

00381 26



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVIDENCIA DE QUE G-CSF ES UN FACTOR DE CRE-
CIMIENTO DE FIBROBLASTOS, QUE INDUCE LA
MADURACION DE LOS GRANULOCITOS, Y QUE LOS
MACROFAGOS PRODUCEN MOLECULAS DE 45 KD
CON ESTAS ACTIVIDADES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS
(B I O L O G I A)

P R E S E N T A

JORGE FLAVIO MENDOZA RINCON

1993

DIRECTOR DE TESIS: DR. BENNY WEISS STEIDER

TESIS CON
PALLA 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.

Indice General

Indice general	1
Indice de Figuras	2
Indice de Tablas	3
Abreviaturas	4
Resumen	6
Introducción	9
Marco Teórico.....	12
A. Organización hematopoyética.	12
1. Evidencias que demuestran la existencia de la célula precursora pluripotente.	12
2. Poblaciones de células hematopoyéticas y su nomenclatura.	15
B. Regulación hematopoyética y su microambiente.	20
1. Modelos de regulación hematopoyética.	20
2. Función del microambiente celular en la hematopoyesis.	22
3. Componentes del microambiente hematopoyético.	23
C. Sistemas para el estudio in vitro del sistema hematopoyético.	26
1. Cultivos a corto plazo.	26
2. Cultivos a largo plazo.	29
D. Moléculas reguladoras del crecimiento hematopoyético.	34
1. Inductores de macrófagos y granulocitos (MGIs).	34
2. Factores estimuladores de colonias (CSFs).	35
3. Interleucinas (ILs).	39
E. El macrófago como administrador celular en la producción de granulocitos-neutrófilos.	42
1. Origen, distribución y principales características bioquímicas y funcionales.	42
2. El macrófago y su papel en la producción y diferenciación de los granulocitos-neutrófilos.	46
Planteamiento del problema	50
Hipótesis	53
Objetivo General	54
Objetivos Particulares	54
Material y Métodos	56
Resultados	66
Discusión	81
Apéndices	89
Bibliografía	94

Índice de Figuras

Marco Teórico

Figura 1. Modelo de los compartimientos de la hematopoyesis (células tallo, amplificación, maduración y funcional). Las flechas muestran el compartimiento de células tallo, caracterizado por la proliferación y la autorenovación.	16
Figura 2. Diagrama hipotético propuesto del desarrollo de las células sanguíneas a partir de una célula tallo pluripotente. Ver abreviaturas en la tabla 1.	19
Figura 3. Representación simplificada de los elementos celulares que conforman el microambiente hematopoyético. (Tomado de Dexter, 1989).	24
Figura 4. Etapas para el establecimiento de cultivos a corto plazo.	26
Figura 5. Etapas para el establecimiento de los cultivos de Dexter.	29
Figura 6. La superfamilia de los receptores para los factores estimuladores de colonias y la interleucinas. En la parte superior se encuentran los receptores que necesitan dos subunidades para formar un receptor de alta afinidad. En la inferior, aquellos que tienen alta afinidad por sí solos o cuando forman homodímeros.	38
Figura 7. Esquema propuesto del papel humoral de los CSFs y las ILs en la proliferación, desarrollo, maduración y activación biológica de las células hematopoyéticas.	41
Figura 8. Origen y distribución de los fagocitos mononucleares.	44

Resultados

Figura 1. Absorbancia y volumen de exclusión del medio condicionado de la línea WR19M.1.	67
Figura 2. Perfil de la cromatografía del MC-WR19M.1 y ensayo de actividad biológica de las fracciones obtenidas en células de médula ósea. En la parte superior se indican las proteínas de referencia utilizadas.	68
Figura 3. Perfil de de la cromatografía del MC-WR19M.1 y ensayo de actividad biológica de las fracciones obtenidas en cuanto a su capacidad de inducir diferenciación morfológica en granulocitos medulares (Δ) y de incrementar la ingesta de partículas de latex en granulocitos inflamatorios de la cavidad peritoneal y de médula ósea (\odot \blacklozenge). En la parte superior se indican las proteínas de referencia utilizadas.	70
Figura 4. Perfil de la cromatografía del MC-WR19M.1 y ensayo de actividad biológica de las fracciones obtenidas en fibroblastos de pulmón. En la parte superior se indican las proteínas de referencia utilizadas.	73
Figura 5. Efecto de diferentes inductores sobre la incorporación de timidina ^3H en fibroblasto normales. Fibroblastos (2.5×10^3) fueron mantenidos durante 4 días, después se agregaron los inductores por 16 horas y posteriormente timidina ^3H por 8 horas.	74
Figura 6. Efecto de diferentes inductores sobre la incorporación de timidina ^3H en fibroblastos normales. Fibroblastos (2.5×10^3) fueron mantenidos durante 4 días, después se agregaron los inductores por 16 horas y posteriormente timidina ^3H por 8 horas.	75
Figura 7. Mecanismo celular y humoral hipotético propuesto para el control de la producción de los granulocitos-neutrófilos.	86

