LA PRODUCCION DE IL-1, G-CSF, IFN, TNF, TROMBOPLASTINA, GLUTAMIL-TRANSEPTIDASA Y, PROSTAGLANDINAS, TROMBOXANO, Y METABOLITOS OXIGENO BIODEDAL. INTENSIFICA LA ACTIVIDAD TUMORICA, Y LA CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS; ESTIMULA LA FOSFORILACION EN TIROSINA DE PROTEINAS, LA INCORPORACION DE GLUCOSA, LA ACTIVIDAD DE  $ATPase Na^+/K^+$ , LA ACTIVIDAD DE FOSFATIDIL INOSITOL 3 CINASA, LA ACTIVIDAD CICLO OXIGENASA, LA FOSFORILACION DE SERINA RAF-1 Y LA ACTIVACION DE CINASA; ESTIMULA LA DIFERENCIACION DE CELULAS BLASTO; SINERGIZA CON GM-CSF, TNF, PARA ESTIMULAR LA PROLIFERACION; INTERVIENE EN LA INHIBICION DE LA EXPRESION DEL GENE DEL MHC CLASE II. ESTIMULA LA PROLIFERACION DE CELULAS MICROGLIALES. ACTUA SOBRE CELULAS PROGENITORAS DE MACROFAGOS, ESTIMULANDO LA SOBREVIVENCIA, PROLIFERACION, Y DIFERENCIACION DE MACROFAGOS; SINERGIZA CON GM-CSF, E IL-3 PARA ESTIMULAR LA PROLIFERACION Y DIFERENCIACION. EN CELULAS HEMATOPOYETICAS PRIMITIVAS, SINERGIZA CON IL-3, IL-1, FACTOR DE CELULAS PROGENITORAS (SCF), E IL-6 PARA ESTIMULAR PROLIFERACION Y DIFERENCIACION DE MACROFAGOS.

#### EFFECTOS BIOLÓGICOS IN VIVO

M-CSF INTERVIENE EN LA PRODUCCION DE FAGOCITOS MONONUCLEARES, REGULACION DE LA FUNCION PLACENTARIA, REABSORCION DE HUESO, ACTIVIDAD ANTITUMORICA, Y DISMINUCION DEL COLESTEROL DEL PLASMA.

#### EFFECTOS SOBRE LA HEMATOPOYESIS

MARCADOR TUMORAL, ACELERA LA RECUPERACION HEMATOPOYETICA DESPUES DE LA QUIMIOTERAPIA EN TUMORES, SE CREE QUE TIENE UN PAPEL IMPORTANTE EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA; EN EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES VIRALES, BACTERIANAS, POR LEVADURA; INTENSIFICA LA ACTIVIDAD TUMORICA, Y EL TRATAMIENTO DE LEUCEMIA.



## X. MACROFAGOS

En individuos adultos los fagocitos mononucleares se originan en la médula ósea a partir de una célula progenitora común (175). Este precursor es conocido como Unidad Formadora de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CFU) (176). Los fagocitos son liberados al torrente sanguíneo como células monocíticas que migran a los tejidos, madurando y convirtiéndose en macrófagos de cavidad peritoneal, tejido linfóide, pulmón, hígado y bazo. El ambiente especial de cada tipo celular dota a estas células con funciones específicas; por tanto, los macrófagos están involucrados de manera importante en la estimulación de la respuesta inmune. Estas células junto con aquellas del Sistema Reticulo Endotelial proveen una importante defensa en contra de agentes infecciosos, toxinas biológicas, contaminantes ambientales y células transformadas neoplásicamente. A su vez, los macrófagos intervienen en los procesos de homeóstasis, ya que secretan una variedad de mediadores similares a los endócrinos y enzimas que influyen a otros tipos celulares, así como a otros elementos del sistema fagocítico mononuclear. Los macrófagos también han sido implicados en la modulación de aspectos celulares, como la regulación del proceso de proliferación y diferenciación linfocítica y fibroblástica, (170) así como en la hematopoyesis, activación tumórica y citólisis tumoral. Entre los productos que secretan los macrófagos, se encuentran Citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF, TNF, PDGF, FGF, TGF  $\alpha$  y  $\beta$ , CSF-1, LIF); Prostaglandinas; Componentes del Complemento (C1, C2, C3, C4, C5, de la ruta clásica; factor B, factor D y properdina de la ruta alternativa, inactivador del componente C3) (178); Factores de coagulación; Enzimas; Proteínas de matriz extracelular (fibronectina, proteínas de enlace y proteoglicanos; Oligopéptidos bioactivos; Lípidos bioactivos; Hormonas Esteroides; Purinas; Intermediarios reactivos de Oxígeno y Nitrógeno (169).

Al parecer el espectro de productos sintetizados y liberados por las poblaciones de fagocitos mononucleares a sus medios de cultivo es típicamente dependiente del grado de diferenciación celular así como de la forma de estímulo al cual son expuestas in vivo o en cultivos de tejidos. Tales variaciones están en función de los complejos mecanismos reguladores celulares por los cuales los fagocitos mononucleares responden a su ambiente peculiar. Dicha modulación es disparada en parte, a través de un cierto número de receptores de membrana plasmática y sitios de enlace de alta afinidad que interactúan con varios ligandos en el ambiente pericelular.

## XI. CITOCINAS

Las citocinas son hormonas tisulares que participan en una gran variedad de respuestas celulares, incluyendo la regulación de la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas y células del sistema inmune (120,180,181); dentro de ellas se incluye a interleucinas (IL-1 a IL-12), factores de crecimiento (PDGF, FGF, EGF, TGF e IGF) y factores estimuladores de colonias (CSF's) (182) (Tabla 7). Son liberadas en respuesta al antígeno, pero en contraste con la composición de los anticuerpos, su constitución química no está determinada por la estimulación del antígeno. Se penso originalmente que las citocinas eran fabricadas únicamente por linfocitos, para comunicarlos con otras células del sistema inmune. Ahora es claro que ni la producción de citocinas ni sus efectos son restrictivos para las células linfoides. Por estas razones, el término linfocina utilizado inicialmente es cedido al de citocina.

Las citocinas se generan en todo el cuerpo durante las fases efectoras de inmunidad específica y natural, en áreas localizadas como los espacios de las articulaciones o el tejido linfoide, y pueden actuar con otros tipos celulares en la vecindad inmediata (efecto parácrino) o sobre la misma célula que la produjo (efecto autócrino).

Las citocinas que son elaboradas en grandes cantidades entran a la circulación sanguínea actuando en forma hormonal causando profundos efectos sistémicos. Aunque ningún efecto causal de las citocinas se ha establecido en alguna enfermedad, la producción excesiva o insuficiente de citocinas puede contribuir a ciertos estadios de enfermedades particularmente de origen infeccioso o autoinmune.

Algunas acciones de los CSF's son mediadas por otras citocinas, por ejemplo el factor de necrosis tumoral (TNF), linfotóxina (LT), interferón gama (INF-gam $\gamma$ ) y factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) inhiben el crecimiento de células progenitoras de médula ósea, por su parte la IL-1 e IL-6 intensifican la respuesta a CSF's. En general se considera a las citocinas necesarias para que la médula ósea funcione normalmente, a la vez que proveen una alta funcionalidad en respuesta a estímulos.

TABLA 7. CITOCINAS INVOLUCRADAS EN INMUNOREGULACION Y DESARROLLO DE CELULAS SANGUINEAS

FAMILIA	MOLECULAS	SINONIMOS	LOCALIZACION CROMOSOMICA	M. W. (kd)
FACTORES DE CRECIMIENTO	MULTI-CSF	IL-3	5q23-q31	14 - 28
	GM-CSF	CSF- $\gamma$	5q23-q31	14 - 35
	G-CSF	CSF- $\beta$	17q11-q22	18 - 22
	N-CSF	CSF-1	5q33.1	47 - 74
	EPO SCF		7q11-q22	34 - 39
INTERLEUCINAS	IL-1	HEMATOPOYETINA-1	2q13-q21	31 - 17
	IL-2	TCGF	4q26-q27	15
	IL-3	MULTI-CSF	5q23-q31	14 - 28
	IL-4	BSF-1	5q23-q32	15 - 20
	IL-5	BCGF-11, TRF	5q23-q32	12 - 18
	IL-6	BSF-2	7p15-p21	24
	IL-7		8p12-p13	17
	IL-8	NCF/NAP		10
	IL-9	P40		40
	IL-10 IL-11			
INTERFERONES	IFN- $\alpha$	IFN-LEUCOCITO	9p22-p13	18 - 20
	IFN- $\beta$	IFN-FIBROBLASTO	9p22	23
	IFN- $\gamma$	IFN-INMUNE	12q24.1	20 - 25
FACTORES DE NECROSIS TUMORAL	TNF- $\alpha$	CACETINA	6p21.3	17
	TNF- $\beta$	LINFOTOXINA	6p21.3	25
	PDGF			30 - 35
	TGF- $\alpha$		2p13	
	TGF- $\beta$ LIF	HILDA	19q13.1-q13.2 22q12	25 24

SCF = FACTOR CELULAR PROGENITOR.  
 B = FACTOR ESTIMULADOR CELULAR B.  
 BCGF = FACTOR DE CRECIMIENTO CELULAR B.  
 TRF = FACTOR REEMPLAZADOR DE CELULAS T.  
 NCF/NAP = FACTOR QUIMIOTACTICO NEUTROFILO/PROTEINA ACTIVANTE NEUTROFILO.  
 PDGF = FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS.  
 TGF = FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE.  
 LIF = FACTOR INHIBIDOR DE LEUCEMIAS.  
 FGF = FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS.  
 TCSF = FACTOR DE CRECIMIENTO CELULAR T

## XII. INTERLEUCINA DOS (IL-2)

Interleucina dos (IL-2) es un péptido neutro de 15 kD; a la vez que es producido por células T activadas, una de sus funciones inmunológicas más importantes es iniciar la proliferación de este mismo tipo celular (183,184). Las células B activadas expresan el receptor para IL-2 (antígeno tac) (Tabla 8), el cual es una glicoproteína de 55 kD que se encuentra expandida en la membrana celular. Las células T expresan dos receptores de 75 y 55 kD denominados receptores  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente (185). Los receptores de alta afinidad para IL-2 no están presentes en las células T en reposo pero aparecen en unas cuantas horas después de ser estimuladas a la activación. La unión de IL-2 a estos receptores provoca la expansión clonal de las células T activadas por el antígeno específico; la eliminación o el retiro del antígeno permite la involución de los receptores para IL-2 y el cese de la proliferación de la célula T aún en presencia de IL-2, limitando así la extensión de la expansión clonal (186). IL-2 ha sido utilizada experimentalmente para hacer crecer clones de célula T con funciones específicas auxiliares, citotóxicas y supresoras (187), también para cultivar células T malignas de pacientes adultos con leucemias de célula T y de células T infectadas con retrovirus linfotrópicos (188). El timo contiene poblaciones de linfocitos T inmaduros con receptores para IL-2, sugiriéndose que esta citocina puede tener un papel en la maduración y proliferación de la célula T (189). IL-2 incrementa marcadamente la actividad citolítica de una población de células asesinas (NK) capaces de destruir células tumorales a través de un mecanismo independiente de los antígenos de histocompatibilidad (190). Esta propiedad ha permitido el uso de IL-2 en ensayos clínicos en pacientes con cáncer. IL-2 es crítica para la expansión clonal de células T citotóxicas; en ratones inyectados con anticuerpo anti-IL-2 de ratón, la respuesta citolítica de linfocito T hacia células tumorales no se desarrolla (191).

Se tiene evidencia de la participación en la hematopoyesis de células T mediante la producción de factores que promueven la actividad de células progenitoras hematopoyéticas e inducción de GM-CSF e IL-3 (192).

TABLA 8. CARACTERISTICAS DE INTERLEUCINA II  
(IL-2)

#### SINONIMOS

FACTOR DE CRECIMIENTO DE CELULAS T (TCGF); MEDIO CONDICIONADO LINFOCITICO (LCH); FACTOR MITOGENICO DE CELULAS T (TMF); FACTOR APOYADOR ANIQUILADOR (KHF); FACTOR REEMPLAZANTE DE CELULAS T (TRF)

#### FUENTES CELULARES QUE LA PRODUCEN

CELULAS T (CD4+ y CELULAS CD8+); LINFOCITOS GRANULARES GRANDES (NK, LAK); ALGUNAS CELULAS PRE-B y CELULAS B TUMORALES; BSM, LINEA CELULAR PRE-T HUMANA; CELULAS T TUMORALES DE RATON (EL-4); TUMORES DE CELULAS T DE HUMANO (Jurkat); CELULAS TUMORALES DE PRIMATE (gibbon) (MLA-144).

#### CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS.

PESO MOLECULAR: SDS-PAGE 15 - 17.2 kD (de Ratón, 32 kD); FILTRACION EN GEL: 19 - 23 kD; ESTRUCTURA SECUNDARIA: EXTENSIVO DOMINIO DE HELICE  $\alpha$  CON SIMPLE ENLACE DISULFURO (Cys58 - Cys105); ESTRUCTURA CRISTALINA: MONOMERICA, ENLACES HELICOIDALES  $\alpha$  ANTIPARALELOS; NINGUN SEGMENTO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA  $\beta$ ; PUNTO ISOELECTRICO: 6.8 - 8.2 (EN RATONES DE 3.9 - 5.0); LONG. DE AMINOACIDO: 133; PUENTE DE DISULFURO: UNO (58, 105); CARBOHIDRATOS: VARIABLE; O PRIMARIA UNIDA POR SIALIDACION A Treo 3; NO IMPORTANTE PARA LA ACTIVIDAD; AMINOACIDO TERMINAL: ALANINA; CARBOXILO TERMINAL: TREONINA; SENSIBILIDAD DE PROTEASAS Y OTRAS ENZIMAS: TRIPSINA (SI), DNAsa (NO), RNAsa (NO), NEURAMINIDASA (NO); ESTABILIDAD: MAYOR DE 1 AÑO A 4°C, ESTABLE A pH 2, ESTABLE AL CALOR MAS DE 60 min A 56 °C; HIDROFOBICA.

#### RECEPTORES

CADENA  $\alpha$ , p55; CADENA  $\beta$ , p70; NO COMPARTIDOS POR NINGUNA OTRA CITOCINA CONOCIDA, AUNQUE p70 PERTENECE A LA SUPERFAMILIA DE RECEPTORES HEMATOPOYETICOS, QUE INCLUYE RECEPTORES PARA ERITROPOYETINA, IL-3, IL-4, IL-7, GM-CSF, HORMONA DE CRECIMIENTO Y PROLACTINA.

#### EFFECTOS BIOLÓGICOS IN VITRO

LINFOCITOS-T: PROMOTOR DE LA PROGRESION A TRAVES DE LA FASE G1 DEL CICLO CELULAR, AUMENTA EL pH INTRACELULAR, INDUCCION DE LA PROLIFERACION POR c-Myc, cMyb, IL-2R, ESTIMULACION DE LA ACTIVIDAD CITOSOLICA, INTENSIFICACION DE LA MOVILIDAD, Y PROMOCION DE LA FORMACION CONJUGADA; ESTIMULA LA PRODUCCION DE UNA VARIEDAD DE CITOCINAS, INCLUYENDO INTERFERON  $\gamma$ . LINFOCITOS GRANDES GRANULARES: PROMUEVE LA PROLIFERACION E INTENSIFICA LA ACTIVIDAD NK, INDUCE LA ACTIVIDAD LAK, ESTIMULA LA PRODUCCION DE MUCHAS CITOCINAS; SINERGIZA EN ESTA ACTIVIDAD CON TNF; INDUCE LA ACTIVIDAD MODULADA POR IL-4. MONOCITOS: INTENSIFICA LA ACTIVIDAD CITOSOL MONOCITICA; POSIBLEMENTE INTENSIFICA LA PROLIFERACION; CASI TODOS LOS MONOCITOS CIRCULANTES DE PACIENTES TRATADOS CON IL-2 ACOMPAÑADA CON IL-2- $\alpha$ ; LOS MONOCITOS EXPRESAN CONSTITUTIVAMENTE 4000 RECEPTORES IL-2- $\beta$ . CELULAS B: ESTIMULAN LA PROLIFERACION DE CELULAS B ACTIVADAS. CELULAS OLIGODENDROGLIALES: INDUCE LA PROLIFERACION Y PRODUCCION DE MENSAJE PROTEICO DE MIELINA BASICA.

#### EFFECTOS IN VIVO

EFFECTOS ANTITUMORICOS; ANTIBACTERIANOS Y ANTIVIRICOS; AUTOINMUNIDAD; PAPEL EN INFECCIONES PARASITICAS; PAPEL EN EL RACHAZO DE ALOINJERTOS Y EN LA RESPUESTA INMUNE.

#### EFFECTOS SOBRE LA HEMATOPOYESIS

PAPEL EN EL TRATAMIENTO DEL CANCER; EN TRANSPLANTES, INTENSIFICACION DE LA REACTIVIDAD INMUNE E INMUNIZACION; PAPEL EN LA HIPERTENSION.

### XIII. FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF)

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) fué descubierto en la década de los 70's (193) y desde entonces es considerado como el principal componente mitógeno en todo el suero sanguíneo. Gran variedad de células malignas incluyendo ciertos osteosarcomas, gliomas, sarcomas sinoviales, fibrosarcomas, sarcomas de células gigantes, carcinomas de pulmón, hepatomas y carcinomas de mama producen PDGF.

Se reconocen dos cadenas diferentes pero relacionadas de polipéptidos glicosilados (30 kD aprox.) conocidas como cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente, las cuales a pesar de sus homologías significativas son derivadas de genes diversos localizados en cromosomas separados (194). En función del tipo celular que le produce de manera natural, PDGF puede existir tanto de forma homodimera  $\alpha\alpha$  o  $\beta\beta$  como heterodimera  $\alpha\beta$ . Todas estas son funcionalmente activas y se encuentran unidas por enlaces disulfuro. Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  parecen ser similares en tamaño, pero pueden distinguirse por su especificidad de enlace y por anticuerpo monoclonal para receptor PR7212, el cual sólo reconoce a la subunidad  $\beta$ . En presencia de PDGF estas subunidades receptoras interactúan con una molécula de PDGF para formar así un complejo de alta afinidad (195) (Tabla 9).

PDGF estimula una variedad de respuestas biológicas que incluyen replicación celular, quimiotaxis, renovación de fosfatidil inositol, movilización de calcio divalente, reorganización de actina y estimulación de la fosforilación específica de tirosina (196).

Los receptores de PDGF se distribuyen ampliamente en las superficies de membranas celulares de origen mesenquimático, incluyendo dermis y fibroblastos de tendón, células vasculares de músculo liso, células gliales y condrocitos. Por medio de anticuerpos monoclonales del receptor anti-PDGF se ha obtenido un análisis detallado de cada una de las interacciones características enlace-receptor de los dímeros de PDGF.

Estudios de identificación del receptor se han llevado a cabo por afinidad de cruzamiento de enlace con marcadores radioactivos sobre proteínas específicas de membrana, sugiriéndose un peso molecular de 170 a 180 kD.

Las células inician la respuesta a PDGF atravesando la fase G1 del ciclo celular; células de músculo liso o fibroblastos 3T3 aumentan su tasa de endocitosis de moléculas marcadas con timidina, tales como sacarosa o peroxidasa. También PDGF induce un incremento en la síntesis de proteínas incluyendo la colágena. Además lipoproteínas de baja densidad enlazadas a receptores de alta afinidad y la acumulación de lípidos en las células son componentes importantes de la respuesta de arteroesclerosis (197). Células de músculo liso expuestas a PDGF y carentes de una fuente exógena de colesterol, pueden ser estimuladas por este factor y aumentar la síntesis de novo de colesterol.

TABLA 9. CARACTERISTICAS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF)

#### NO Nomenclatura

DOS DISTINTAS PROTEINAS PDGF-1 Y PDGF-11, CARACTERIZAN AL FACTOR DERIVADO DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS.

#### FUENTES CELULARES

PDGF ES SINTETIZADO POR CELULAS NORMALES Y CELULAS TRANSFORMADAS.

#### PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS

PDGF SE PURIFICO COMO DOS PROTEINAS DISTINTAS LA PRIMERA PDGF-1 DE 31 KD APROX., Y PDGF-11 DE 28 KD APROX., AMBAS DE IGUAL ACTIVIDAD MITOGENICA, COMPOSICION DE AMINO ACIDOS, REACTIVIDAD INMUNOLOGICA, Y AFINIDAD DE LOS RECEPTORES DE SUPERFICIE CELULAR. LAS DIFERENCIAS SE ESTABLECIERON A NIVEL DE ESTADOS DE GLICOSILACION, ASI, PDGF-1 CONTIENE ALREDEDOR DE 7% DE CARBOHIDRATOS Y PDGF-11 EL 4% DE CARBOHIDRATOS. PDGF TIENE UN  $pI$  DE 10.2 APROX. (ES DECIR ES BASTANTE BASICO), CONTIENE 16 MITADES RESIDUALES DE CISTEINA, LOS CUALES PARECEN ESTAR UNIDOS A ENLACES DISULFURO. REDUCIDO Y CARBOXILMETILADO, SE IDENTIFICARON DOS CADENAS DE DE 17 Y 14 KD (PDGF-1) Y DE 15 14 KD (PDGF-11) POR SDS-PAGE Y DE 18 Y 16 KD POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION. AMBAS CADENAS  $\alpha$  Y  $\beta$  HAN SIDO SECUENCIADAS Y SUS GENES CLONADOS. EL GENE DE LA CADENA  $\alpha$  SE LOCALIZA EN EL CROMOSOMA 7, Y EL GENE DE LA CADENA  $\beta$  EN EL CROMOSOMA 22. LAS CADENAS DE PDGF SON ENSAMBLADAS COMO HOMODIMEROS U HETERODIMEROS DE DISULFURO. PDGF- $\alpha\alpha$ , PDGF- $\alpha\beta$ , Y PDGF- $\beta\beta$  HAN SIDO PURIFICADAS DE FUENTES NATURALES, Y LAS DIFERENTES ISOFORMAS PARECEN TENER DIFERENTES EFECTOS FUNCIONALES. ASI, EN CONTRASTE CON PDGF- $\alpha\beta$ , PDGF- $\alpha\alpha$  TIENE SOLO BAJA ACTIVIDAD MITOGENICA Y NINGUN EFECTO SOBRE LA QUIMIOTAXIS Y LA REORGANIZACION DE ACTINA DE FIBROBLASTOS DE HUMANO, EN ALGUNOS ESTUDIOS, AUNQUE ESTAS DIFERENCIAS PUEDEN SER DEBIDAS A LA DIFERENCIAS EN LA COMPOSICION DE LOS RECEPTORES PDGF EXPRESADOS EN LAS SUPERFICIES CELULARES DE LAS CELULAS DE RESPUESTA Y PROBABLEMENTE NO REFLEJE LAS DIFERENCIAS INTRINSECAS DE LAS ISOFORMAS DE PDGF.

#### EFFECTOS BIOLÓGICOS IN VIVO

PDGF ES SINTETIZADO COMO UNA PROTEINA HETERODIMERICAS EN MEGACARIÓCITOS. ALMACENADO EN GRANULOS  $\alpha$  DE PLAQUETAS Y LIBERADO DE PLAQUETAS ACTIVADAS EN SITIOS DE VASOS SANGUÍNEOS DAÑADOS. CUANDO EL ANTISUERO QUE ESPECÍFICAMENTE RECONOCE PDGF FUE USADO PARA MEDIR LAS CONCENTRACIONES DE PDGF, LOS NIVELES EN EL SUERO HUMANO SE ESTIMARON EN 50 A 60 ng/ml; CASI 1 ng/ml O MENOS FUE ENCONTRADO EN EL SUERO DERIVADO DE PLASMA POBRE EN PLAQUETAS. EN CONTRASTE, POR MEDIO DEL RECEPTOR PDGF UNIDO EN ENSAYOS, SE ESTIMARON CONCENTRACIONES DE 15 ng/ml, O 30,000 MOLECULAS APROX. DE PDGF POR PLAQUETA.

ANÁLISIS DE TRANSCRIPTORES DE PDGF IN VIVO APOYAN QUE PDGF ACTUA PARA LA RESPUESTA PROLIFERATIVA DE CELULAS ARTERIALES DE MUSCULO LISO DURANTE LA ATEROGENESIS. LOS TRANSCRIPTORES DE LA CADENA PDGF- $\beta$  SON TAMBIEN ENCONTRADOS EN LA PLACENTA DURANTE EL PRIMER TRIMESTRE DE EMBARAZO, APOYANDO EL PAPEL DE REGULACION DE CRECIMIENTO PLACENTARIO. PDGF ES UN FUERTE QUIMIO-ATRAYENTE PARA NEUTROFILOS Y MONOCITOS DE HUMANO. PDGF-AA ES TAMBIEN QUIMIO-ATRAYENTE Y PUEDE SER MAS POTENTE PARA NEUTROFILOS QUE PARA MONOCITOS. PDGF ES TAMBIEN QUIMIO-ATRAYENTE PARA FIBROBLASTOS Y CELULAS DE MUSCULOS LISO. INDUCE LA ACTIVACION DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES Y MONOCITOS Y CAUSA UNA DEPENDENCIA DE LA DOSIS, INCREMENTO SATURABLE EN LA LIBERACION DE COLAGENASA POR FIBROBLASTOS EN CULTIVO, ACTIVIDAD QUE ES FUNDAMENTAL PARA REPARACION DE TEJIDO.

#### XIV. LAS CITOCINAS Y LAS ENFERMEDADES

La producción inadecuada de citocinas ha sido observada en varios estadios de enfermedad, cuestionando el uso terapéutico de estas en el manejo de enfermedades humanas. La información de los estados de deficiencia en citocinas se deriva de los cultivos de leucocitos in vitro y es aún poco claro si la falla en la fabricación de alguna citocina in vitro refleja lo que sucede in vivo. El estado nutricional de un paciente puede contribuir a algunos estadios de deficiencia de citocinas. Se ha reportado el decremento en la producción de IL-2 en leucocitos de pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida, diabetes mellitus tipo I, quemaduras y cáncer (198,199). La elaboración de INF y está disminuida en pacientes con lepra, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y enfermedades del tejido conectivo e incluso en neonatos normales (200). También son deficientes en los pacientes con desórdenes mieloproliferativos y hepatitis crónica. Existe igualmente una deficiencia en la producción de IL-1 en leucocitos de pacientes con una carga tumoral grande. La disminución en la respuesta de linfocitos asociada con la baja de citocinas, puede frecuentemente ser corregida in vitro por adición de citocinas exógenas. Queda aún por saber, si estos defectos pueden corregirse in vivo mediante la administración de citocinas o inductores de citocinas y si ésto pudiera resultar en la regresión de la enfermedad.

Por otra parte, varios desórdenes incluyendo el rechazo de aloinjerto, son debidos a una respuesta inmune no deseada en la cual las citocinas entran en juego. Los agentes inmunosupresores como los glucocorticoides y la ciclosporina son potentes inhibidores de la síntesis de citocinas y la respuesta de las células a estas citocinas. La inmunosupresión también puede ser inducida por el uso de citocinas fusionadas con toxinas. Estas proteínas quiméricas localizan solamente las células activadas que poseen el receptor de la citocina y la toxina las destruye selectivamente. Los anticuerpos dirigidos contra las citocinas o sus receptores (201) son potencialmente útiles en terapia inmunosupresora, terapia de la leucemia, prevención contra el rechazo de injertos y la atenuación del shock séptico. Algunas citocinas son por sí mismas inmunosupresoras, por ejemplo el factor de crecimiento transformante  $\beta$  y los interferones pueden inhibir la respuesta celular y la proliferación.

Debido a los avances en la ingeniería genética, la clonación de varias citocinas se ha logrado y grandes cantidades de material puro está disponible para los estudios en animales y el hombre. Ensayos clínicos usan actualmente interferones, IL-2, factores de crecimiento hematopoyético, TNF y hormonas tiroideas. Con algunas excepciones en estudios de las infecciones virales y de enfermedades autoinmunes, la investigación clínica ha usado la terapia de las citocinas enfocándose al problema del cáncer. Los efectos antiproliferantes del INF y la capacidad de estas sustancias de activar a las células NK, ha dado razón a tales intentos. La terapia del INF ha resultado benéfica en leucemia mielógena crónica, leucemia de la célula peluda y otros tipos de cáncer (202,203). INF  $\alpha$  se ha aplicado con cierto éxito en la hepatitis B crónica y varias enfermedades neurológicas y típicamente para la queratinitis causada por herpes, verrugas genitales e infecciones del tracto respiratorio, INF  $\beta$  ha sido estudiado en



ensayos clínicos satisfactoriamente, como en papiloma laríngeo juvenil (204). En clínica también se usa extensamente *INF* y para tratar enfermedades malignas y autoinmunes, particularmente la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple. En la clínica, *TNF* es inicial pero las respuestas de los tumores son raras y la toxicidad del tratamiento es muy elevada. El *GM-CSF* es suministrado para incrementar la producción de granulocitos periféricos y monocitos en varios pacientes, particularmente aquellos con leucopenia inducida por quimioterapia. Las hormonas tímicas han sido administradas a pacientes con inmunodeficiencias congénitas y pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (205,206).

De todas las citocinas que se sabe afectan al sistema inmune, *IL-2* ha recibido la máxima atención en la terapia contra el cáncer. Los efectos antitumorales de *IL-2* son debidos a su capacidad para activar una población de linfocitos que destruyen células transformadas. Estas "células activadas con citocinas", lisan células de tumores que son resistentes a la lisis por células *NK* (204). En la terapia con células *LAK* los linfocitos son removidos del paciente, activados con *IL-2* en cultivo y entonces administrados al paciente (207). Muchos enfermos de cáncer han sido tratados, el melanoma y el cáncer renal son los más sensibles a esta forma adoptiva de inmunoterapia. La terapia es muy costosa y está asociada a efectos colaterales que incluyen fiebre, hipotensión, daño hepático y renal, infarto del miocardio y síndrome de debilidad capilar que causa edema masivo. Esta forma de inmunoterapia algún día entrará en la práctica oncológica reduciendo el costo y la toxicidad del tratamiento.

## XV. UNIONES INTERCELULARES

Para funcionar de manera integrada, el tejido epitelial posee uniones de contacto célula-célula denominadas uniones celulares. En células animales se reconocen tres categorías funcionales de unión: a) Uniones estrechas o *tight*, comunmente encontradas en células epiteliales como intestino y vejiga urinaria. Además de mantener unidas las células, también se encargan de sellar el espacio entre ellas, de tal manera que las moléculas no pueden pasar de una célula a otra. Tratamiento con proteasas destruye las uniones *tight* e implica a las proteínas como unidades estructurales esenciales para estas uniones. Otro punto de vista, es que las uniones *tight* están formadas por la fusión de las dos capas lipídicas de la membrana externa (una de cada célula adyacente) formando así, una lámina continua; b) Uniones huecas o de comunicación, probablemente son el tipo más común de unión en células animales. Forman canales de comunicación entre células permitiendo el paso de iones y moléculas pequeñas entre las células interconectadas, por ejemplo los mensajeros secundarios como CAMP y calcio divalente, así como combustibles. Inclusive el metabolismo de las células interconectadas puede estar acoplado entre ellas. Estos canales de comunicación están compuestos de *conexina*, proteína simple de 25 kD. Así, seis moléculas de *conexina* de la membrana del plasma de una célula están alineadas con otras seis moléculas de *conexina* de la célula adyacente formando un arreglo estructural hexagonal; y, c) *Desmosomas*, se localizan principalmente en tejido epitelial estratificado, miocardio y tejido aracnoideo y parecen congregarse durante el desarrollo embrionario, cuando es requerida fuerza y adhesión celular estable.

Las principales funciones de los *desmosomas* coinciden con su propia naturaleza arquitectónica, que hace de ellos un complejo ideal que conjunta las fuerzas de tensión y resistencia mecánica en los tejidos.

Se han propuesto tres diferentes formas estructurales *desmosomáticas*, la primera denominada *Desmosomas Puntuales* que actúan como puntos de contacto de las células epiteliales, y de anclaje para los filamentos de queratina (*Tonofilamentos*) quienes cruzan el interior de la célula constituyendo el armazón estructural del citoplasma. A través de este tipo *desmosomático* otros filamentos se extienden de célula a célula. La segunda forma conocida como *Hemidesmosomas* unen la superficie basal de células epiteliales a la lámina basal subyacente (estructura especializada de la matriz extracelular). Por último se presentan los *Desmosomas en Banda* quienes rodean a cada célula de una capa epitelial formando en continuo una banda *desmosómica* cerca del polo apical de la célula. Bandas de células adyacentes se encuentran *yuxtapuestas* y separadas por material filamentosos que puede mantener unida a las membranas interactuantes. Haces *contráctiles* de filamentos de actina se encuentran colocados a lo largo de la banda dentro de cada célula, inmediatamente por debajo de la membrana plasmática.

Los desmosomas están constituidos por varias proteínas pertenecientes a dominios estructurales diferentes, la Placa Citoplásmica, y el Centro Membranal. El primero se compone de proteínas no glicosiladas (Desmoplaquinas, DP) con pesos moleculares de 250 kD (DP-I), 215 kD (DP-II), 83 kD (DP-III o Placoglobulina) y 78 kD (DP-IV).

El centro membranal consiste de glicoproteínas (Desmogleinas DG), cuyos pesos moleculares son 150 kD (DG-I), 120/110 kD (DG-II/DG-III), y 22 kD (DG-IV), y la calmodulina de 240 kD. Se piensa que el dominio del centro membranal está involucrado en la función adhesiva donde el calcio se une a la desmogleina, la cual constituye la formación de desmosomas (208).

Se ha determinado, que el ensamble desmosomático sobre membranas plasmáticas de las células epiteliales adyacentes se efectúa rápidamente por inducción célula-célula. Intervienen en el ensamble proteínas presentes en el citoplasma y membrana plasmática. Sin embargo, los mecanismos de síntesis de los dominios y de ensamble aún no se conocen (209). Las proteínas DP-I/II y DG-I son los componentes principales del dominio de la placa citoplásmica y del dominio del centro membranal respectivamente. DG-I presenta microheterogeneidad antigénica (determinanda por anticuerpos monoclonales), lo cual refleja la existencia de isotipos DG-I (210) que pueden darse probablemente por los carbohidratos, o debido a que el epitope está conformado por el polipéptido y la porción glicosídica.

Se han determinado cuatro estadios que comprenden el mecanismo de biosíntesis y transporte de DG-I: a) formación de un conjunto de proteína soluble nuclear glicosilada DG-I en el retículo endoplásmico; b) el transporte de proteínas al Complejo de Golgi (CG) para su glicosilación; c) titulación del complejo glicoprotéico hacia un grupo insoluble, y d) el transporte del grupo insoluble desde el CG, hacia la membrana plasmática.

La cantidad de manosa unida a DG-I, está en función de la actividad del CG y se requiere de 60 min aproximadamente para que DG-I sea conducida a la superficie de la membrana celular y se ensamble a otras proteínas formando así los desmosomas. En el camino del CG a la superficie de la membrana plasmática se puede detectar a esta molécula por inmunofluorescencia y por microscopía electrónica (56-57).

**XVI. CITOQUERATINAS**

Las células epiteliales contienen tonofilamentos (70 a 110 Å de diámetro) compuestos principalmente de queratinas; éstos se encuentran anclados en los desmosomas en mancha, sobre la superficie del lado citoplásmico (en el interior de la célula), junto con otro tipo de fibra intercelular la cual conecta las dos mitades de un desmosoma en mancha a través del espacio intercelular. Los filamentos de queratina forman parte de una red fibrosa que se extiende por toda la capa del epitelio y confiere al tejido su fuerza tensora, estos filamentos se acumulan en el citoplasma durante la vida de la célula y constituyen enlaces cruzados entre si y con otras proteínas.

La queratina es una proteína fibrosa y bastante insoluble que es codificada por una familia de genes y estabilizada por grupos disulfuro con residuos de cisteína frecuentes. La estructura típica de las proteínas de estos filamentos (filamentos intermedios) consiste de una formación helicoidal de dos o tres hebras enrolladas a su vez en una a hélice de unos 300 residuos de longitud (211).

**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En nuestro país las enfermedades hematológicas y oncológicas ocupan un lugar importante como causa de mortalidad. Ambos padecimientos tienen su origen en desequilibrios de regulación de la producción celular. De esta consideración surge la importancia de realizar investigación básica, enfocada al estudio de aspectos como la regulación de proliferación y diferenciación hematopoyética.

El presente estudio tiene como finalidad principal dilucidar el papel de los factores de crecimiento hematopoyético (CSF's) en la activación a la proliferación de células estromales, como fibroblastos y epitelios, así como proponer la integración de circuitos celulares y mecanismos reguladores mediante los cuales, en el proceso hematopoyético, participen células del estroma medular junto con los progenitores y CSF's.

Finalmente trata de contribuir a vislumbrar el conocimiento hacia una teoría acorde a la contemporaneidad que se tiene de la hematopoyesis y su importancia en la regulación del sistema inmune.

**H I P O T E S I S**

*Sabiendo que las células estromales participan en el proceso hematopoyético a través de la producción de los factores mitogénicos estimuladores de colonias (CSF's) y debido a su capacidad de responder a varios factores humorales secretados por ellas mismas, entre los que se encuentran factores mitogénicos, suponemos que los CSF's fabricados por células de médula ósea, induzcan a células normales del estroma tales como fibroblastos y células epiteliales a su proliferación, explicando así un probable mecanismo de retroalimentación entre células hematopoyéticas y estromales, que asegure una secreción de novo de factores controladores de la producción y diferenciación mieloide.*

**OBJETIVOS**

**GENERAL**

**ESTUDIAR EL POSIBLE EFECTO MITOGENICO DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO HEMATOPOYETICO (CSF 'B) RECOMBINANTES Y DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS PROVENIENTES DE CELULAS MIELOIDES NORMALES Y TRANSFORMADAS EN FIBROBLASTOS Y CELULAS EPITELIALES DE RATON.**

**OBJETIVOS PARTICULARES**

**-Establecer el tiempo en que las poblaciones de fibroblastos y epitelios de ratón en cultivo alcanzan la densidad de saturación.**

**-Evaluar el efecto proliferador de los medios condicionados provenientes de macrófagos residentes e inducidos de la cavidad peritoneal de ratones normales, así como los obtenidos de líneas celulares de tipo macrófágico WR19M.1 y carcinoma de vejiga humana 5637, sobre fibroblastos y células epiteliales de ratón normales.**

**-Determinar el efecto mitogénico de IL-3, GN-CSF, G-CSF y M-CSF sobre la proliferación de fibroblastos y células epiteliales de ratón.**

**MATERIALES Y METODOS****MATERIAL BIOLÓGICO**

En este trabajo se emplearon ratones hembras y machos de 4-6 semanas de edad y neonatos (10 días) de la cepa CD-1, a los cuales se les extrajeron pulmones, riñones y células de la cavidad peritoneal residentes e inducidas.

Se usaron líneas celulares de tipo macrofágico WR19M.1 y carcinoma de vejiga humana 5637.

**CULTIVOS CELULARES**

Los cultivos celulares se desarrollaron en cajas de petri de 60 x 15 mm y en placas de cultivo de 96 pozos (Costar, Cambridge, Massachusetts) con 5 y 0.2 ml respectivamente del medio mínimo esencial de Eagle (DMEM) (Gibco Laboratories, U.S.A.), al DMEM se le adicionó 100 µg/ml de estreptomycin, 100 U/ml de penicilina G y 3.7 g/l de bicarbonato de sodio, con la finalidad de evitar contaminación y mantener un pH de 7.2; este DMEM se complementó con 10% de suero fetal bovino (Microlab, México), previamente desactivado a 56°C durante 30 min. Los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora (Form Scientific, Division of Mallinckrodt, Inc. U.S.A.) a una temperatura de 37°C, con una atmósfera conteniendo 10% de CO<sub>2</sub> y humedad saturante a punto de rocío (95%).

**CELULAS**

Los fibroblastos de pulmón de ratón se obtuvieron por disgregación enzimática, empleando Colagenasa tipo IA (Sigma Chemical) al 0.05% en amortiguador de fosfatos (pH 7.2) a una temperatura de 37°C en periodos de 10 y 30 min. Se trabajó con el segundo disgregado, el cual se lavó dos veces con DMEM por centrifugación a 500 g durante 5 min. Se sembraron 2 x 10<sup>3</sup> células en placas



de cultivo de 60 x 15 mm, incubándose durante un período de 7 días. Los subcultivos se obtuvieron de estas células después de removerlas con tripsina al 0.05% en Verseno (pH 7.7) durante 5 min a 37°C. Todos los experimentos se realizaron a partir del segundo subcultivo, sembrando  $2.5 \times 10^5$  células fibroblásticas, en placas de cultivo de 96 micropozos de 200  $\mu$ l (Nunclon, Dinamarca).

Las células epiteliales de riñón fueron obtenidas por disgregación enzimática, usando Tripsina tipo II (Sigma Chemical) al 0.025% en amortiguador de fosfatos (pH 7.2) a una temperatura de 37°C en periodos de 5 y 15 min. Se trabajó con el segundo disgregado el cual se lavó dos veces con DMEM por centrifugación a 500 g durante 5 min. Se sembraron  $3 \times 10^5$  células en placas de cultivo de 60 x 15 mm incubándose durante un período de 4 días. Los subcultivos se obtuvieron de estas células al tratarlas con una solución de verseno (pH 7.7) durante 1 min a 37°C, posteriormente fueron removidas con tripsina al 1% en solución de verseno (pH 7.7) durante 5 min a 37°C. Los experimentos se realizaron a partir del segundo subcultivo sembrando  $5 \times 10^5$  células epiteliales, en placas de cultivo de 96 micropozos de 200  $\mu$ l (Nunclon, Dinamarca).

Los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal se obtuvieron lavando 3 veces la cavidad con 10 ml de solución salina de fosfatos fría (pH 7.2), posteriormente las células obtenidas se lavaron 3 veces con DMEM centrifugándolas a 500 g durante 5 min. A continuación se sembraron  $6 \times 10^6$  de estas células en DMEM complementado con 10% de suero de caballo (SC), dejándolas adherir durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se separaron las células no adherentes y se agregó DMEM fresco complementado con 10% de SC y 1 ng/ml de lipopolisacáridos de Salmonella typhimurium (Sigma, St. Louis Mo, USA) y se incubaron durante 4 días a 37°C.

Las células inducidas de la cavidad peritoneal se obtuvieron al inyectar intraperitonealmente 3 ml de caseinato de sodio (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) al 10% en solución salina de fosfatos (pH 7.2). Después de 4 días se recuperó el exudado peritoneal por medio de lavados con solución salina de fosfatos (pH 7.2). Una vez obtenidas las células se sembraron  $6 \times 10^6$  en DMEM complementado con 10% de SC, permitiéndoles adherirse durante una hora, al término de la cual se retiró el sobrenadante y se agregó DMEM fresco complementado con 10% de SC, dejándose incubar durante 4 días.

#### PREPARACION DE MEDIOS CONDICIONADOS

Se obtuvieron macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón y se sembraron  $8 \times 10^6$  de células en cajas Petri de 5 ml con DMEM complementado con 10% de SC. Los macrófagos se estimularon con 1 ng/ml de lipopolisacáridos bacterianos (LPS) de Salmonella typhimurium (Sigma, ST, Louis, Mo, USA). Las células se mantuvieron en cultivo durante 4 días y transcurrido este tiempo, se colectó el sobrenadante, siendo este el Medio Condicionado de Macrófagos residentes de la cavidad peritoneal.

Para obtener el Medio Condicionado de Macrófagos Inducidos de la cavidad peritoneal, los ratones se inyectaron con 3 ml de Caseinato de Sodio (Difco,

Laboratories, Detroit, Michigan) al 10% en solución salina, cuatro días después el ratón es sacrificado y la obtención de este medio condicionado se efectuó de la manera antes citada para células residentes.