Indice de Tablas

Marco Teórico

Tabla 1. Nomenclatura de las células hematopoyéticas.	18
Tabla 2. Efecto biológico de los CSFs sobre células hematopoyéticas y no hematopoyéticas.	36
Tabla 3. Atributos de los fagocitos mononucleares.	43
Tabla 4. Productos biológicos producidos por el macrófago.	45

Resultados

Tabla 1. Número y porcentaje de colonias con diferente morfología.	66
Tabla 2. Número y porcentaje de colonias con diferente morfología.	69
Tabla 3. Morfología y porcentaje de granulocitos de médula ósea (MO) que fagocitaron partículas de latex y morfología de los cultivos de MO después de 4 días.	71
Tabla 4. Inducción de la proliferación de fibroblastos de pulmón.	72
Tabla 5. Efecto de los medios condicionados de macrófagos residentes e inflamatorios sobre la diferenciación morfológica en células de médula ósea.	77
Tabla 6. Efecto de los medios condicionados de macrófagos residentes e inflamatorios sobre la proliferación de fibroblastos.	77
Tabla 7. Efecto de la fracción de 45-KD y del rhG-CSF sobre el incremento de fagocitosis de partículas de latex en macrófagos residentes e inflamatorios.	79

ABREVIATURAS

MGI	Inductor de macrófagos y granulocitos
CSF	Factor estimulante de colonias
HGF	Factor de crecimiento hematopoyético
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófago
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocito
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocito-macróforo
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-3	Interleucina-3
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-7	Interleucina-7
IL-8	Interleucina-8
IL-9	Interleucina-9
IL-10	Interleucina-10
IL-11	Interleucina-11
IL-12	Interleucina-12
SCF	Factor de crecimiento de células tronco
EPO	Eritropoyetina
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
IGF	Factor de crecimiento tipo insulina
TGF	Factor de crecimiento transformante
HIM	Microambiente inductor hematopoyético
CFU-S	Unidad formadora de colonias del bazo
CFU-Mix	Unidad formadora de colonias mixta
HPP-CFU	Unidad formadora de colonias con elevada capacidad proliferativa
CFU-GEMM	Unidad formadora de colonias de granulocito, eritrocito, megacariocito y monocito
CFU-GM	Unidad formadora de colonias de granulocito-macróforo
CFU-Eo	Unidad formadora de colonias de eosinófilos
CFU-Ba	Unidad formadora de colonias de basófilos
CFU-Meg	Unidad formadora de colonias de megacariocitos
CFU-T	Unidad formadora de colonias de linfocitos T
CFU-B	Unidad formadora de colonias de linfocitos B
CFU-E	Unidad formadora de colonias de eritrocitos
EDTA	Sal del ácido etilendiaminatetracético
EGTA	Ácido tetracético etilenglicol-bis-(Beta aminoetil eter)
LPS	Lipopolisacáridos de <i>Salmonella typhimurium</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
6PFD	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
KD	Kilodaltones
N-CAM	Molécula de adhesión de células neuronales
LMA	Leucemia mieloide aguda
NK	Células asesinas naturales
MC	Medio condicionado
SAF	Solución amortiguadora de fosfatos
DMEM	Medio de cultivo Engle modificado por Dulbecco
SFB	Suero fetal de bovino
FTIC	Isoflucocianato de fluoresceína
HTB-9	Línea tumoral de carcinoma de vejiga humana
MC-WR19M.1	Medio condicionado de la línea de macrófagos WR19M.1
MCF	Medio condicionado de fibroblastos normales de pulmón
MCE	Medio condicionado de células epiteliales normales de riñón
Mac-R	Medio condicionado de macrófagos residentes
Mac-R ⁺	Medio condicionado de macrófagos residentes estimulados con LPS
Mac-I	Medio condicionado de macrófagos inflamatorios
Mac-I ⁺	Medio condicionado de macrófagos inflamatorios estimulados con LPS

RESUMEN

RESUMEN

Los inductores de macrófagos y granulocitos (MGI), también llamados factores estimuladores de colonias (CSF) controlan principalmente la proliferación, la diferenciación y la activación de las células del linaje granulocito-macrófago. Se han descrito 4 moléculas del tipo CSF conocidas por sus abreviaturas como GM-CSF, M-CSF, IL-3 y G-CSF con capacidades de regular la producción de las células del linaje mielomonocito.

La identificación de las células productoras de estas moléculas representa una área de estudio importante porque permitirá contribuir al entendimiento de la regulación hematopoyética. A este respecto, aunque se ha identificado a los fibroblastos como el productor del M-CSF, a los linfocitos T de la IL-3 y a ciertas células de tipo epiteloides del GM-CSF, aún no se tiene caracterizada a la estirpe celular que pudiera estar produciendo al G-CSF.