Los medios condicionados de la línea celular macrofágica WR19M,1 y del carcinoma de vejiga humano 5637 se obtuvieron después de sembrar  $2 \times 10^5$  células en cajas de cultivo de 60 x 15 mm con DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) durante 4 días, al término de los cuales se colectó el sobrenadante, siendo este el medio condicionado utilizado en los ensayos de proliferación celular.

#### a) DETERMINACION DE DESMOGLEINA UNC (INMUNOFLOURESCENCIA)

La técnica de inmunofluorescencia se utilizó para determinar el origen epitelial de los cultivos celulares. Para ello, las células (fibroblastos y epitelios) se hicieron proliferar en cubreobjetos de vidrio y una vez que llegaron a confluencia fueron fijadas con metanol y permeabilizadas con acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 5 min. A continuación se incubaron con el anticuerpo policlonal antidesmogleina de conejo durante 30 min, posteriormente se incubaron con el conjugado de isotiocianato de fluoresceína y anti conejo (FITC), lavándose exhaustivamente entre las incubaciones con una solución amortiguadora tris (TBS) conteniendo 1% (p/v) de albúmina. Finalmente las células se montaron en una solución de glicerol al 90% en TBS y 1 mg/ml de paradifenildiamina (Sigma Chemical Co. U.S.A.).

Los desmosomas se obtuvieron gracias a la donación del Dr. Rubén Darío Martínez, quien los preparó a partir de epitelio de hocico de bovino (212), mientras que el anticuerpo antidesmogleina lo obtuvo del suero de conejos inmunizados con desmogleina.

#### b) DETERMINACION DE CITOQUERATINAS (INMUNOFLOURESCENCIA)

Se realizó citospin con  $5 \times 10^3$  células epiteliales y fibroblásticas, las cuales se fijaron con una solución de glutaraldehído al 1.1% en MC. durante 10 min. Posteriormente se permeabilizaron durante 5 min con una solución de tripsina tipo IV, recién preparada (Sigma Chemical, U.S.A.) al 0.025% en una solución buffer de fosfatos. Paso siguiente, las células se incubaron con una mezcla de suero fetal bovino y suero humano relación 1:10, durante 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Finalmente, se les adicionó el anticuerpo primario anticitoqueratina KG 8.13 (DAKO/AS Denmark), dejándose durante 45 min. Posteriormente, las células fueron sometidas al anticuerpo secundario GAM-FITC GOAT (DAKO/AS Denmark), durante 30 min en cámara húmeda y oscura a temperatura ambiente. Entre cada una de las incubaciones se lavó exhaustivamente con un amortiguador de fosfatos a pH 7.35-7.45, las células se contrastaron con colorante azul de Evans y se montaron con glicerol al 90% en solución amortiguadora de fosfatos. La observación de las células que mostraron fluorescencia se efectuaron con ayuda de microscopio de epifluorescencia (Olympus BH-2, Japon).

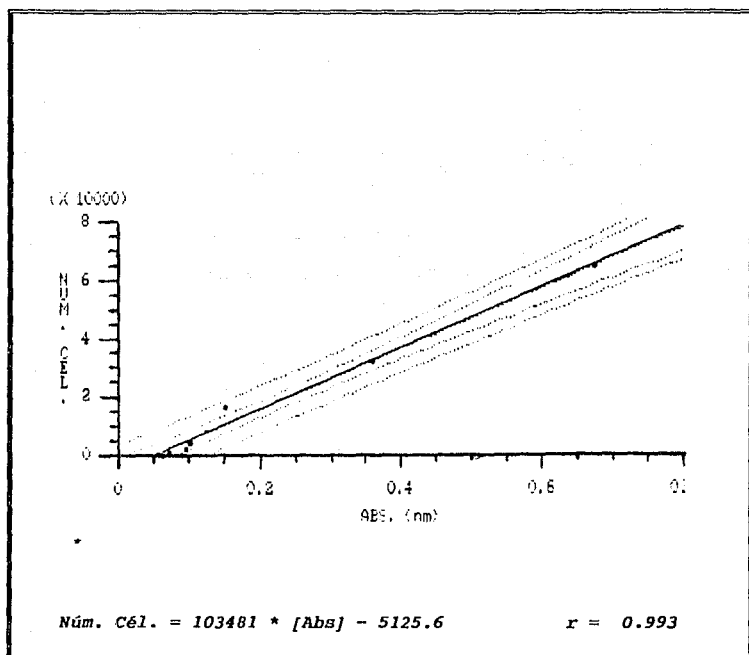
#### CINETICAS DE PROLIFERACION DE ESTIRPES CELULARES (TECNICA CRISTAL VIOLETA)

Para establecer el tiempo de duplicación (TD) de las poblaciones celulares (epiteliales y fibroblásticas), así como el tiempo de fase estacionaria (TFE) en el sustrato de cultivo, se realizaron subcultivos de cada una de las estirpes celulares obtenidas. Para ello se sembraron con la ayuda de una cámara de Neubauer (American Optical, U.S.A.) células epiteliales y fibroblásticas en placas de cultivo de 96 micropozos a una densidad de  $2.5 \times 10^3$  y  $5 \times 10^3$ /pozo, mismas que se mantuvieron en incubación durante 14 días respectivamente.

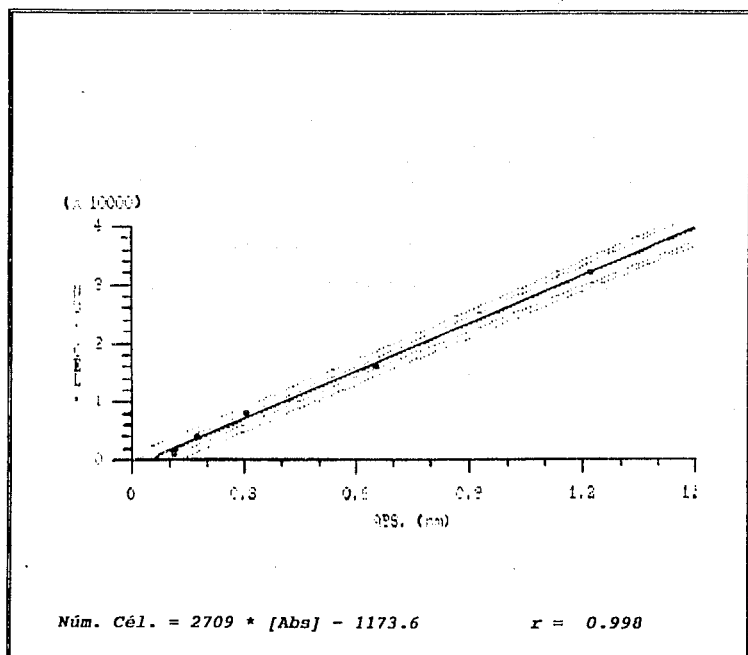
La evaluación celular, se realizó por la técnica de incorporación de cristal violeta, en la que, las células adheridas se fijaron con una solución de glutaraldehído al 1.1% en MC durante 10 min, posteriormente se lavaron con agua bidestilada y se tiñeron con solución de cristal violeta al 0.1% en amortiguador de ácido fórmico pH 6 durante 20 min con agitación mecánica vigorosa; las células se lavaron exhaustivamente con agua bidestilada y se secaron al aire, el colorante fijado en los núcleos celulares se extrajo con una solución de ácido acético al 10% en agua bidestilada durante 20 min.

Finalmente se efectuaron las lecturas en un aparato lector de ELISA MR-250 (Dinatech, Laboratories, U.S.A.) a una longitud de 590 nm.

Para determinar el número celular se procedió a la elaboración de curvas patrón para ambos tipos celulares, cuyas variables son absorbancia contra número celular, el cual es controlado. Los datos obtenidos experimentalmente como lecturas de absorbancia, son interpolados en esta curva (Figuras 3,4).



**FIGURA. 3** Curva de calibración de células epiteliales de riñón de ratón. Las variables son absorbancia y número celular. Las líneas punteadas indican los límites de confianza del ajuste de los datos a la ecuación.



**FIGURA. 4** Curva de calibración de células fibroblásticas de pulmón de ratón. Las variables son absorbancia y número celular. Las líneas punteadas indican los límites de confianza del ajuste de los datos a la ecuación.

**INDUCCION DE LA PROLIFERACION CELULAR POR CSF'S Y MEDIOS CONDICIONADOS (TECNICA DE INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA)**

Para evaluar el efecto mitogénico de los factores de crecimiento hematopoyético (CSF's) y de los medios condicionados (MC) provenientes de macrófagos residentes e inducidos de la cavidad peritoneal, así como de las líneas celulares de tipo macrófágico WR19M.1 y del carcinoma de vejiga humano 5637 sobre células epiteliales y fibroblásticas normales de ratón, se sembraron ambos tipos celulares a una densidad de  $2.5 \times 10^3$  y  $5 \times 10^3$  células/pozo respectivamente, durante 5 días en DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino. Transcurrido este tiempo se retiró el sobrenadante y los cultivos se lavaron dos veces con DMEM, posteriormente se adicionó 100  $\mu$ l de DMEM fresco libre de suero junto con los inductores a concentraciones de rhPDGF 2.5 ng, rhIL-2 1000 U, rhIL-3 100 ng/ml, rhGM-CSF 100 ng/ml, rmGM-CSF 100 ng/ml, rhG-CSF 250 ng/ml, rhM-CSF 50 ng/ml. Donde rh = recombinante humano y rm = recombinante murino.

Los medios condicionados se utilizaron a 25, 50, 75 y 100  $\mu$ l; incubándose por un período de 16 hrs, al término del cual se adicionaron 10  $\mu$ l de una solución de timidina tritiada con una actividad específica de 6.7 Ci/mmol (NEN Research Products, DUPONT, USA) al 10% en ME, dejándose incubar por 8 hrs. La reacción fué detenida por congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante media hora. La timidina que no fué incorporada al DNA celular, se eliminó por medio de lavados (dos) con solución amortiguadora de fosfatos fría (pH 7.2), una segunda serie de lavados (dos) con ácido tricloro-acético al 10% frío fué llevada a cabo. La cosecha celular se efectuó por succión al vacío empleando un cosechador (MH-12 Brandel). Finalmente se midió la incorporación de timidina tritiada, utilizando líquido de centelleo (Ready Safe, Beckman Instruments) y contador de centelleo (Beckman Instruments).

**CITOCINAS**

Las citocinas que se emplearon en esta investigación son las siguientes: Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) recombinante humano con actividad específica de 1-3 ng/ml, Interleucina 3 (IL-3) recombinante humana con una actividad de  $40 \times 10^6$  U/mg, Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) recombinante humano con actividad de  $40 \times 10^6$  U/mg de proteína, Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) recombinante humano con actividad de  $10^6$  CFU/mg de proteína, Factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) recombinante humano con actividad específica de  $2 \times 10^3$  U/mg, Interleucina 2 (IL-2) recombinante humana  $10 \times 10^3$  U/ml.  
U = Unidades formadoras de colonias.

Con excepción del M-CSF (Genzyme, Boston MA, EU), los CSF's fueron obtenidos de Immunex, Seattle WA, EU. La IL-2 fué donada amablemente por el M.D., Ph.D. Steven A. Rosenberg del Departamento de Cirugía, División del Tratamiento del Cáncer, Bethesda, Maryland, U.S.A.

El factor de crecimiento derivado de plaqueta PDGF se obtuvo de R&D Systems U.S.A.

Para las cinéticas de proliferación celular se efectuaron dos experimentos cada uno por duplicado.

Los ensayos de proliferación celular se llevarón a cabo de la siguiente manera: para las células fibroblásticas fuerón 5 los experimentos realizados, mientras que para las células epiteiales se efectuaron 4; cada experimento se realizó por triplicado.

Los datos cuantitativos obtenidos en los ensayos de proliferación celular (Tablas 11,12) fueron sometidos a un análisis multivariado denominado análisis de discriminantes (213), seleccionado por definir de manera cualitativa grupos de afinidad de respuesta, en este caso por parte de las células estromales con respecto a los factores de crecimiento hematopoyético. Es decir si dichas células responden de manera similar a más de un factor, esto se refleja en la formación de grupos de afinidad. A cada uno de los tipos celulares (epitelial y fibroblástico) se les aplicó de manera independiente dicho análisis.

Para reconocer la calidad de los datos experimentales se llevo a cabo un resumen estadístico de cada variable (inductores de crecimiento), para ello se utilizó los denominados diagramas de caja, conteniendo la prueba de Fpseudosigma, siendo esta de gran utilidad para comparar el nivel de las medianas, y detectar si existe o no diferencias significativas entre las variables. El diagrama de cajas es util en varias formas, por ejemplo nos determina los probables valores extremos que deben ser considerados con reserva para explicar el comportamiento de una variable. En nuestro caso, se utilizó como primer paso para seleccionar aquellos valores experimentales que se encontraron dentro del intervalo de confianza (caja y bigote) y utilizarlos en el análisis de discriminantes (214).

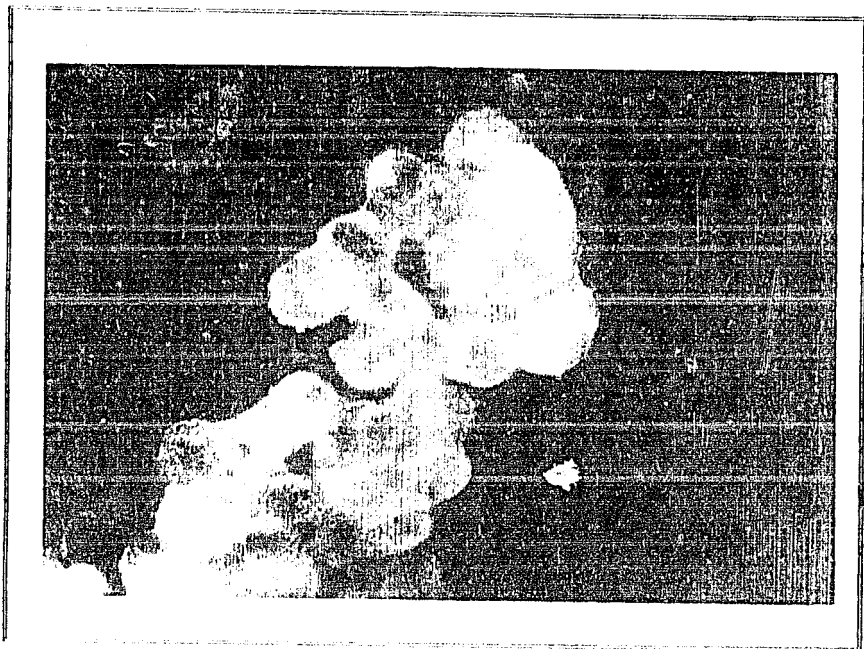
**RESULTADOS****PRUEBAS DE ANTIDESMOGLEINA Y ANTICITOQUERATINA EN LOS CULTIVOS CELULARES.**

Con la finalidad de corroborar el origen epitelial de los cultivos que por examen visual consistían de células con morfología epitelial, se evaluó mediante inmunofluorescencia la presencia de desmogleína (proteína característica de las uniones intercelulares de adherencia del tipo desmosómico de los epitelios) y citoqueratina (proteína que forma parte de los filamentos intermedios de queratina o tonofilamentos característicos de este tipo celular) en nuestros cultivos.

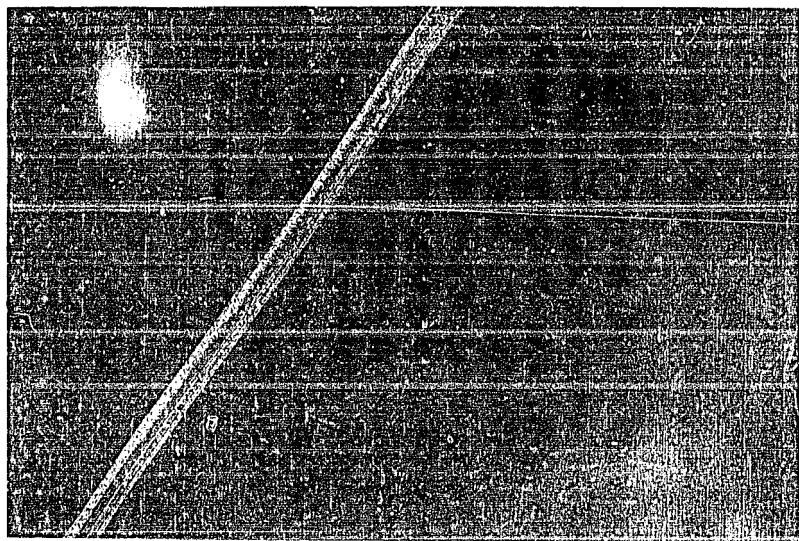
Los resultados son los siguientes: para desmogleína los cultivos que por observación se consideraron epiteliales, respondieron positivamente al anticuerpo en un 100%, mientras que aquellos considerados como fibroblastos presentan una respuesta negativa a este ensayo (datos no mostrados). La prueba de citoqueratinas se efectuó en los cultivos, Línea celular de carcinoma de vejiga humana 5637 (testigo positivo), fibroblastos de pulmón de ratón (testigo negativo), mezclas celulares consistentes de células epiteliales y fibroblásticas y por último a cultivos de células epiteliales. Para el testigo positivo la respuesta a citoqueratinas fué del 100 % (Fotografía 1), mientras que en el testigo negativo no hubo respuesta alguna (Fotografía 2); para los cultivos de mezcla celular la respuesta positiva fué de 30% (Fotografía 3), mientras que en los cultivos de epitelios lo fué de 90% (Fotografías 4 y 5). Los porcentos dados anteriormente, están referidos cualitativamente con respecto al total de la preparación observada al microscopio.

Así, sólo los cultivos que por observación fuerón considerados epitelios y que respondieron positivamente en ambas pruebas, se utilizaron en los experimentos como células epiteliales, mientras que aquellos con respuesta negativa en ambas pruebas se emplearon como células fibroblásticas (Tabla 10).

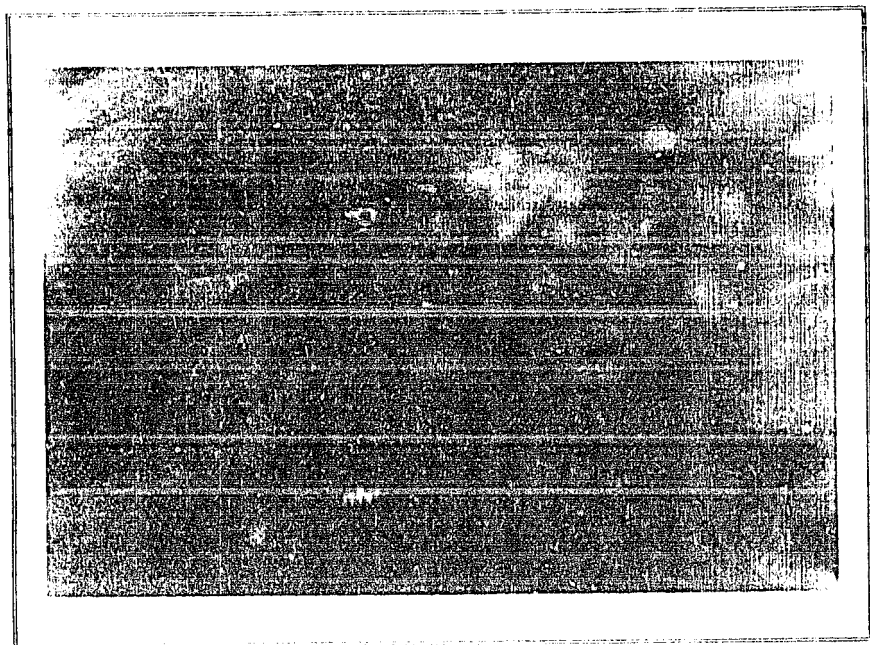




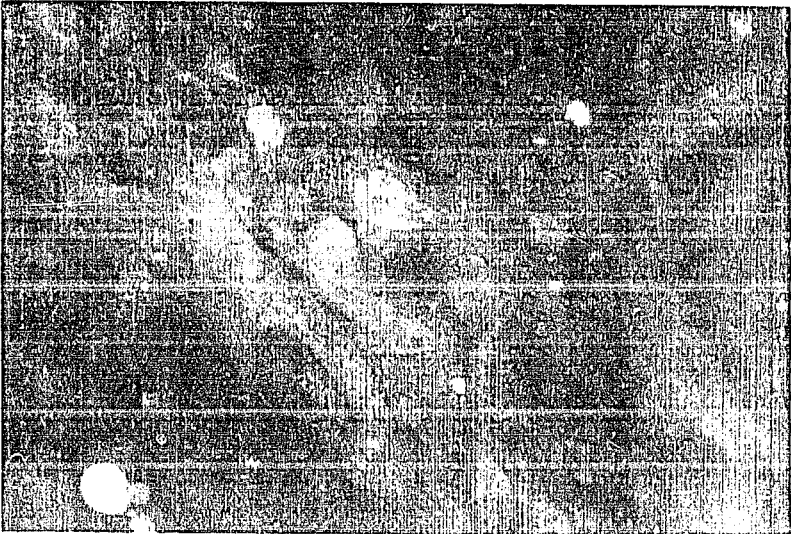
**Fotografía N°1** Prueba de citoqueratinas en células de carcinoma de vejiga humana 5637 marcadas con el anticuerpo GAM-FICT GOAT. Se observa una respuesta celular positiva al anticuerpo; el patrón de marcaje membranar y citoplásmico indica inespecificidad.



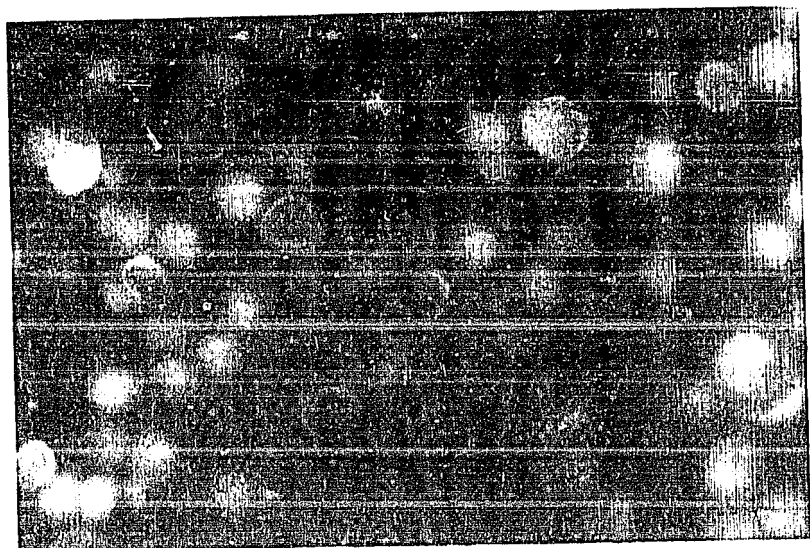
*Fotografía N2. Prueba de citoqueratinas en fibroblastos de pulmón de ratón, se observa una respuesta negativa al anticuerpo GAN-FICT GOAT.*



Fotografía N3 Prueba de citoqueratinas en cultivos mixtos de células epiteliales y fibroblásticas. La flecha indica algunas de las células epiteliales marcadas con el anticuerpo GAM-FICT GOAT. Las células fibroblásticas no respondieron a este anticuerpo.



Fotografía #4 Prueba de citoqueratinas en células epiteliales de riñón de ratón marcadas con el anticuerpo GAF-FICT CGAT. Se observa una respuesta celular positiva al anticuerpo, el patrón de marcaje es membranoso y citoplásmico.



Fotografía N°5 Prueba de citoqueratinas en citospin de células epiteliales de riñón de ratón, la flecha indica un patrón de marcaje membranar.

TABLA 1C. PRUEBAS DE DESMOGLEINA Y CITOQUERATINAS DE LAS ESTIRPES CELULARES OBTENIDAS EN CULTIVO

ESTIRPE CELULAR	MORFOLOGIA CELULAR	RESPUESTA AL ANTICUERPO	PATRON DE TINCION
<u>PARA DESMOGLEINA</u>		<u>ANTI-DG</u>	
EPITELIO DE RIÑON	EPITELIAL	(+)	CITOPLASMICO GRANULAR
FIBROBLASTO DE PULMON	FIBROBLASTICA	(-)	
<u>PARA CITOQUERATINAS</u>		<u>ANTI-CIT</u>	
CARCINOMA DE VEJIGA HUMANA 5637 (TESTIGO +)	EPITELIAL	(+)	CITOPLASMICO MEMBRANA
FIBROBLASTO (CONTROL -)	FIBROBLASTO	(-)	
EPITELIO Y FIBROBLASTO (MEZCLA)	EPITELIAL FIBROBLASTO	(+) (-)	CITOPLASMA
EPITELIO (CITOSPIN)	EPITELIAL	(+)	CITOPLASMA MEMBRANA
ANTICUERPOS ANTI-DG =	ANTIDESMOGLEINA		
ANTICUERPOS ANTI-CIT =	ANTICITOQUERATINA		

CINETICAS DE PROLIFERACION

Con el propósito de conocer algunos parámetros cinéticos, como el tiempo de duplicación celular (TD) y tiempo de obtención de fase estacionaria (TFE) en nuestras condiciones de cultivo, se realizaron las cinéticas de proliferación de las células epiteliales y fibroblastos.

Para las células epiteliales se obtuvo un TD de 33 hrs, y 5 días para TFE, ya que a partir del día 6 se detectó una disminución en el número celular manteniéndose éste hasta el día 14 (Figura 5).

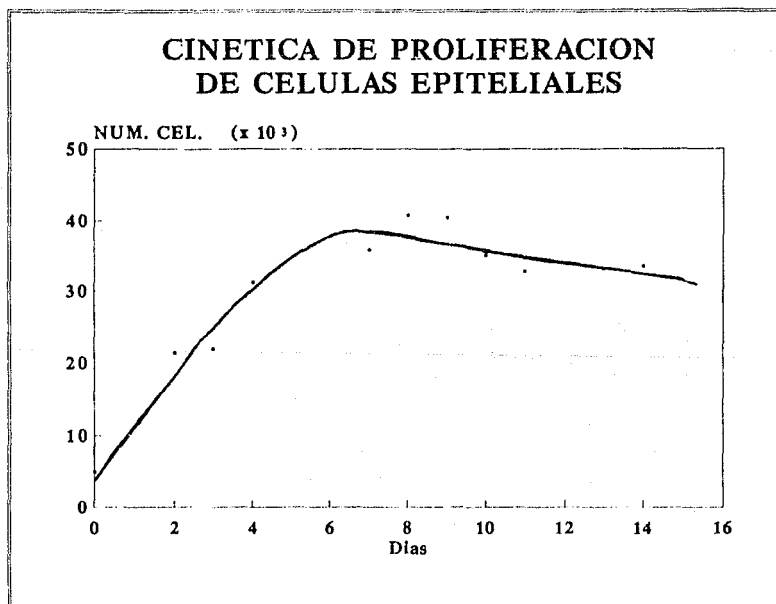


Figura. 5 Cinética de proliferación de células epiteliales. El número inicial de células sembradas en pozos de 200  $\mu$ l fué de  $5 \times 10^3$ .

## CINETICA DE PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS

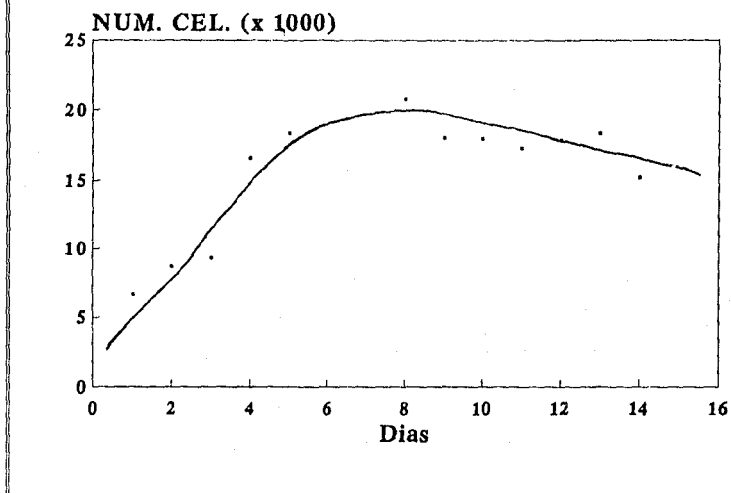


Figura. 6 Cinética de proliferación de fibroblastos. El número inicial de células sembradas en pozos de 200  $\mu$ l fué de  $2.5 \times 10^3$ .

La evaluación de TFE nos permite determinar el momento en el cual las células se encuentran en estado quiescente y por tanto susceptibles de responder a estímulos mitogénicos.

Los fibroblastos muestran un TD menor que aquel de los epitelios, siendo éste de 27 hrs y el TFE se alcanzó entre el quinto y sexto día, observándose una ligera disminución en el número celular hasta el catorceavo (Figura 6).



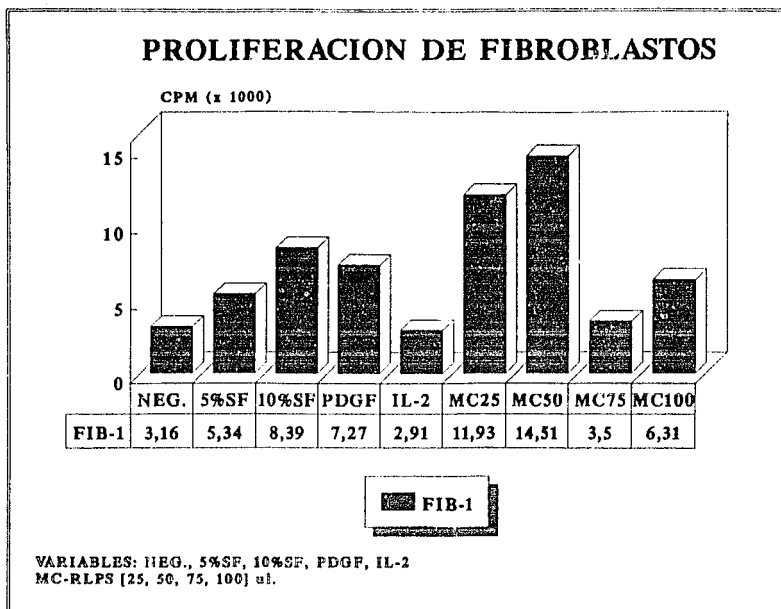
**LOS MEDIOS CONDICIONADOS POR MACROFAGOS RESIDENTES Y POR LA LINEA DE TIPO MACROFAGICO WR19M.1 INDUCEN UN EFECTO MITOGENICO SIMILAR SOBRE FIBROBLASTOS Y CELULAS EPITELIALES**

---

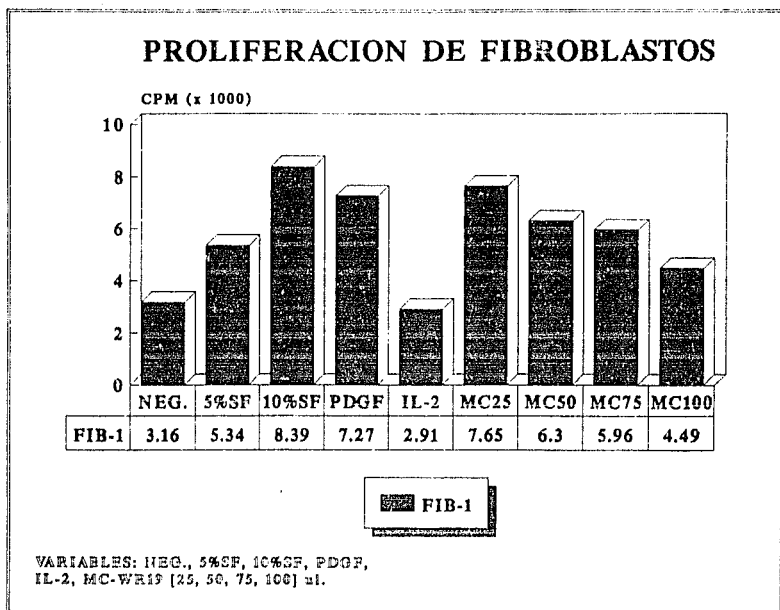
Con la finalidad de determinar si existe un vínculo entre células hematopoyéticas y células estromales y tomando en consideración el hecho de que células del linaje monocito-macrófago al ser estimuladas por citocinas (M-CSF), producidas por tipos celulares específicos en proliferación activa (fibroblastos), liberan una molécula que es capaz de estimular la formación de colonias granulocíticas (6). Se evaluó si en los MC provenientes de macrófagos residentes e inducidos de la cavidad peritoneal y de la línea de tipo macrófago WR19M.1 también existe actividad mitogénica para células epiteliales y fibroblásticas. Con esta finalidad se cultivaron  $2.5 \times 10^3$  y  $5 \times 10^3$  células fibroblásticas de pulmón de ratón y epiteliales de riñón de ratón respectivamente durante 5 días hasta alcanzar sus TFE, al término de éste se adicionaron diferentes cantidades de cada uno de los MC. Se utilizaron también 2.5 ng de PDGF como testigo positivo en los ensayos con fibroblastos, un testigo recombinante negativo con 1000 U/ml de IL-2 y un cultivo sin inductor en ausencia de suero fetal bovino.

Al efectuar la dosis-respuesta con diferentes cantidades del MC por macrófagos residentes, se observó una fuerte inducción de la proliferación para fibroblastos, a concentraciones de 25 y 50  $\mu$ l (MC25 y MC50) mientras que para las concentraciones mayores fué considerablemente más baja (Gráfica F-1). Consideramos que esta reducción puede ser debida a la posible liberación de factores inhibidores o algún efecto citotóxico en los MC. Como era de esperarse en este ensayo la inducción a la proliferación aumentó a medida que se incrementó la concentración de suero en el cultivo, así como una respuesta positiva al utilizar el PDGF y una negativa con el IL-2. Por otro lado, al utilizar el MC de la línea WR19M.1 el mayor efecto proliferador lo obtuvimos con la menor concentración de 25  $\mu$ l (MC25) disminuyendo éste a medida que se incrementaba la concentración del MC (Gráfica F-2). Análogamente se notó un aumento en la proliferación conforme se elevaba la concentración de suero y con PDGF, mientras que no hubo ninguna con IL-2. Cabe destacar que en ambos ensayos el efecto observado con 25  $\mu$ l fué un poco mayor que aquel dado por PDGF, siendo éste un mitógeno conocido para este tipo celular.

Como en estos ensayos encontramos que la cantidad de MC de 25  $\mu$ l proporcionaba una fuerte inducción a la proliferación, consideramos pertinente utilizar para nuestros ensayos posteriores esta concentración. Los resultados obtenidos (Gráficas F-3, E-1, E-2) muestran que los MC por macrófagos residentes de la cavidad peritoneal estimulados con LPS (RLPS) y por la línea WR19M.1 (WR19) ejercen un efecto mitogénico similar sobre fibroblastos y epitelios, siendo ligeramente mayor el dado por los macrófagos residentes; así mismo, se observó que el MC por macrófagos inducidos de la cavidad peritoneal activados con LPS (ILPS) inhiben la proliferación de fibroblastos, pero no así la de epitelios, donde actúa como proliferador dando una respuesta similar que el MC de WR19.

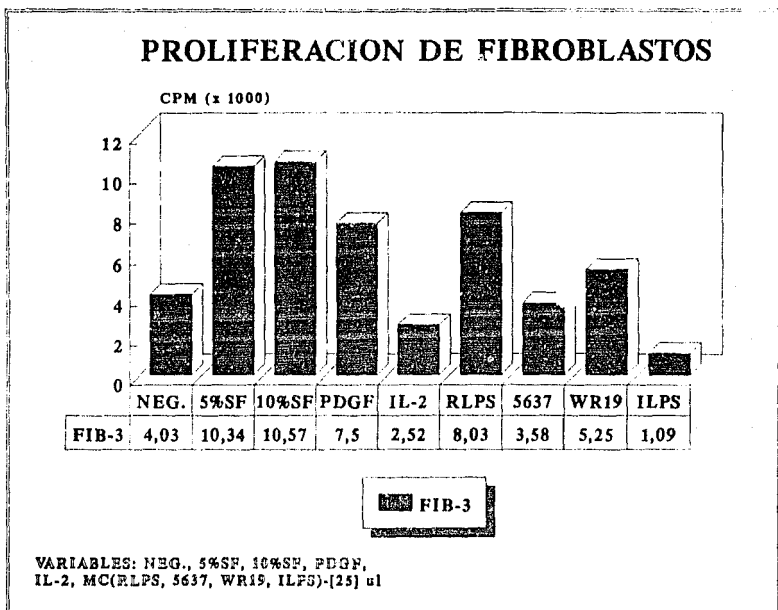


**GRAFICA F-1.** Evaluación de la proliferación de fibroblastos de pulmón (incorporación de timidina tritiada) en presencia de diferentes concentraciones del medio condicionado de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal (MC-RPLS); testigo positivo PDGF 2.5 ng; testigo negativo IL-2 1000 U y 0% de suero fetal bovino (NEG).

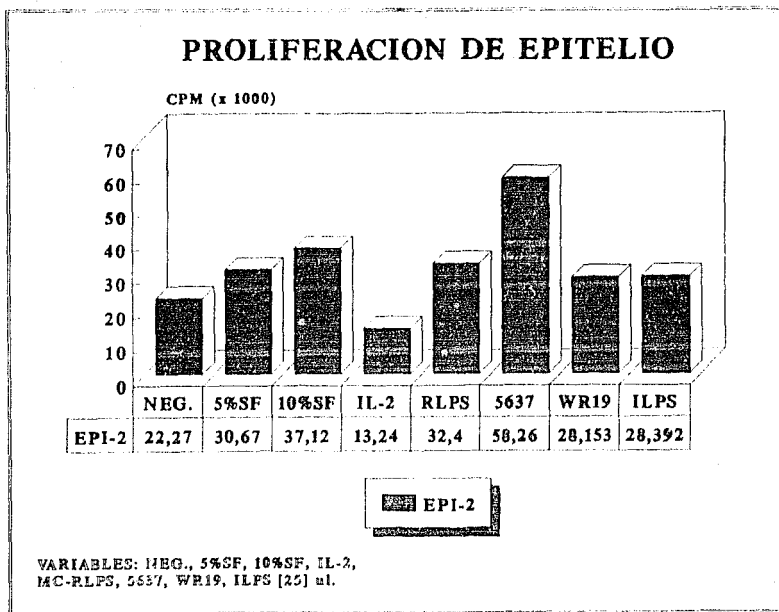


GRAFICA F-2.

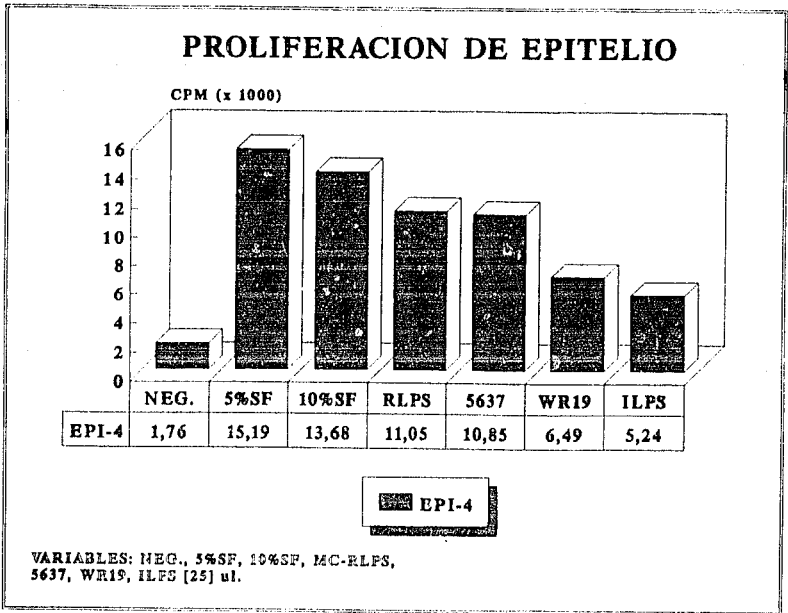
Evaluación de la proliferación de fibroblastos de pulmón (incorporación de timidina tritiada) en presencia de diferentes concentraciones del medio condicionado de la línea macrofágica WR19M.1; testigo positivo PDGF 2.5 ng; testigo negativo IL-2 1000 U y 0% de suero fetal bovino (NEG).



**GRAFICA F-3.** Evaluación de la proliferación de fibroblastos de pulmón (incorporación de timidina tritiada) en presencia de los medios condicionados de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón (RLPS), del carcinoma de vejiga humana 5637 (MC-5637), de la línea celular macrófagia WR19H.1 (WR19) y de macrófagos inducidos de la cavidad peritoneal de ratón (ILPS), todos a una concentración de 25  $\mu$ l; testigo positivo PLGF 2.5 ng, testigo negativo IL-2 1000 U y 0% de suero fetal bovino (NEG).



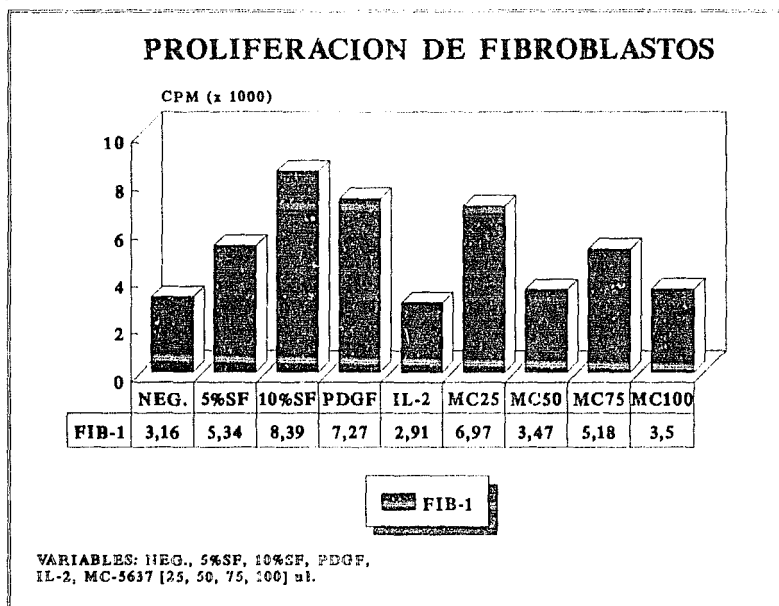
**GRAFICA R-1** Evaluación de la proliferación de células epiteliales de riñón (incorporación de timidina tritiada) en presencia de los medios condicionados de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón (RLPS), del carcinoma de vejiga humana 5637 (5637), de la línea celular macrofágica WR19M.1 (WR19) y de macrófagos inducidos de la cavidad peritoneal de ratón (ILPS), todos a una concentración de 25  $\mu$ l; testigo positivo PDGF 2.5 ng, testigo negativo IL-2 1000 U. y 0% de suero fetal bovino (NEG).



**GRAFICA S-2.** Evaluación de la proliferación de células epiteliales de riñón (incorporación de timidina tritiada) en presencia de los medios condicionados de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón (RLPS), del carcinoma de vejiga humana 5637 (5637), de la línea celular macrófagica WR19M.1 (WR19) y de macrófagos inducidos de la cavidad peritoneal de ratón (ILPS), todos a una concentración de 25  $\mu$ l; testigo negativo 0% de suero fetal bovino (NEG).

**EL MEDIO CONDICIONADO POR LA LINEA CELULAR DE CARCINOMA DE VEJIGA HUMANA (5637) INDUCE LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS Y EPITELIOS DE RATON**

Con base en los resultados obtenidos anteriormente acerca de que el medio condicionado de macrófagos residentes rico en G-CSF (215), induce la proliferación de células estromales, se consideró pertinente determinar el posible efecto mitogénico del medio condicionado por la línea celular 5637 que es conocida como una fuente secretora de G-CSF. Para ello se efectuaron ensayos utilizando 2500 fibroblastos en presencia de diferentes concentraciones del MC de la línea 5637; como en ensayos anteriores se utilizó PDGF (2.5 ng) como testigo positivo y 1000 U/ml de IL-2 como testigo negativo. La Gráfica F-4 muestra que a una concentración de 25  $\mu$ l del MC se presenta la máxima incorporación de timidina tritiada, siendo este resultado similar al obtenido con PDGF.



GRAFICA F-4. Evaluación de la proliferación de fibroblastos de pulmón (incorporación de timidina tritiada) en presencia de diferentes concentraciones del medio condicionado del carcinoma de vejiga humana 5637 (MC-5637); testigo positivo PDGF 2.5 ng; testigo negativo IL-2 1000 U y 0% de suero fetal bovino (NEG).

En la Gráfica F-3 se observa que los MC por las líneas celulares 5637 y WR19 M.1 (WR19) presentan capacidades mitogénicas similares.

La respuesta que presentaron las células epiteliales al MC por la línea 5637 se muestra en las Gráficas E-1 y E-2, donde se observa una mayor proliferación con este MC que con aquellos de macrofagos y la línea WR19. Consideramos que esta gran inducción a la proliferación del MC proveniente de una fuente celular epitelial para células de este mismo origen puede relacionarse con la secreción de factores endógenos encargados de mantener la viabilidad y la proliferación de este tipo de células.

#### **LOS FACTORES DE CRECIMIENTO HEMATOPOYETICO EJERCEN UN EFECTO MITOGENICO DIFERENTE SOBRE FIBROBLASTOS Y CELULAS EPITELIALES**

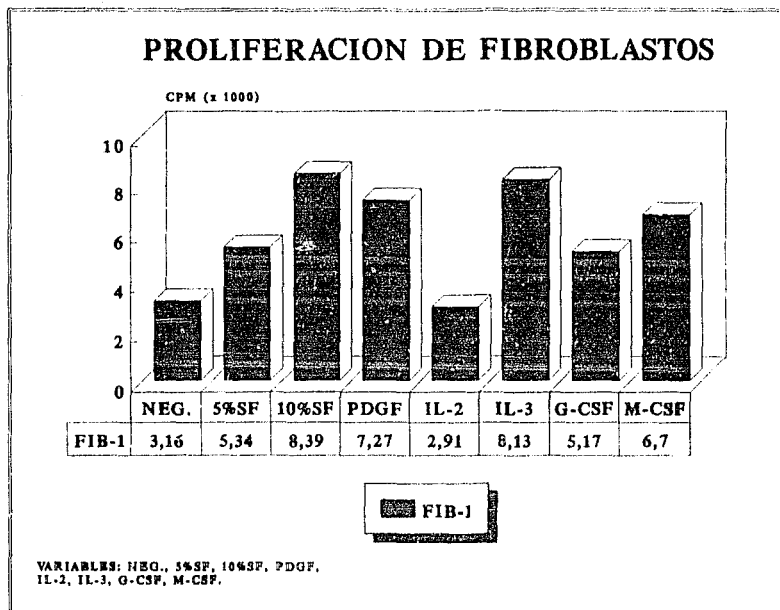
---

Los resultados anteriores nos condujeron a suponer que el G-CSF pudiera ser el factor que inducía la proliferación de fibroblastos. En consecuencia y con la finalidad de apoyar esta hipótesis se empleó G-CSF recombinante humano para evaluar su posible efecto mitogénico en fibroblastos. Tal como se esperaba, dicho factor resultó tener un fuerte efecto mitogénico sobre este tipo celular (Gráfica F-5). Todos estos hallazgos junto con los datos acerca de que GM-CSF también induce actividad mitogénica en carcinomas de células pequeñas de pulmón (2) y estimula la proliferación de células endoteliales (75), nos inducen a pensar en la posibilidad de que otros factores de crecimiento hematopoyético pudieran también presentar la capacidad de afectar la proliferación de células no hematopoyéticas.

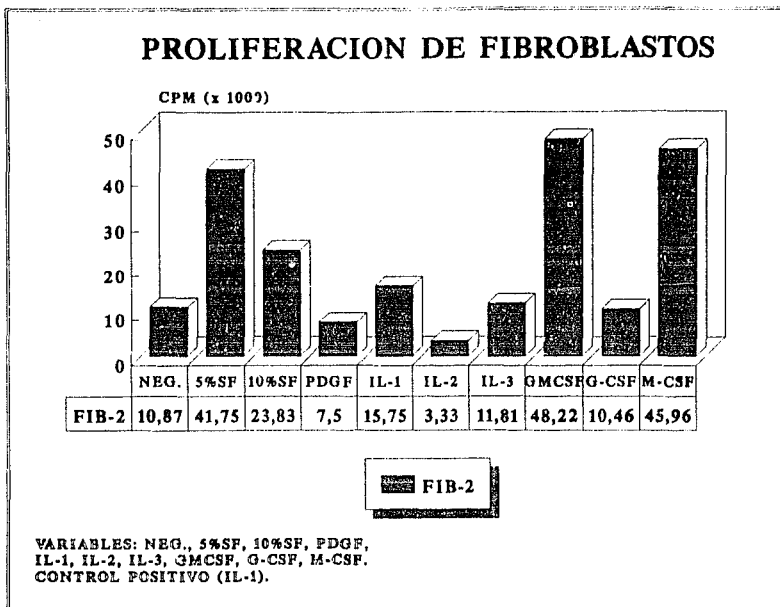
Los resultados obtenidos muestran una respuesta diferente de los fibroblastos y epitelios a los CSF's. De manera general se observa que el M-CSF ejerce el máximo efecto estimulador a la proliferación en células fibroblásticas (Gráficas F-5, F-6, F-7, F-8, F-9 y F-10). Tomando en consideración que el M-CSF es una proteína producida constitutivamente por este tipo celular puede suponerse que el efecto mitogénico dado por el factor recombinante estuvo potenciado por la cantidad de proteína (CSF-1) liberada al medio *in situ*. En orden de intensidad de respuesta, GM-CSF también produce efecto mitogénico aunque menor que la proteína anterior sobre las células fibroblásticas; aunque M-CSF y GM-CSF son factores que sinergizan para estimular proliferación, en nuestros ensayos no se detecta sinergismo entre el factor producido endógenamente y la citocina exógena.

En lo que respecta a IL-3 y G-CSF, de manera general, ambas proteínas presentaron un efecto proliferador similar, según se observa en las gráficas citadas anteriormente; aunque su efecto mitogénico es moderado, se detecta que representan en número de cuentas, aproximadamente el doble con respecto al negativo.

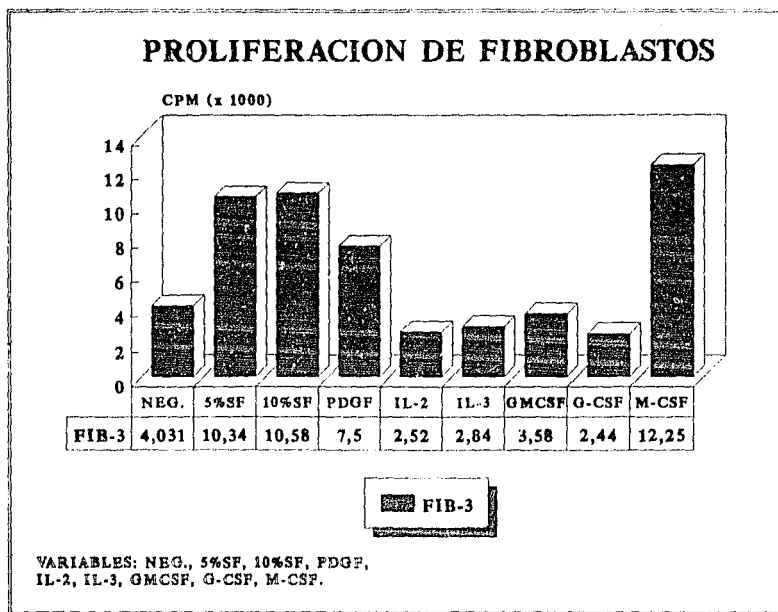




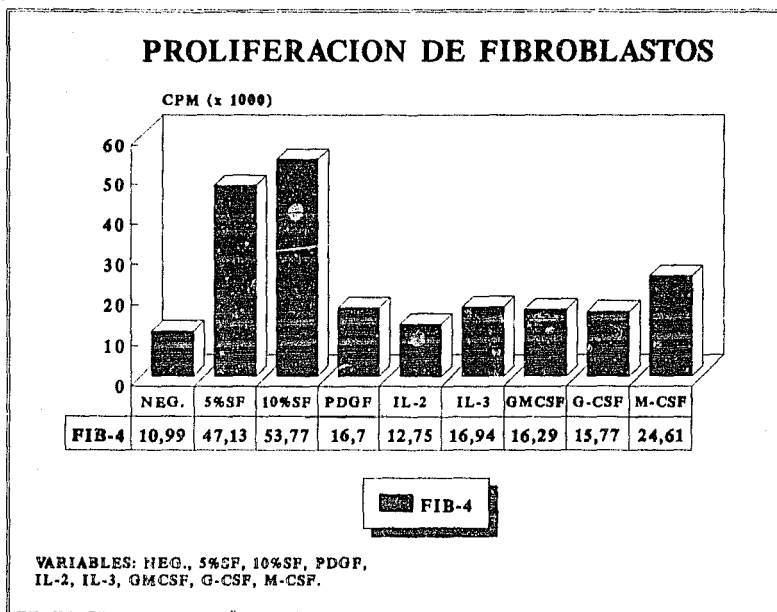
**GRAFICA F-5.** Evaluación de la proliferación de fibroblastos de pulmón (incorporación de timidina tritiada) en presencia de diferentes inductores, rhIL-3 100 ng, rhG-CSF 250 ng, rhM-CSF 50 ng; testigo positivo PDGF 2.5 ng; testigo negativo IL-2 1000 U y 0% de suero fetal bovino (NEG).



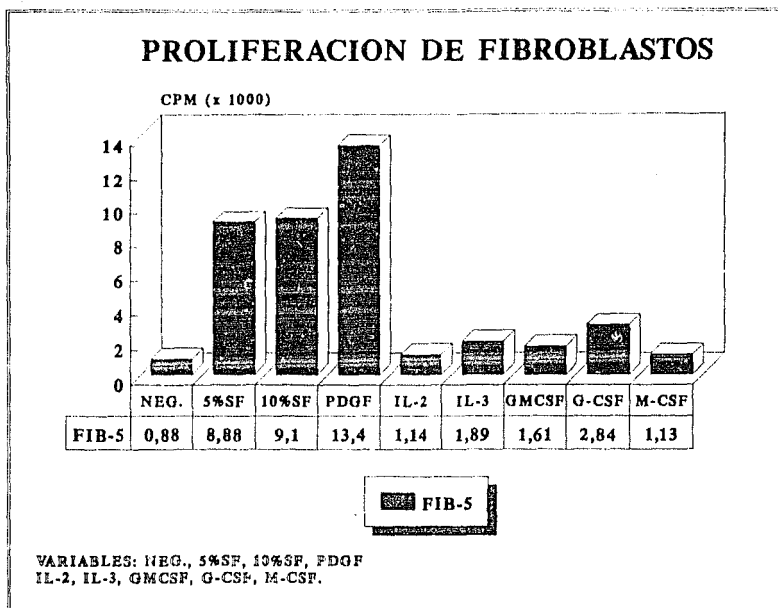
**GRAFICA F-6.** Evaluación de la proliferación de fibroblastos de pulmón (incorporación de timidina tritiada) en presencia de diferentes inductores, rhIL-3 100 ng, rhGM-CSF 100 ng, rhG-CSF 250 ng, rhM-CSF 50 ng; testigo positivo PDGF 2.5 ng e IL-1 100 ng; testigo negativo IL-2 1000 U y 0% de suero fetal bovino (NEG).



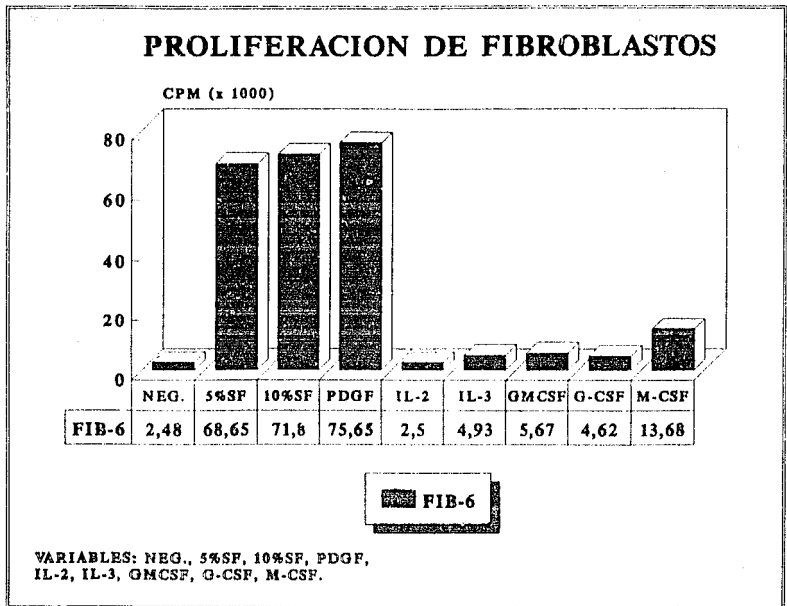
**GRAFICA F-7.** Evaluación de la proliferación de fibroblastos de pulmón (incorporación de timidina tritiada) en presencia de diferentes inductores, rhIL-3 50 ng, rhGM-CSF 50 ng, rhG-CSF 100 ng, rhM-CSF 50 ng; testigo positivo PDGF 2.5 ng; testigo negativo IL-2 1000 U y 0% de suero fetal bovino (NEG).



**GRAFICA F-8.** Evaluación de la proliferación de fibroblastos de pulmón (incorporación de timidina tritiada) en presencia de diferentes inductores, rhIL-3 200 ng, rhGM-CSF 100 ng, rhG-CSF 350 ng, rhM-CSF 50 ng; testigo positivo PDGF 2.5 ng; testigo negativo IL-2 1000 U y 0% de suero fetal bovino (NEG).

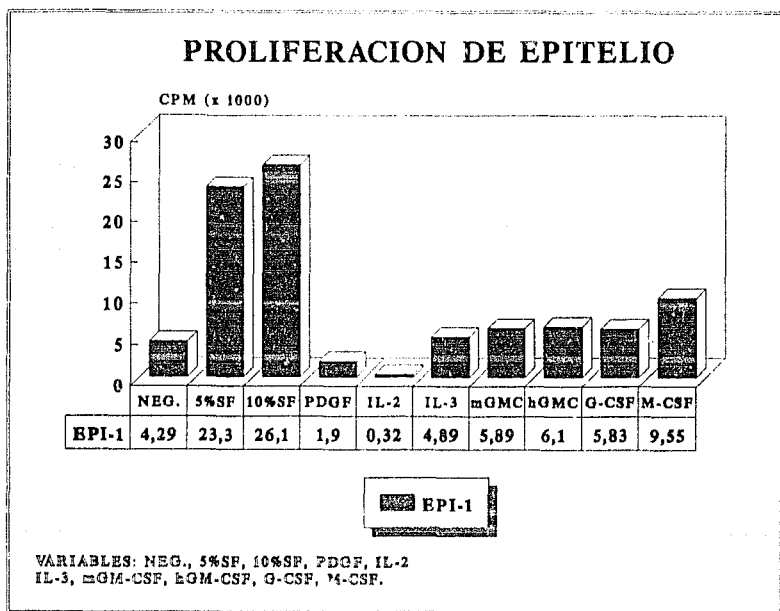


**GRAFICA F-9.** Evaluación de la proliferación de fibroblastos de pulmón (incorporación de timidina tritiada) en presencia de diferentes inductores, rhIL-3 200 ng, rhGM-CSF 200 ng, rhG-CSF 350 ng, rhM-CSF 50 ng; testigo positivo PDGF 2.5 ng; testigo negativo IL-2 1000 U y 0% de suero fetal bovino (NEG).

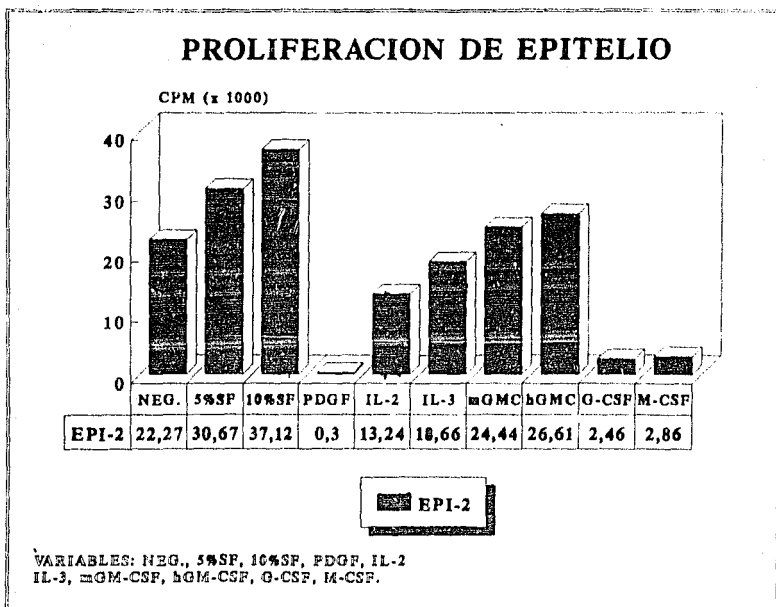


**GRAFICA F-10.** Evaluación de la proliferación de fibroblastos de pulmón (incorporación de timidina tritiada) en presencia de diferentes inductores, rhIL-3 200 ng, rhGM-CSF 200 ng, rhG-CSF 350 ng, rhM-CSF 50 ng; testigo positivo PDGF 2.5 ng; testigo negativo IL-2 1000 U y 0% de suero fetal bovino (NEG).

Se obtuvo una respuesta mitogénica alternada por células epiteliales a los factores GM-CSF y M-CSF, ya que en algunos ensayos la respuesta de ambos fué equiparable, mientras que en otros predominó notablemente uno u otro (Gráficas E-3, E-4, E-5 y E-6). Para IL-3 se presentó un comportamiento bastante similar al patrón de referencia negativo (NEG); finalmente G-CSF tuvo un comportamiento similar a IL-3. Por otro lado considerando la respuesta de las células epiteliales y fibroblásticas a IL-2, en las primeras se presenta una inhibición celular, mientras que en las fibroblásticas sus conteos son menores con respecto al control NEG, aún cuando no tan notable como en los conteos de epitelio.

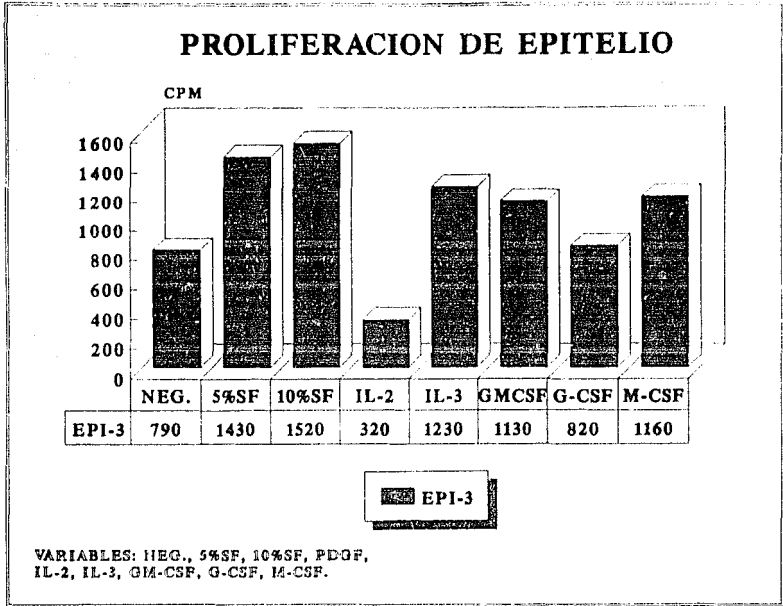


**GRAFICA E-3.** Evaluación de la proliferación de células epiteliales de riñón (incorporación de timidina tritiada) en presencia de diferentes inductores, rhIL-3 200 ng, rmGM-CSF 100 ng, rhGM-CSF 100 ng, rhG-CSF 250 ng, rhM-CSF 50 ng, testigo positivo 10% de suero fetal bovino (10%SF); testigo negativo IL-2 1000 U, PDGF 2.5 ng y 0% de suero fetal bovino (NEG). rh = factor recombinante humano; rm = factor recombinante murino.

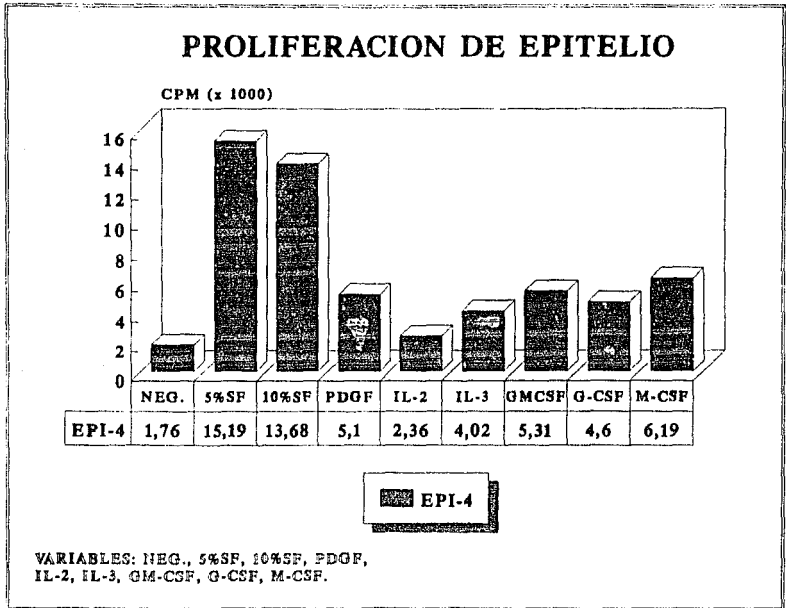


**GRAFICA B-4.** Evaluación de la proliferación de células epiteliales de riñón (incorporación de timidina tritiada) en presencia de diferentes inductores, rhIL-3 250 ng, rmGM-CSF 200 ng, rhGM-CSF 200 ng, rhG-CSF 350 ng, rhM-CSF 50 ng, testigo positivo 10% de suero fetal bovino (10%SF); testigo negativo IL-2 1000 U, PDGF 2.5 ng y 0% de suero fetal bovino (NEG). rh = factor recombinante humano; rm = factor recombinante murino.





GRAFICA E-5. Evaluación de la proliferación de células epiteliales de riñón (incorporación de timidina tritiada) en presencia de diferentes inductores, rhIL-3 200 ng, rhGM-CSF 200 ng, rhG-CSF 350 ng, rhM-CSF 250 ng; testigo positivo 10% de suero fetal bovino (10%SF); testigo negativo IL-2 1000 U y 0% de suero fetal bovino (NEG).



**GRAFICA E-6.** Evaluación de la proliferación de células epiteliales de riñón (incorporación de timidina tritiada) en presencia de diferentes inductores, rhIL-3 300 ng, rhGM-CSF 200 ng, rhG-CSF 350 ng, rhM-CSF 50 ng; testigo positivo 10% de suero fetal bovino (10%SF); testigo negativo IL-2 1000 U, PDGF 2.5 ng y 0% de suero fetal bovino (NEG).

Por último, se efectuó un análisis de discriminantes para corroborar las relaciones de afinidad de respuesta que presentan las células estromales a cada uno de los CSF's (Tablas 11, 12), dicha respuesta se detecta por medio de la formación de grupos que contienen a los factores que ejercen efecto mitogénico similar sobre los tipos celulares. Cada uno de los factores se aplicó de manera independiente, obteniéndose lo siguiente: La gráfica F-11 muestra la inducción de las células fibroblásticas a la conjunción de un primer grupo integrado por IL-2 y ausencia de suero fetal bovino (NEG), el segundo, está conformado por G-CSF e IL-3, mientras que 5%SF y 10%SF de suero fetal bovino representan a un tercer grupo, el cuarto grupo lo forman M-CSF y GM-CSF y finalmente PDGF permanece aislado.

Para las células epiteliales, dos son los grupos obtenidos, el primero estructurado por los factores hematopoyéticos G-CSF, IL-3 y GM-CSF, el segundo por 5%SF y 10%SF, y de manera independiente, se localizan a PDGF, IL-2, M-CSF y NEG (Gráfica E-7).

De los diagramas de caja y Fpseudosigma, se obtuvo para los datos de cultivos de fibroblastos, que los inductores con mayor efecto mitogénico son 5 y 10% de suero fetal, seguidos de M-CSF y PDGF, aún cuando se observa una ligera respuesta a GM-CSF, G-CSF e IL-3 con respecto al testigo negativo (NEG). IL-2 produjo respuesta de inducción a la proliferación similar al NEG (Gráfica F-12).

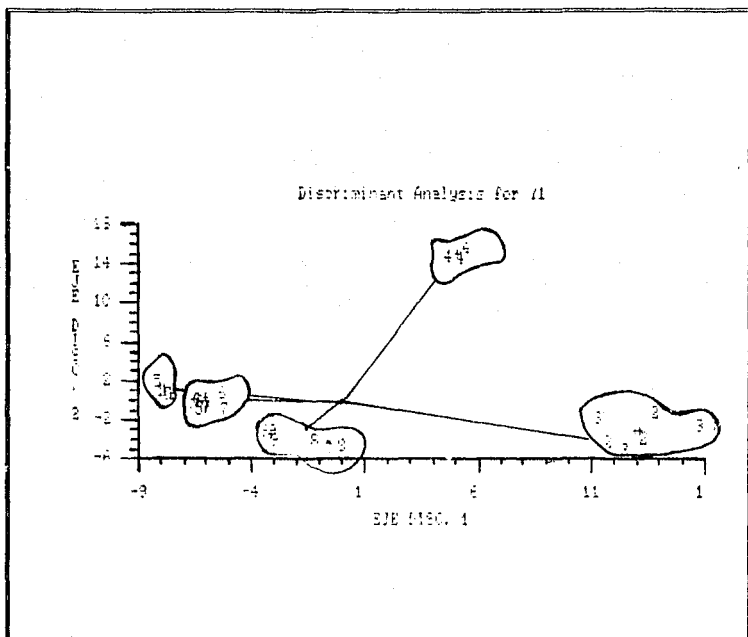
Los inductores que mayor efecto mostrarán para estimular a las células epiteliales a proliferar, según la prueba estadística de Fpseudosigma, son en orden decreciente, 10 y 5% SF, M-CSF, GM-CSF y G-CSF. IL-3 tuvo un comportamiento similar al testigo negativo NEG; mientras que IL-2 y PDGF mostrarán un efecto muy por debajo del testigo negativo (Gráfica E-8)

TABLA 11. DATOS OBTENIDOS DE CADA REPETICION EXPERIMENTAL  
CON FIBROBLASTOS PARA CADA UNO DE LOS FACTORES Y TESTIGO.

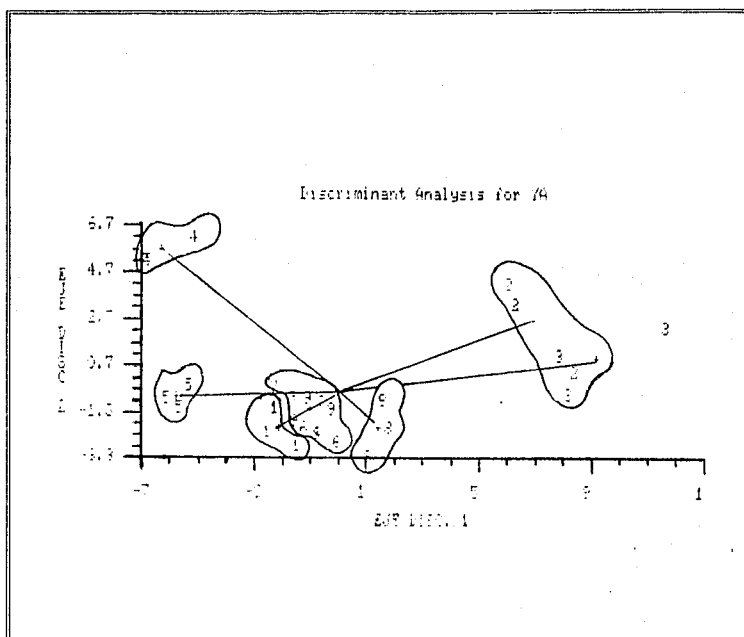
FACTORES	E-I	E-II	E-III	E-IV	E-V
NFG.	12,795	1,961	10,470	883	2,486
	2,646	3,363	14,447	1,363	2,478
	8,950	4,648	11,511	408	3,570
5XSF	23,034	13,634	50,028	10,631	81,316
	46,637	11,607	46,803	8,204	75,312
	36,870	9,075	47,450	9,559	61,981
10XSF	25,146	9,173	53,542	8,254	71,430
	22,511	10,535	46,770	9,096	72,170
	31,226	10,619	53,996	9,946	92,890
PDGF	21,309	21,000	9,211	13,002	71,448
	9,361	5,638	12,492	20,447	64,486
	5,638	9,670	13,693	13,808	79,853
IL-2	3,342	4,013	10,950	900	5,145
	3,315	2,470	19,056	1,150	6,287
	2,329	1,069	14,558	1,100	4,620
G-CSF	5,580	2,347	17,259	2,256	4,075
	12,407	2,090	15,572	4,468	4,175
	8,507	2,874	15,965	1,787	4,972
IL-3	16,829	4,046	17,080	2,153	4,957
	11,159	2,724	15,421	1,074	4,335
	12,458	2,964	16,797	1,624	4,889
M-CSF	49,728	8,121	19,429	984	13,275
	42,131	13,131	24,422	1,106	14,082
	38,912	11,379	24,790	1,174	11,522
GM-CSF	47,837	2,390	17,184	1,471	5,849
	48,597	3,910	15,401	1,752	5,495
	54,367	4,438	12,859	1,289	4,184

**TABLA 12. DATOS OBTENIDOS DE CADA REPETICION EXPERIMENTAL  
CON EPITELIO PARA CADA UNO DE LOS FACTORES Y TESTIGO.**

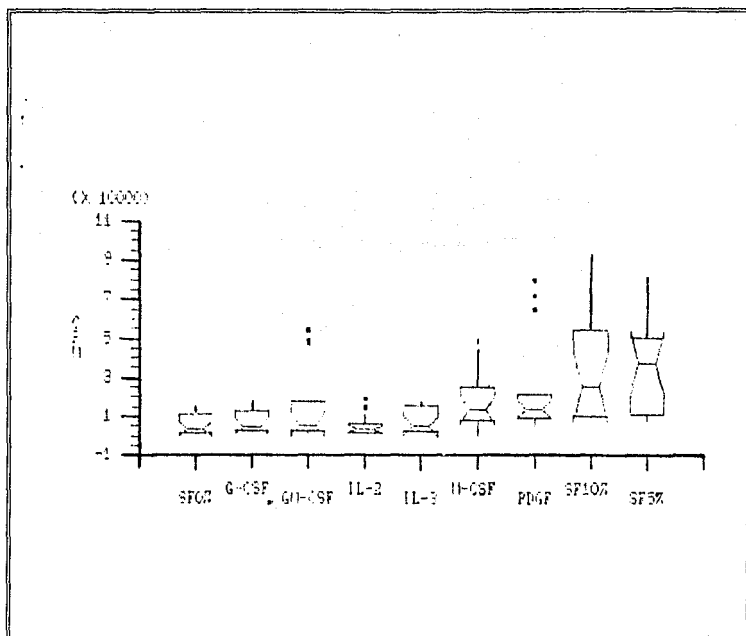
FACTORES	E-I	E-II	E-III	E-IV
NEG	4,487	23,141	1,749	847
	4,101	18,131	1,779	1,086
	6,539	21,409	2,319	443
5%SF	23,759	29,638	11,829	1,801
	22,615	31,701	15,789	1,577
	23,540	42,428	14,586	1,338
10%SF	24,850	38,024	12,709	1,470
	27,343	36,217	7,069	1,579
	40,420	42,929	14,655	1,270
PDGF	1,905	369	5,174	1,287
	1,899	230	4,427	1,301
	2,904	113	5,017	1,897
IL-2	659	12,973	2,383	650
	354	14,852	2,334	347
	294	13,515	2,498	300
G-CSF	5,984	28,275	5,125	766
	5,382	25,332	4,073	841
	5,680	23,845	3,708	794
IL-3	4,423	22,070	4,164	1,306
	3,785	18,409	3,879	1,073
	5,350	18,904	2,649	1,162
M-CSF	9,750	31,861	5,383	558
	9,102	29,738	5,824	1,112
	9,803	27,417	6,562	1,214
GM-CSF	5,796	22,704	5,391	949
	3,618	24,117	4,970	1,314
	5,979	24,468	5,221	574



**GRAFICA. F-11** Formación de grupos de factores, como respuesta de las células fibroblásticas a éstos. Los números representan cada uno de los factores de crecimiento probados independientemente sobre este tipo celular.

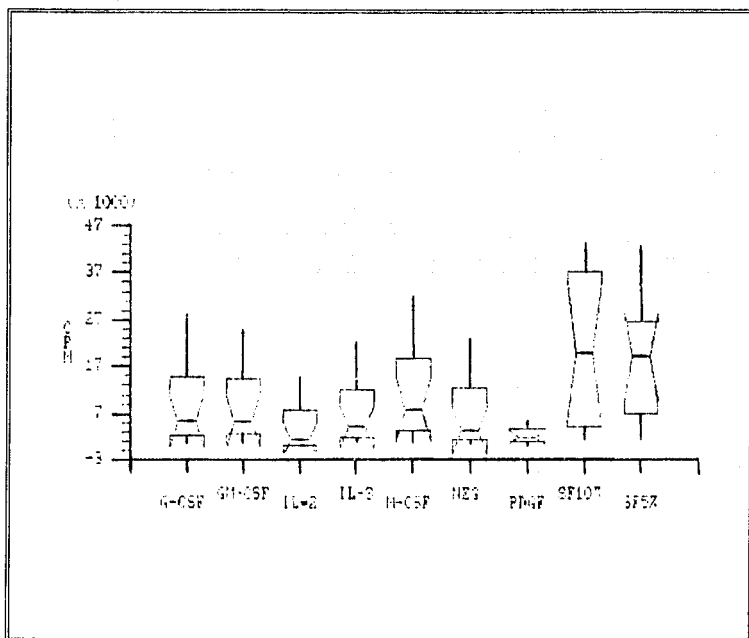


**GRAFICA. E-7** Formación de grupos de factores como respuesta de las células epiteliales a éstos. Los números representan cada uno de los factores de crecimiento probados independientemente sobre este tipo celular.



**GRAFICA. F-12** Se muestra el patrón de variación de cada uno de los inductores que estimulan la proliferación de células fibroblásticas, aquellos que se presentan por encima del testigo negativo ( 5 y 10% SF, PDGF y M-CSF) son los que tienen respuesta positiva por parte de este tipo celular.





**GRAFICA. E-8** Se muestra el patrón de variación de cada uno de los inductores que estimulan la proliferación de células epiteliales, aquellos que se presentan por encima del testigo negativo ( 5 y 10% SF, M-CSF, G-CSF y GM-CSF) son los que tienen respuesta positiva por parte de este tipo celular.

DISCUSION
-----------

La producción y diferenciación de células sanguíneas y estromales es un proceso muy complejo, en el cual intervienen mecanismos reguladores capaces de mantener la homeostasis entre el número de células indiferenciadas y maduras (65). Estos mecanismos agrupan esencialmente tres aspectos; el primero referido a la participación de los factores estimuladores (CSF's para células sanguíneas y EGF, IL-1 y FGF entre otros para células estromales), los cuales son producidos tanto por células mieloides como no mieloides (6), el segundo abarca eventos bioquímicos y moleculares intracelulares y en el tercero se incluyen a los factores externos como las interacciones celulares, componentes de matriz extracelular y señales fisicoquímicas humorales.

De los aspectos reguladores mencionados, sólo el concerniente a la participación de los CSF's para la regulación de células sanguíneas ha sido ampliamente demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, respecto a la regulación de los CSF en células estromales poco se sabe. En este estudio se presentan evidencias de la interrelación existente entre células estromales y células hematopoyéticas tanto para la producción sanguínea, como la estromal a través de la secreción de CSF's por ambos tipos celulares. Encontramos que células del linaje monocito-macrófago tanto normales como transformadas, al ser estimuladas por el M-CSF producido por fibroblastos son capaces de secretar de novo otros CSF's los cuales a su vez estimulan nuevamente la proliferación tanto de células fibroblásticas y epiteliales como de células mieloides (215). Por otro lado, aportamos evidencias de que mientras M-CSF y GM-CSF presentan actividad proliferativa para ambos tipos celulares. Con respecto a G-CSF, presenta un comportamiento similar a GM-CSF en células epiteliales, mientras que IL-3 responde similarmente al testigo negativo (NEG). Las células fibroblásticas son positivas a G-CSF e IL-3 aun cuando esta respuesta se considera como moderada con respecto al testigo negativo (NEG).

Debido a que nuestros ensayos consistían en determinar el efecto mitogénico de los CSF's sobre células estromales, se consideró pertinente contar con poblaciones celulares en estado quiescente y por tanto facilitar la evaluación de estímulos proliferadores exógenos.

Cabe destacar que en los ensayos de inducción a la proliferación celular al aumentar la concentración de suero fetal bovino, de manera general se incrementa el número celular, esto es debido a la presencia de hormonas, factores de crecimiento, interleucinas y otros cofactores presentes en el suero los cuales ayudan a mantener la proliferación celular. Sin embargo, en algunos ensayos se observa que a una concentración de suero del 10% la proliferación se ve disminuida, creemos que esto es atribuible a la presencia de factores inhibidores en el suero.

Otro aspecto importante que debe considerarse en la experimentación en Biología Celular, consiste en contar con poblaciones celulares con alto grado de pureza. El empleo de técnicas inmunohistoquímicas nos permitió caracterizar el origen epitelial de nuestros cultivos. Sólo aquellas que tuvieron positividad a los anticuerpos para desmogleína y citoqueratina en un 90 %, se emplearon en nuestros ensayos como células epiteliales, mientras aquellas que fueron negativas para estos anticuerpos y que presentaban morfología fibroblástica se emplearon

como células fibroblásticas.

Cabe destacar que al realizar la prueba con antidesmogleína en células no confluentes se observó un patrón de tinción citoplásmico en forma de granulos. Este comportamiento puede deberse a que en este tipo de cultivos el contacto celular no se establece totalmente, evitando la unión intercelular y consecuentemente la expresión de desmogleína en la membrana citoplásmica. Además este patrón de tinción puede obedecer a que la desmogleína se encuentra presente en vesículas endocíticas (59), de tal forma que al permeabilizar las células, las proteínas desmosómicas son detectadas con el anticuerpo (216).

Al efectuar el ensayo con anticitoqueratinas se detecta tanto un patrón de tinción citoplásmico como membranal. Se sabe que las citoqueratinas son proteínas que forman parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto de las células epiteliales (211). La tinción membranal detectada puede ser debida a una inespecificidad del anticuerpo, ya que este, es de humano y nuestros cultivos provienen de cepas de ratón.

El hecho de que la inducción a la proliferación de fibroblastos y epitelios encontrada en los MC de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal y de la línea WR19M.1 no se encuentra en el de macrófagos inducidos (el cual sólo induce proliferación de epitelios), puede ser debida al estado de diferenciación de estas células, ya que los macrófagos inducidos se encuentran en un estadio inmaduro (monocitos), mientras que los residentes son células maduras (167). Es conocido que los productos liberados por células hematopoyéticas dependen de su grado de diferenciación (179), de tal manera que mientras los macrófagos secretan G-CSF los monocitos no, lo cual puede ser una causa de la diferente capacidad de inducción a la proliferación obtenida en este trabajo, sobre todo si tomamos en cuenta que en trabajos previos encontramos que el G-CSF es el responsable de la proliferación de fibroblastos (215). Por otra parte el hecho de que el MC por el carcinoma de vejiga humano 5637 indujera proliferación en nuestros cultivos de células epiteliales y fibroblásticas puede estar también relacionado con la capacidad que esta fuente celular tiene para producir G-CSF.

Tomando en consideración que nuestros resultados indican que el G-CSF es capaz de estimular la proliferación de células estromales y que además este factor pertenece a una familia de CSF's, se consideró pertinente evaluar si los otros miembros de esta familia podrían también presentar la propiedad de estimular este tipo de proliferación. Resulta interesante el hecho de haber encontrado una respuesta inductora tanto de M-CSF como de GM-CSF a la proliferación de fibroblastos y de células epiteliales, pues estas células son productoras de los CSF's. Consideramos en consecuencia que debe existir un mecanismo de autoregulación a la proliferación por parte de este tipo de células estromales. Podemos suponer que nuestros resultados indican que los CSF's son moléculas con propiedades tanto autócrinas como parácrinas para la regulación de la proliferación de células estromales y hematopoyéticas, demostrando una vez más la interdependencia entre estos dos tipos celulares.

Aunque inicialmente habíamos determinado que los medios condicionados por macrófagos normales y transformados que contenían G-CSF, ejercían actividad mitogénica para fibroblastos y células epiteliales, obtuvimos que el G-CSF recombinante presentó respuesta mitogénica moderada para ambos tipos celulares. Consideramos que una explicación probable a esta diferencia consiste en que el G-CSF natural es diferente al recombinante, ya que éste contiene una larga cadena de glucósidos que sirven para proteger al polipéptido de la degradación e incrementar su vida media, por tanto podríamos esperar un comportamiento diferente y por otro lado, el hecho de que los medios condicionados por macrófagos contienen además gran cantidad de biomoléculas que pudieran actuar sinérgicamente con el G-CSF para incrementar su efecto inductor.

Observamos que aunque IL-3 también pertenece a la familia de CSF's, ésta no ejerció ningún efecto mitogénico en las células epiteliales y sólo moderado en las fibroblásticas. Consideramos que ésto puede atribuirse al hecho de que dicha proteína no es producida por células estromales, sino por linfocíticas y por tanto tenga un mecanismo diferente de regulación biológica. Por otro lado es conocido que existe una modulación negativa entre los receptores para IL-3 y otros CSF's (135), puesto que la cadena beta del receptor para CSF's (GM-CSF en este caso) y del receptor para IL-3 son similares, por lo cual, podríamos esperar que el GM-CSF liberado endógenamente por este tipo celular, al unirse a su receptor transmite a la célula un estímulo proliferador saturante, de tal manera que al adicionar IL-3 exógena ya no se observe respuesta alguna. Cabe aclarar que éste mecanismo sólo se presentaría cuando los receptores para ambos factores estuvieran coexpresados (123).

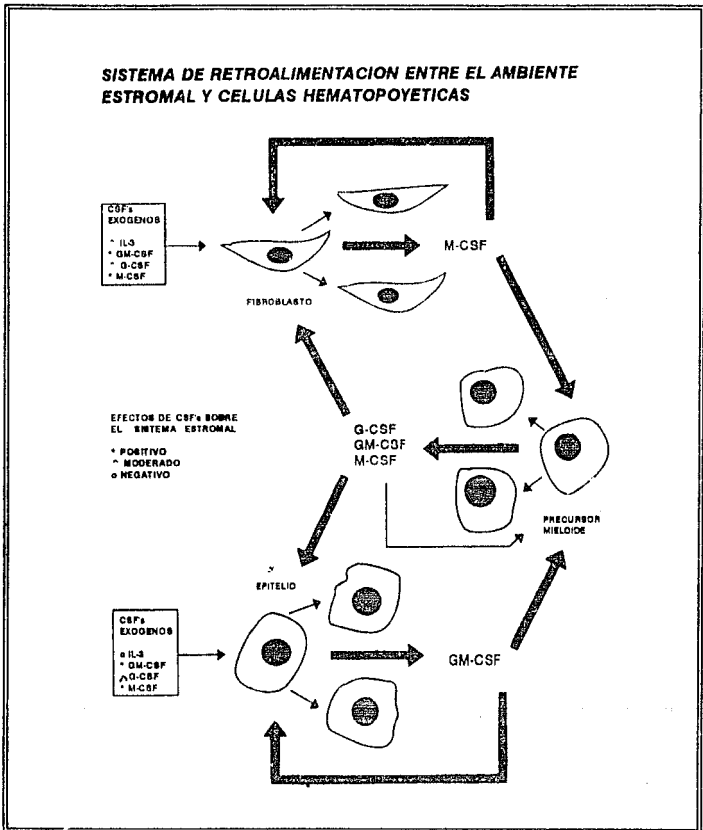
Por su parte el G-CSF indujo moderadamente la proliferación de células epiteliales y fibroblásticas. Siguiendo el planteamiento anteriormente propuesto se sabe que el GM-CSF también modula negativamente los receptores para G-CSF produciéndose por tanto la imposibilidad de responder al estímulo de este factor por la secreción endógena de GM-CSF.

Tomando en cuenta nuestros resultados en lo referente a la capacidad del macrófago para regular la proliferación de células estromales y el hecho de que éste, a su vez responde a señales proliferadoras de este tipo de células, se puede suponer la existencia de un posible mecanismo de regulación sanguínea en donde se presente una interdependencia entre el sistema estromal y el hematopoyético. Las células estromales en consecuencia, además de proporcionar el soporte físico a las células tallo hematopoyéticas y de producir CSF's para inducir su proliferación son capaces de responder a estímulos de estas células para su proliferación, asegurándose de esta forma un aporte de novo de estos factores.

Es importante destacar en apoyo a nuestros resultados que en algunas enfermedades mieloproliferativas, como la leucemia mielóide aguda, se presenta simultáneamente una producción elevada de CSF y una fibrosis medular asociada a una activación importante de las células estromales.

Por otro lado, validar los datos experimentales resulta necesario para reforzar nuestro marco de discusión, es por ello que surge la necesidad de utilizar algunas pruebas estadísticas. En este caso, se observó que la formación de grupos de afinidad de respuesta en el análisis de discriminantes no concuerda del todo con los obtenidos por el análisis de Fpseudosigma en el diagrama de cajas. Para el caso de células fibroblásticas, puede deberse a que, tanto GM-CSF y PDGF presentan datos que deben ser considerados como de riesgo, ya que se localizan fuera de los límites de confianza de la prueba, lo cual puede tener como consecuencia que en el análisis de discriminantes se produzca una respuesta diferente, debido a que estos datos de riesgo influyen en alto grado en las varianzas de éste. Mientras que los grupos formados como respuesta de células epiteliales concuerdan en ambas pruebas. Cabe aclarar que aún cuando IL-3 se encuentra formando un grupo de afinidad con GM-CSF y G-CSF en el análisis de discriminantes, en la prueba de Fpseudosigma presenta un comportamiento similar a NEG, esto puede ser debido a que la magnitud de ambas variables según las cajas (para IL-3 y NEG) es bastante similar, lo que equivale a citar que presentan una varianza semejante; así al observar la gráfica E-7 se nota que la dirección del vector que se traza para significar a 1 (NEG), pasa por el punto de marca de 7 (IL-3), lo cual corrobora la similitud de la prueba Fpseudosigma con aquella de discriminantes.

Lo expuesto en este trabajo nos conduce a postular la existencia de un posible mecanismo de autoregulación del proceso hematopoyético, en el cual las células estromales (epitelio y fibroblastos) participan en la producción de CSF's los cuales estimulan a células del linaje monocito-macrófago a producir de novo otros CSF's que a su vez son capaces de estimular a las células estromales (Fig. 7).



**FIGURA. 7** Los factores estimuladores de colonias producidos por las células estromales actúan en las células hematopoyéticas, induciéndolas a producir factores que inciden a su vez sobre el sistema estromal.

**CONCLUSIONES**

*El medio condicionado por macrófagos residentes de la cavidad peritoneal y el producido por la línea celular WR19M.1 ejercen efecto mitogénico similar sobre fibroblastos y epitelios de ratón.*

*El medio condicionado por macrófagos inducidos de la cavidad peritoneal inhibe la proliferación de fibroblastos pero ejerce actividad mitogénica en células epiteliales.*

*El medio condicionado por el carcinoma de vejiga humana 5637 es mitogénico tanto para fibroblastos como para epitelio.*

*Los factores de crecimiento hematopoyéticos recombinantes ejercen efectos mitogénicos diferenciales sobre células epiteliales y fibroblásticas, siendo GM-CSF y M-CSF responsivos para ambos tipos celulares mientras que G-CSF lo es moderadamente para ambos. IL-3 induce proliferación sólo en fibroblastos.*

*Existe un mecanismo autócrino en la producción de CSF's por parte de las células estromales, que asegura un adecuado funcionamiento del microambiente hematopoyético.*

*La mitogénesis inducida por CSF's en células estromales asegura una producción de novo de estas proteínas.*

R E F E R E N C I A S
-----------------------

1. **Chertkov JL.** Hemopoietic stem cells. *Sov Med Rev C Hematol* 1990, 2:27-39.
2. **Shoukat D, Gabourg L, Gallaway P y Eaves C.** Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a growth factor active on a variety of cell types of nonhemopoietic origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85:9253.
3. **Berdel WE, Danhauser-Riedl S, Steinhäuser G y Winton EF.** Various human hematopoietic growth factors (interleukin-3, GM-CSF, G-CSF) stimulate clonal growth of nonhematopoietic tumor cells. *Blood* 1989, 73:80.
4. **Dorshkind K.** Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu Rev Immunol* 1990, 8:111.
5. **Cannistra AS y Griffin DJ.** Regulation of the production and function of granulocytes and monocytes. *Seminars in Hematol* 1988, 25:3.
6. **Zambrano IR, Cáceres JR, Mendoza JF, Santiago E, Mora LM, Morales MG, Corona MT y Weiss Steider B.** Evidence 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. *Ann NY Acad Sci* 1989, 554:141.
7. **Dexter TM, Heyworth CM, Spooncer E y Ponting IL.** The role of growth factors in self-renewal and differentiation of haemopoietic stem cells. In: *Growth Factors in differentiation and development*. Royal Society (ed), Great B. 1990, 67-74.
8. **Sachs L y Lotem J.** Haematopoietic growth factors. *Nature* 1984,312:407.
9. **Takahina J.** Hemopoiesis in the human yolk sac. *J Anat* 1987, 151:125-135.
10. **Chikajja G y Phillips PG.** Regulation of normal human blood neutrophilic, macrophagic and eosinophilic committed stem cell proliferation by autologous blood T lymphocyte subsets. *Blood* 1984, 63:356-361.
11. **Lord BI y Dexter TM.** Stem cells. *J Cell Sci* 1988, (Suppl. 10).
12. **Snodgrass R y Keller G.** Clonal fluctuation within the haemopoietic system of mice reconstituted with retrovirus-infected stem cells. *EMBO* 1987, 6:3955- 3960.
13. **Politis C, Karamerou A y Block M.** Pathophysiologic aspects of the bone/marrow/fat relationship. *Lab Management* 1983, 21:40-55.
14. **DeBruyn PPH.** Structural substrates of bone marrow function. *Semin Hematol* 1981; 18:179-193.
15. **Erslev AJ y Weiss L.** Structure and function of the marrow. In: *Hematology*. Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ y Litchman MA (eds), New York. 1983, 75-83.



16. Allen TD y Dexter TM. Marrow Biology and Stem Cells. In: Colony Stimulating Factors, Immunology series 49. Dexter TM, Garland JM y Testa NG (eds), Dekker NY. 1990, 475.
17. Ponting IL y Dexter TM. The role of colony stimulating factors, interleukin 1 and stromal extracellular matrix in the regulation of stem cell development. In: Behring Inst Mitt (ed), Germany. 1988, 83:48-55.
18. Campbell FR. Ultrastructural studies of intercellular contacts (junctions) in bone marrow: A review. Scan Electron Microsc 1986, 2:621-629.
19. Cronkite EP, Burlington H y Chanana AD. Regulation of granulopoiesis. Prog Clin Biol Res 1985, 184:129-144.
20. Roberts RJ, Gallagher JC y Spooncer E. Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism for stromal cells mediated haemopoiesis Nature 1988, 332:376.
21. Metcalf D. Hemopoietic colonies in vitro; Cloning of normal and leukemic cells. Springer-Verlag (ed), Berlin, 1977.
22. Metcalf D y Moore MA. Haemopoietic cells, North-Holland, Amsterdam, 1971.
23. Trentin J, Wolf N, Cheng V, Fahlberg DE, Weiss D y Bonhag B. Antibody production by mice repopulated with limited number of clones of lymphoid cell precursors. J Immunol 1967, 98:1326.
24. Abramson S, Miller RG y Phillips, RA. The identification in adult bone marrow of pluripotential and restricted cells of the myeloid and lymphoid sistem. Exp Med 1977, 141:567.
25. Steinman RM, Lustig DA y Cohn ZA. Identification of a novel cell-type in peripheral lymphoid organs of mice. III Functional properties in vitro. J Exp Med 1974, 139:1431.
26. Barclay AN, y Mayrhofer G. Bone Marrow origin of Ia positive cells in the medula of rat thymus. J Exp Med 1981, 153:1666.
27. Katz SI, Tamahi K y Sachs DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. Nature (London) 1979, 282:324.
28. Frelinger JG, Hood L, Hall S y Frelinger JA. Mouse epidermal Ia molecules have a bone marrow origin. Nature (London) 1979, 282:321.
29. Scharder JW, Lewis SJ, Clark-Lewis I y Culvenor JG. The persisting (P) cell: histamin content, regulation by a T cell derived factor, origin from a bone marrow precursor and relationship to mast cells. Proc Natl Acad Sci USA 1981, 78:232.
30. Kitamura Y, Yokoyama Y, Matsuda H y Ohno T. Spleen colony-forming cell as a common precursor for tissue mast and granulocytes. Nature (London) 1981, 291:159.
31. Haller O, Kiessling R, Orn A, y Wigzell H. Generation of natural killer cells: an autonomous function of the bone marrow. J Exp Med 1977, 145:1411.

32. Miller SC. Production and renewal of murine natural killer cells in the spleen and bone marrow. *J Immunol* 1982, 129:2282.
33. Ihle JN, Keller J, Greenberger JS, Henderson L, Yetter RA y Morse HC. Phenotypic characteristics of cell lines requiring interleukin 3. *Cell* 1981, 25:179.
34. Nienhuis AW. Hematopoietic growth factors. Biologic complexity and clinical promise. *N Engl J Med* 1988, 317:916.
35. Pluznik DH, y Sachs L. The cloning of normal mast cells in tissue culture. *J Cell Comp Physiol* 1965, 66:319.
36. Bradley TR, y Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1966, 44:553.
37. Gallagher JG y Dexter TM. Binding factors to heparan sulfate: implications for the regulation of haemopoiesis by bone marrow stromal cells. *Hematol Today* 1991, 34:236.
38. Adamson JW. Evidence for multiple levels of regulation of hematopoiesis. *Prog Clin Biol Res* 1986, 215:21-32.
39. Sachs L. The molecular control of blood cell development. *Science* 1987, 238:1374-1379.
40. Broxmeyer HE. Negative regulators of hematopoiesis. In: Long-term Bone Marrow Culture. Wright D, Greenberger J (eds), New York. 1984, 363-397.
41. Samuelsson B, Granstrom E, Green K, Hamberg M y Hammerstrom S. Prostaglandins. *Ann Rev Biochem* 1975, 44:669-695.
42. Kurland JI, Broxmeyer HE, Beckman RS y Moore MAS. Role for the monocyte-macrophage colony stimulating factor and prostaglandin E in the positive and negative feedback control of myeloid stem cell proliferation. *Blood* 1978, 52:388-407.
43. Pelus LM, Broxmeyer HE, Kurland JI y Moore MAS. Regulation of macrophage and granulocyte proliferation: specificities of prostaglandin E and lactoferrin. *J Exp Med* 1979, 150:277-292.
44. Arosio P, Adelman TG y Drysdale JW. On ferritin heterogeneity. Further evidence of heteropolymers. *J Biol Chem* 1978, 253:4451-4458.
45. Cukrova V, Hrkal Z, Koprivova H y Neuwirt J. Identification of leukemia cell-derived inhibitory activity (LIA) in conditioned media from human myeloid leukemia cell line (ML-2). *Blut* 1986, 52:51-58.
46. Lu L, Broxmeyer HE, Moore MAS, Sheridan AP y Gentile P. Abnormalities in myelopoietic regulatory interactions with acidic isoferritins and lactoferrin in mice infected with Friend virus complex: association with altered expression of Ia antigens on effector and responding cells. *Blood* 1985, 65:91-99.
47. Rado TA, Bollekens J, St. Laurent G, Parker L y Benz EJ Jr. Lactoferrin biosynthesis during granulocytopoiesis. *Blood* 1984, 64:1103-1109.

48. **Baggiolini M, DeDuve C, Masson PL y Heremans JF.** Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes. *J Exp Med* 1970, 131:559-570.
49. **Broxmeyer HE, Bicknell DC, Gillis S, Harris EL, Pelus LM y Sledge GW Jr.** Lactoferrin: affinity purification from human milk and polymorphonuclear neutrophils using monoclonal antibody (II 2 C) to human lactoferrin, development of an immunoradiometric assay using II 2 Cand myelopoietic regulation and receptor binding characteristics. *Blood Cells* 1986, 11:429-446.
50. **Bagby GC, Dinarello CA, Wallace P, Wagner C, Hefeneider S y MacCall E.** Interleukin 1 stimulates granulocyte macrophage colony-stimulating activity release by vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1986, 78: 1316-1323.
51. **Gentile P y Broxmeyer HE.** Suppression of mouse myelopoiesis by administration of human lactoferrin in vivo and the comparative action of human transferrin. *Blood* 1983, 61:982-993.
52. **Broxmeyer HE, Williams DE, Cooper S, Schaddock RK, Gilis S, Waheed A, Urdel D y Bicknell DC.** The 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* 1987, 79:721-730.
53. **Aisen P y Listowsky I.** Iron transport and storage proteins. *Ann Rev Biochem* 1980, 49:357-393.
54. **Taetle R y Honeysett JM.** Transferrin modulation of colony-stimulating factor elaboration by adherent blood and bone marrow cells. *Br J Haematol* 1986, 62:163-170.
55. **Raefsky EL, Platanius LC, Zoumbos NC y Young NS.** Studies of interferon as a regulator of hematopoietic cell proliferation. *J Immunol* 1985, 135:2507-2512.
56. **Shilick E, Hartung K, Stevenson HC y Chirigos MA.** Secretion of colony-stimulating factors by human monocytes and bone marrow cells after in vitro treatments with biological response modifiers. *J Leuk Biol* 1985, 37: 615-627.
57. **Piacibello W, Lu L, Williams D, Aglietta M, Rubin BY, Cooper S, Wachter M, Fausto F y Broxmeyer HE.** Human gamma interferon enhances release from phytohemagglutinin-stimulated T4+ lymphocytes of activities that stimulate colony-formation by granulocyte-macrophage (CFU-gm) erythroid (BFU-e) and multipotential (CFU-gemm) progenitor cells. *Blood* 1986, 68:1339-1347.
58. **Chen BDM.** Interferon-induced inhibition of receptor-mediated endocytosis of colony-stimulating factor (CSF-1) by murine peritoneal exudate macrophages. *J Immunol* 1986, 136:174-180.
59. **Goldstein D y Laszlo J.** Interferon therapy in cancer: from imaginon to interferon. *Cancer Res* 1986, 46:4315-4329.
60. **DeGiantoni G, Murphy M, Kobayashi M, Francis MK, Perussia B y Trinchieri G.** Natural killer (NK) cell-derived hematopoietic colony-inhibiting activity and NK cytotoxic factor. Relationship with tumor necrosis factor and synergis with immune interferon. *J Exp Med* 1985, 162:1512-1530.

61. Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 1985, 230:630-632.
62. Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MA Jr y Shepard HM. Recombinant human tumor necrosis factor: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 1985, 230:943-945.
63. Tsujimoto K, Yip KY y Vilcek J. Interferon-gama enhances expression of cellular receptors for tumor necrosis factor. *J Immunol* 1986, 136:2441-2444.
64. Nicola NA. Why do hematopoietic growth factor receptors interact with each other? *Immunol Today* 1987, 8:134-139.
65. Sachs L. Hematopoietic growth factors. *Nature* 1984, 309:763.
66. Sachs L. Constitutive uncoupling of pathways of gene expression that control growth differentiation in myeloid leukemia: A model for the origin and progression of malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, 77:6152.
67. Tomida H, Yamamoto y Hozumi M. Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells. *J Biol Chem* 1984, 259:10978.
68. Metcalf D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* 1989, 339:27-30.
69. Huang E, Nocka K, y Beier DR, et al. The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell* 1990, 63:225-233.
70. Metcalf D. Tissue growth factors. In: Baserga R (Ed), Springer, New York. 1981, 343.
71. Morstyn G y Burgess AW. Hemopoietic growth factors: A review. *Can Res* 1988, 48:5624.
72. Dexter TM. Haemopoietic growth factors. *Brit Med Bull* 1989, 45:337.
73. Sachs L. The molecular control of blood cell development. *Science* 1987, 238:1374.
74. Metcalf D. Haemopoietic growth factors 1: Peptide regulatory factors. *Lancet* 1989, 15:825.
75. Bussolino F, Wang JM, Defilippi P, Turrini F, Sanavio F, Edgell JC, Aglietta M, Arese P, y Mantovani A. Granulocyte and granulocyte macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature* 1989, 337:471-473.
76. Bussolino F, Ziche M, Wang MJ, Alessi D, Morbidelli L, Cremona O, Bosia A, Marchisio PC y Mantovani A. In vitro and In vivo activation of endothelial cells by colony-stimulating factors. *J Clin Invest* 1991, 87:986-995.
77. Berdel WE, Danhauser S, Oberberg D y Zafferani M. Effects of hematopoietic growth factors on malignant nonhematopoietic cells. *Sem in oncology* 1992, 19:41-45.
78. Gillis S. Cytokine receptors. *Curr Opin Immunol* 1991, 3:315.

79. Nicola NA y Metcalf D. Subunit promiscuity among hemopoietic growth factor receptors. *Cell* 1991, 67:319.
80. Whetton AD y Dexter TM. Myeloid Haemopoietic growth factors. *Biochim Biophys Acta* 1989, 989:111.
81. Schlessinger J, Schechter Y, Willingham MC y Pastan I. Direct visualization of binding aggregation and internalization of insulin an epidermal growth factor on living fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978, 75:659-2663.
82. Kishimoto T. Interleukins: Molecular Biology and Immunology. *Chem Immunol Basel, Karger*, 1992, 51:65-106.
83. Farrar WL, Thomas TP y Anderson WB. Altered cytosol/membrane enzyme redistribution on interleukin-3 activation of protein kinase C. *Nature* 1985, 315:235-237.
84. Pelech SL, Paddon HB, Charest DL, et al. IL-3 induced activation of protein kinases in the mast cell/megakaryocyte R6-XE 4 line. *J Immunol* 1990, 144:1759-1766.
85. Garland JM, Ferris DK y Farrar WL. Novel characteristics of a 33 KDa protein (pp33) rapidly phosphorylated IL3 dependent cells by stimulation with IL3. *Biochem Biophys Res Commun* 1989, 164:520-530.
86. Sorensen PH, Mui AL, Murthy SC, et al. Interleukin-3, GM-CSF and TPA induce distinct phosphorylation events in an interleukin 3-dependent multipotential cell line. *Blood* 1989, 73:406-418.
87. Fields AP, Pincus SM, Kraeft AS, et al. Interleukin-3 and bryostatin 1 mediate rapid nuclear enveloped protein phosphorylation in growth factor-dependent FDC-P1 hematopoietic cells. *J Biol Chem* 1989, 264:21896-21901.
88. Kato J, Roussel MF, Ashman RA, et al. Transduction of human colony-stimulating factor-1 (CSF-1) receptor into interleukin-3-dependent mouse myeloid cells induces both CSF-1-dependent and factor-independent growth. *Mol Cell Biol* 1989, 9:4069-4073.
89. Rohrschneider LR y Metcalf D. Induction of macrophage colony stimulating factor-dependent growth and differentiation after introduction of the murine c-fms gene into FDC-P1 cells. *Mol Cell Biol* 1990, 9:5081-5092.
90. Cook Nia, Dexter TM, Lord BI, Cragoe EJ y Whetton AD. Identification of a common signal associated with cellular proliferation stimulated by four haemopoietic growth factors in a highly enriched population of granulocyte/macrophage colony-forming cells. *EMBO J* 1989, 8:2967-2974.
91. Bazan JF. A novel family of growth factor receptor: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem Biophys Res Commun* 1989, 164:788-795.
92. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87:6934-6938.
93. Ullrich A y Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990, 61:203-212.

94. **D' Andrea AD, Lodish HF y Wang GG.** Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell* 1989, 57:177-185.
95. **Bazan JF.** Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today* 1990, 11:350.
96. **Davis S, Aldrich TH, Valenzuela DM, Wong V, Furth ME, Squinto PS y Yancopoulos GD.** The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Sciences* 1991, 253:59.
97. **Nicola NA.** Receptors for colony-stimulating factors. *Br J Hematol* 1991, 77:133.
98. **Bazan JF.** Genetic and structural homology of stem cell factor and macrophage colony-stimulating factor. *Cell* 1991, 65:9.
99. **Fukunaga R, Ishizaka-Ikeda E, Seto Y y Nagata S.** Expression cloning of a receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor *Cell* 1990, 61:341-350.
100. **Bristol LA, Oppenheim JJ y Durum SK.** Cytokines in the immune response. *Ency Hum Biol* 1991, 2:751.
101. **Cross M y Dexter TM.** Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell* 1991, 64:271.
102. **Heyworth CM, Ponting ILO y Dexter TM.** The response of haemopoietic cells to growth factors: developmental implication of synergistic interactions. *J Cell Sci* 1988, 91:239.
103. **Pettenati MJ, Le Beau MM, Lemons RS, et al.** Assignment of CSF-1 to 5q33.1: Evidence for clustering of genes regulating hematopoiesis and for their involvement in the deletion of the long arm of chromosome 5 in myeloid disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84:2970-2974.
104. **Park LS, Friend D, Cillis S y Urdal DL.** Characterization of the cell surface receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1986, 164:251-262.
105. **Elliot MJ, Vadas MA, Eglinton JM, et al.** Recombinant human interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor show common biological effects and binding characteristics on human monocytes. *Blood* 1989, 74:2349-2359.
106. **Wegman TG, Athanassakis I, Guilbert L, et al.** The role of M-CSF and GM-CSF in fostering placental growth, fetal growth, and fetal survival. *Transplant Proc* 1989, 21:566-568.
107. **Gearing DP, King JA, Gough NM y Nicola NA.** Expression cloning of a receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *EMBO J* 1989, 8:3667-3676.
108. **Cannistra SA, Groshek P, Garlick R, Miller J y Griffin JD.** Regulation of surface expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor in normal human myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 7:93-97.

109. Walker F y Burgess AW. Internalization and recycling of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor on a murine myelomonocytic leukemia. *J Cell Physiol* 1987, 130:255-261.
110. Lopez AF, Hardy SJ, Eglinton J, et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhGM-CSF) induces different intracellular signals in mature and immature myeloid cells. In: *monokines and other non-limphocytic cytokines*. Alan R. Liss, Inc (eds), New York. 1988, 235-242.
111. Ghigo D, Brizzi MF, Avanzi GC, et al. Evidence for a role of the NA<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in the colony stimulating factor-induced ornithine decarboxylase activity and proliferation of human cell line M-07e. *J Cell Physiol* 1990, 145:147-154.
112. Kanakura Y, Druker B, Cannistra SA, Furukawa Y, Torimoto Y, y Griffin JD. Signal transduction of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 receptors involves tyrosine phosphorylation of a common set of cytoplasmic proteins. *Blood* 1990, 76:706-715.
113. Kelleher CA, Wang GG, Clark SC, Schendel PF, Minden MD y McCulloch EA. Binding of iodinated recombinant human GM-CSF to the blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* 1988, 2:211-215.
114. Park LS, Friend D, Price V, Anderson D, Singer J, Prickett KS y Urdal DL. Heterogeneity of human interleukin-3 receptors. *J Biol Chem* 1989, 264:5420-5427.
115. Brizzi MF, Avanzi GC, Veglia F, Clark SC y Pegoraro L. Expression and modulation of IL-3 and GM-CSF receptors in human growth factor dependent leukaemic cells. *Br J Haematol* 1990, 76:201-209.
116. Itoh N, Yonehara S, Schreurs J, et al. Cloning of an interleukin-3 receptor gene: a member of a distinct receptor gene family. *Science* 1990, 247:324-327.
117. D' Andrea AD, Fasman GD y Lodish HF. A new hematopoietic receptor superfamily: structural features and implications for signal transduction. *Current Opinions Cell Biol* 1990, 2:648-651.
118. Isfort RJ, Stevens D, May WS y Ihle JN. Stimulation of factor-dependent myeloid cell lines with interleukin-3 induces tyrosine phosphorylation of several cellular substrates. *J Biol Chem* 1988, 263:19203-19209.
119. Farrar WL y Haren Bellan A. Myeloid growth factor (s) regulation of ornithine decarboxylase: effects of antiproliferative signals interferon-gamma and c-AMP. *Blood* 1989, 73:1468-1475.
120. Clark SC y Kamen R. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 1987; 236:1229.
121. Park LS, Waldron PE, Friend D, et al. Interleukin-3, GM-CSF and G-CSF receptor expression on cell line and primary leukemia cells: receptor heterogeneity and relationship to growth factor responsiveness, *Blood* 1989, 74:56-65.
122. Valent P, Basemer J, Muhm M, Majdic O, Lechner K y Bettelheim P. Interleukin 3 activates human blood basophils via high-affinity binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:5542-5546.

123. **Onetto-Pothier N, Aumont N, Haman A, et al.** *IL-3 inhibits the binding of GM-CSF to AML blasts, but the two cytokines act synergistically in supporting blast proliferation.* *Leukemia* 1990, 4:329-336.
124. **Fukunaga R, Seto Y, Mizushima S y Nagata S.** *Three different mRNAs encoding human granulocyte colony-stimulating factor receptor.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87:8702-8706.
125. **Williams AP y Barclay AN.** *The immunoglobulin superfamily domain of the cell surface recognition.* *Annu Rev Immuno* 1988, 6:381-405.
126. **Petersen T, Skorstengaard K y Vibe-Pedersen K.** *Primary structure of fibronectin.* In: *Fibronectin.* D.F. Mosher (eds). New York. 1989, 1-24.
127. **Hanks SK, Quinn AM y Hunter T.** *The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains.* *Science* 1988, 241: 42-52.
128. **Williams LT.** *Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor.* *Science* 1989, 243:1564-1570.
129. **Yarden Y y Ullrich A.** *Growth factor receptor tyrosine kinases.* *Annu Rev Biochem* 1988, 57:443-478.
130. **Schlessinger J.** *Signal transduction by allosteric receptor oligomerization.* *Trends Biochem Sci* 1988, 13:443-478.
131. **Boni-Schnetzler M y Pilch PF.** *Mechanism of EGF-receptor autophosphorylation and high-affinity bond.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84:7832-7836.
132. **Coussens L, Van Beveren C, Smith D, et al.** *Structural alteration of viral homologue of receptor protooncogene *fms* at carboxyl terminus.* *Nature* 1986, 320:277-280.
133. **Rettenmier CW, Roussel MF, Ashmun RA, Ralph P, Price K y Sherr CJ.** *Synthesis of membrane-bound colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and downmodulation of CSF-1 receptors in NIH 3T3 cells-transformed by cotransfection of the human CSF-1 and *c-fms* (CSF-1 receptor) genes.* *Mol Cell Biol* 1987, 7:2378-2387.
134. **Guilbert LJ y Stanley ER.** *Modulation of receptors for the colony-stimulating factor, CSF-1, by bacterial lipopolysaccharide and CSF-1.* *J Immunol Methods* 1984, 73:17-28.
135. **Vairo G y Hamilton JA.** *Signalling through CSF receptors.* *Immunol Today* 1991; 12:362-369.
136. **Miyajima A, Miyatake S, Schreurs J, De Vries J, Arai N, Yokota T y Arai K.** *Coordinate regulation of immune and inflammatory responses by T cell-derived lymphokines.* *FASEB J* 1988, 2:2462.
137. **Arai K, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N y Yokota T.** *Cytokines: Coordinators of immune and inflammatory responses.* *Annu Rev Biochem* 1990, 59:783.



138. **Morstyn G, Campbell L, Souza LM, Alton NK, Keech J, Green M, Sheridan W, Metcalf D y Fox R.** Effect of granulocyte colony stimulating factor on neutropenia induced by cytotoxic chemotherapy. *Lancet* 1988, 2:267.
139. **Bronchud MH, Scarffe JH, Thatcher N, Crowther D, Souza LM, Alton NK, Testa NG y Dexter TM.** Phase I/II study of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients receiving intensive chemotherapy for small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1987, 56:809.
140. **Vadas NA, López AF, Gamble JR y Elliot M.** Role of colony stimulating factors in leucocyte responses to inflammation and infection. *Curr Opin Immunol* 1991, 3:97.
141. **Ihlo JN, Weinstein Y, Keller J, Henderson L y Palaszynski E.** Interleukin 3. *Methods Enzymol* 1985; 116:540-552.
142. **Arai K, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N y Yokota T.** Cytokines: Coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* 1990, 59: 783.
143. **Saeland S, Caux F, Favre C, et al.** Effects of recombinant human interleukin 3 in CD34-enriched normal hematopoietic progenitors and on myeloblastic leukemia cells. *Blood* 1988, 72:1580-1586.
144. **Clark-Lewis I, Kent SBH y Schrader JW.** Purification to apparent homogeneity of a factor stimulating the growth of multiple lineages of hemopoietic cells. *J Biol Chem* 1984, 25:7488.
145. **Nicola NA y Metcalf D.** The colony stimulating factors and myeloid leukemia. *Cancer Surv* 1985, 45:789.
146. **Lord BI, Malineux G, Testa NG, Keely M, Spooncer E y Dexter TM.** The kinetic response of haemopoietic precursor cells in vivo to highly purified recombinant interleukin-3. *Lymphokine Res* 1986, 5:97.
147. **Kelvin DJ, Chance S, Shreeve M, Axelrad AA, Connolly JA y McLeod D.** Interleukin 3 and cell cycle progression. *J Cell Physiol* 1986, 127:403-409.
148. **Crappier RM, Vairo G, Hamilton JA, Clark-Lewis I y Schrader JW.** Stimulation of bone marrow-derived and peritoneal macrophages by a T lymphocyte derived hemopoietic growth factor, persisting cell-stimulating factor. *Blood* 1985, 66:59-866.
149. **Herrmann F, Oster W, Neuer SC, Klein K, Lindemann A y Mertelsmann R.** Interleukin-1 stimulates T lymphocytes to produce GM-CSF. *J Clin Invest* 1988, 81:1415-1418.
150. **Ruef C y Coleman DL.** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: pleiotropic cytokine with potential clinical usefulness. *Rev Infect Dis* 1990, 12:41-62.
151. **Kitamura T, Toyo A, Kuwai T, et al.** Identification and analysis of human erythropoietin receptors on a factor-dependent cell line, Tf-1. *Blood* 1989, 73:375-380.
152. **Sieff CA, Niemeyer CM, Nathan DC, et al.** Stimulation of human hematopoietic colony formation by recombinant gibbon multi-colony-stimulating factor or interleukin-3. *J Clin Invest* 1987, 80:818-823.

153. **Sieff CA, Emerson SG, Donahue RE, Nathan DG, Wang EA, Wong GG y Clark SC.** Human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: a multilineage hematopoietin. *Science* 1985, 230:1171.
154. **Donahue RE, Emerson SG, Wang EA, Wong GG, Clark SC y Nathan DG.** Demonstration of burst promoting activity of recombinant human GM-CSF on circulating erythroid progenitors using an assay involving the delayed addition of erythropoietin. *Blood* 1985, 66:1479.
155. **Groopman J, Mitsuyasu RT, Delero M Oette DH y Gode DW.** Effet of recombinant human GM-CSF on myelopoiesis in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1987, 317:593-598.
156. **Baldwin GC, Fuller ND, Roberts RL, Ho DD y Golde DW.** Granulocyte- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhance neutrophil cytotoxicity toward HIV- infected cells. *Blood* 1989, 74:1673-1677.
157. **Souza LM, Boone TC y Gabilove J.** Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science* 1986, 232:61.
158. **Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, et al.** Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature* 1986, 319:415-418.
159. **Abul KA.** Cellular and Molecular Immunology. Saunders, WB (eds), USA. 1991,226-242.
160. **Tamura M, Hattori K y Nomura H.** Induction of neutrophilic granulocytosis in mice by administration of purified human native granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *Biochem Biophys Res Commun* 1987, 142:454.
161. **Matsumoto M, Matsubara S, Matsuno T, Tamura H, Hattori K, Nomura H y Ono M.** Protective effect of human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on microbial infection in mice with neutropenia. *Infect Immun* 1987, 55:2715.
162. **Glaspy J y Golde DW.** Clinical applications of the myeloid growth factors. *Sem Hematol* 1989, 26:14.
163. **Scheridan WP, Wolf M, Lusk J, et al.** Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophil recovery after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *Lancet* 1989, 891-895.
164. **Oster W, Lindemann A, Horn S, Mertelsmann R, Herrmann F.** TNF alpha but not TNF beta induces secretion of colony stimulating factor for macrophages (CSF-1) by human monocytes. *Blood* 1987, 70:1700-1703.
165. **Rambaldi A, Young DC y Griffin JD.** Expression of the CSF-1 gene by human monocytes, *Blood* 1987, 69:1409-1413.
166. **Ralph P y Sampson-Johannes A.** Macrophage growth and stimulating factor, M-CSF. In: Hematopoietic growth factors in transfusion medicine. Willey-Liss, Inc. (eds), USA. 1990, 43.
167. **Kawasaki ES y Ladner MB.** Molecular biology of macrophage colony-stimulating factor. In: Colony stimulating Factors. Dexter TM, Garland JM and Testa NG (eds), Dekker NY. 1990, 55.

168. Tushinski RJ y Stanley ER. The regulation of mononuclear phagocyte entry into S-phase by the colony-stimulating factor-1. *J Cell Physiol* 1985, 122:221-228.
169. Moore RN, Oppenheim JJ, Farrer JJ, Carter CS Jr, Waheed A y Shadduck RK. Production of lymphocyte-activating factor (interleukin 1) by macrophages activated with colony-stimulating factors. *J Immunol* 1980, 125:1302-1305.
170. Ralph P y Nakoinz I. Stimulation of macrophage tumoricidal activity by the growth and differentiation factor CSF-1. *Cell Immunol* 1987, 69:1259-1261.
171. Kurland JI y Bockman R. Prostaglandin E production by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med* 1978, 147:952-957.
172. Wing BJ, Ampel NH, Waheed A y Shadduck RK. M-CSF enhances the capacity of murine macrophages to secrete oxygen reduction products. *J Immunol* 1985, 135:2052-2056.
173. Vairo G, Hamilton JA. CSF-1 stimulates Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase mediated 86RB<sup>+</sup> uptake in mouse bone marrow derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1985, 132:430-437.
174. Masoaka T, Motoyoshi K, Takaku F, et al. Administration of human urinary colony-stimulating factor after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1988, 3:121-127.
175. Cline NJ y Summer MA. Bone marrow macrophage development. I. Some functional characteristics of early cells of the mouse macrophage series. *Blood* 1972, 40:62.
176. Metcalf D. Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies in vitro. *J Cell Physiol* 1971, 77:277.
177. Nancy CA, Belocevic M, Crawford RM, Haely AT, Schreiber RD, Meltzer MS. Lymphokine regulation of macrophage effector activities. In: *Host Defense Immunomodulation to intracellular pathogens*. Eisenstein TK, Bullock WE, Hanna N (eds), Plenum Press New York, 1988, 1.
178. Nathan CF, Murray HW y Cohn ZA. The macrophage as an effector cell. *N Engl J Med* 1980, 303-306.
179. Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987, 79:319.
180. Golde DW y Gasson JC. Hormones that stimulate the growth of blood cells. *Sci Am* 1988, 259:3-11.
181. Sieff CA. Hematopoietic growth factors. *J Clin Invest* 1987, 79:1549-1557.
182. Balkwill FR y Burke F. The cytokine network. *Immunol Today* 1989, 10:299.
183. Morgan DA, Ruscetti FW y Gallo RC. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 1976, 193:1007-1008.
184. Mier JW y Gallo RC. Purification and some characteristics of human T-cell growth factor from phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte-conditioned media. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, 77:6134-6138.

185. Steel CM y Hutchins. Soluble factors and cell-surface molecules involved in human B lymphocyte activation, growth and differentiation. *Biochem biophys Acta* 1989, 989:1-10.
186. Cantrell DA y Smith KA. Transient expression of interleukin 2 receptors: consequences for T cell growth. *J Exp Med* 1983, 158:1895-1911.
187. Mier JW y Gallo RC. Human T cell growth factor (TCGF) biochemical properties and interaction with and production by normal and neoplastic human T cells. In: *Lymphokines: a forum for immunoregulatory cell products*. Pick E, Landy (eds), New York. 1982, 137-163.
188. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Mier JW, Woods AM y Gallo RC. T-cell lines established from human T-lymphocytic neoplasias by direct response to T-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, 77:6815-6819.
189. Raulet DH. Expression and function of interleukin-2 receptors on immature thymocytes. *Nature* 1985, 314:101-103.
190. Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ y Roseberg SA. Lymphokine-activated killer cell phenomenon: lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1982, 155:1823-1841.
191. Granelly-Piperno A, Andrus L y Reich E. Antibodies to interleukin 2: effects on immune responses in vitro and in vivo. *J Exp Med* 1984, 160:738-750.
192. James E, Talmadge MS, Schneider M, Keller J, Ruscetti F, Longo D, Pennington R, Bowersox O y Tribble H. Myelostimulatory activity of recombinant human interleukin-2 in mice. *Blood* 1989, 73: 1458-1467.
193. Ross R, Raines EW y Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 1986, 46:155-159.
194. Yarden Y, Escobedo JA, Kuang WJ, Yang-Feng TL, Daniel TO, Tremble PM, Cheng EY, Ando ME, Harkins RN, Francke U, Friend VA, Ullrich A y Williams LT. Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature* 1986, 323:226-232.
195. Seifert RA, Hart CE, Phillips PE, Forstrom JW, Ross R, Murray MJ y Bowen-Pope DF. Two different subunits associate to create isoform-specific Platelet-derived Growth Factor Receptors. *J Biol Chem.* 1989, 264:8771-8778.
196. Hart CE y Bowen-Pope DF. Platelet-derived growth factor receptor: Current views of the two-subunit model. *J of Invest dermatology* 1990, 6:53-57 s.
197. Wilcox JN, Smith KM, Williams LT, Schwartz SM y Gordon D. Platelet-derived growth factor mRNA detection in human atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *J Clin Invest* 1988, 82:1134-1143.
198. Kaye WA, Adri MNS, Soeldner JS, et al. Acquired defect in interleukin-2 production in patients with type I diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1986, 315:920-924.

199. Gupta S. Study of activated T cells in man II. Interleukin 2 receptor and transferrin receptor expression on T cells and production of interleukin 2 in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *Clin Immunol Immunopathol* 1986, 38:93-100.
200. Vaughan JH. Immune system in rheumatoid arthritis: possible implications in neoplasms. *Am J Med* 1985, 78:6-11.
201. Waldmann TA. The interleukin-2 receptor on malignant cells: a target for diagnosis and therapy. *Cell Immunol* 1986, 99:53-60.
202. Foon KA, Roth MS y Bunn PA Jr. Alpha interferon treatment of low-grade B-cell non-Hodgkins lymphomas, cutaneous T-cell lymphomas, and chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 1986, Suppl 2:35-42.
203. Quesada JR, Reuben J, Manning JT, Hersh EM y Gutterman JU. Alpha interferon for induction of remission in hairy cell leukemia. *N Engl J Med* 1984, 310: 15-18.
204. Billiau A. The clinical application of fibroblast interferon. An overview. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 1984, 1:87-96.
205. Fiorilli M, Sirianni MC, Pandolphi F, et al. Improvement of natural killer activity and of T cell after thymopoietin pentapeptide therapy in a patient with severe combined immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 1981, 45:344-351.
206. Sztein MB, Serrate Sá y Goldstein AL. Modulation of interleukin 2 receptor expression on normal human lymphocytes by thymic hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83:6107-6111.
207. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul ML, et al. Observations of the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985, 313:1485-1492.
208. Penn EJ, Hobson C, Ress DA y Magee AI. Structure and assembly of desmosome junctions: biosynthesis, processing, and transport of the major protein and glycoprotein components in cultured epithelial cells. *J Cell Biol* 1987, 105:57-68.
209. Cowin P, Kapprell HP, Franke WW, Tamkun J y Hynes RG. Plakoglobina: a protein common to different kinds of intracellular adhering junctions. *Cell* 1986, 46:1063-1073.
210. Pasdar M, y Nelson WJ. Kinetics of desmosome assembly in Madin-Darby canine kidney epithelial cells temporal and spatial regulation of desmoplakin organization and stabilization upon cell-cell contact. II. Morphological Analysis. *J Cell Biol* 1988, 106:687-695.
211. Charlotte JA. *Biología Celular. Iberoamericana (eds), México. 1991, 349-400.*
212. Mueller H y Frank NW. Biochemical and immunological characterization of demoplakins I and II: the mayor polypeptide of the desmosomal plaque. *J Mol Biol* 1983, 47:67.
213. Pielou EC. The interpretation of ecological data. *John Wiley & Sons (eds), New York. 1984, 223-238.*

214. **Valleman PF.** Definition and comparison of robust nonlinear data smoothing algorithms. *J Am Statist Assoc* 1980, 75:609-615.
215. **Mendoza JF, Cáceres JR, Santiago E, Mora LM, Sánchez L, Corona TM, Machuca C, Zambrano IR, Martínez RD y Weiss-Steider D.** Evidence that G-CSF is a fibroblast growth factor that induced granulocytes to increased 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 Hematol* 1990, 18:903.
216. **Martínez RD.** Caracterización de la desmogleína en células renales en cultivo. *Rev Alergia Mex* 1991, 38:59-64.

**AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Dr. Benny Weiss S. por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación, así mismo por su excelente asesoría del mismo.

A los miembros del jurado Dr. Jaime Martínez Medellín, Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, Dr Luis Felipe Jiménez García, Dr. Luis Angel De Jesús Terán Ortiz, Dra. Annie Pardo Semo y Dra. Ma. Isabel Soto Cruz, por las revisiones al presente escrito y sus atinadas sugerencias.

Al personal del Departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (I.N.E.R), por su apoyo en la parte experimental de esta investigación.

A la Dra. Nora Barbosa del Instituto Nacional de Pediatría (I.N.P.), por su donación de Timidina tritiada.

Al Dr. Rubén Darío Martínez de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M., por su ayuda en las pruebas inmunoquímicas.

Al CONACyT por el apoyo económico brindado durante la realización de esta tesis.

A los Srs. Ranulfo Pedraza y José Chavarría por su colaboración técnica.