Teniendo en cuenta resultados preliminares en los que demostramos que las células del linaje de los monocitos producen un CSF de peso molecular de 45 kd con propiedades activadoras y diferenciadoras de granulocitos; el presente trabajo fue realizado para evaluar si los macrófagos normales producen moléculas con actividad de G-CSF.

Los resultados obtenidos muestran que tanto poblaciones de macrófagos normales como de una línea de macrófagos transformada secretan factores con actividad de G-CSF. Además, estos factores tienen la propiedad de inducir la diferenciación de los precursores de granulocitos de médula ósea, así como de activación en la ingestión de partículas de latex tanto por granulocitos maduros de médula ósea como de la cavidad peritoneal .

Por otro lado, tomando en consideración que los fibroblastos producen un factor proliferador de macrófagos y que a su vez los macrófagos son capaces de producir factores de activación de fibroblastos, y de que recientemente se ha encontrado que

células de origen epitelial y conectivo de origen tumoral expresan receptores para factores del tipo CSF, en el presente trabajo se evaluó la capacidad que pudiera tener el G-CSF producido por los macrófagos para activar la proliferación de los fibroblastos.

Los resultados obtenidos indican que tanto el inductor de 45 kd proveniente de los macrófagos como la molécula rhG-CSF tienen una importante actividad mitógena en los fibroblastos. Asimismo, encontramos que esta activación era semejante a la obtenida con moléculas mitogénicas conocidas como son la IL-1 y el PDGF. Además, al evaluar la capacidad de inducción a la proliferación de los fibroblastos por otros de los tipos de CSF encontramos que tanto la IL-3 como el M-CSF inducen también este tipo de proliferación.

Por último, se describe un modelo en el cual se pretende establecer la interdependencia entre los macrófagos y los fibroblastos en la producción de los granulocitos neutrófilos.

INTRODUCCION

INTRODUCCION

El estudio de los factores humorales que controlan la proliferación y diferenciación hematopoyética denominados inicialmente inductores de macrófagos y granulocitos (MGI) o factores estimuladores de colonias (CSF), ha crecido de manera considerable desde la primera descripción que hicieron de estas moléculas Sachs y Metcalf hace ya casi 3 décadas (*Sachs, 1992; Metcalf, 1992*).

En la actualidad, la familia de los MGI o CSF ha crecido ya que se han descrito aproximadamente 18 moléculas denominadas modificadores biológicos, agrupándose todos ellos con el nombre genérico de factores de proliferación y diferenciación hematopoyética (HGF) (*Aggarwal-Gutterman, 1992*). Estos factores participan tanto de manera directa como indirecta regulando positivamente y negativamente los eventos a nivel celular y molecular encaminados al control de la producción sanguínea (*Mendoza y cols, 1993*). Una de las áreas de interés de la biología de estas moléculas estudia a las células involucradas en su producción. En resultados previos, nuestro grupo ha encontrado que la producción de 2 de los 4 tipos de los CSFs involucrados en la producción de macrófagos y granulocitos-macrófagos (M-CSF y GM-CSF, respectivamente) es llevada a cabo por fibroblastos y células epiteliales (*Zambrano y cols, 1989 b*). Otros resultados demostraron la capacidad de los monocitos de médula ósea de producir otro de estos CSF (tipo G-CSF) (*Mora y cols, 1988; Zambrano y cols, 1988*), y recientemente se ha demostrado que los linfocitos T producen IL-3 (*Watson y cols, 1986*). Todos estos datos nos hace pensar que la producción de los CSFs puede ser célula-específica.

Teniendo en cuenta, que no se ha identificado plenamente a la célula productora de G-CSF y de que en resultados previos demostramos que los macrófagos producen un CSF de 45 kd, el presente trabajo fue realizado para conocer sí en general los macrófagos son capaces de producir G-CSF, sí esta producción es constitutiva o se estimula bajo condiciones de activación, y sí esta molécula de 45 kd tiene la propiedad de proliferación

y diferenciación sobre algún linaje hematopoyético diferente al de los granulocitos.

Por otra parte, tomando en cuenta que es conocido que los macrófagos producen factores con actividad mitógena sobre fibroblastos, y de que recientemente se ha demostrado la presencia de receptores para CSFs en células estromales de origen tumoral (*Shoukat y cols*, 1988; *Berdel y cols*, 1989), en este trabajo se estudió si el CSF producido por macrófagos (que suponemos es G-CSF), es un factor de crecimiento de fibroblastos. Por último, como se ha encontrado que el GM-CSF es mitógeno para células tumorales, en este trabajo aparte del G-CSF ensayamos si el M-CSF y la IL-3 tienen la capacidad de estimular la proliferación de fibroblastos.

**MARCO
TEORICO**

MARCOTEORICO

A. Organización hematopoyética.

1. Evidencias que demuestran la existencia de la célula precursora pluripotente.

Es aceptado de manera general que todas las células sanguíneas de nuestro cuerpo derivan de una célula precursora indiferenciada y pluripotente, conocida como célula madre o tallo (*Dexter-Sponcer, 1987; Spangrude, 1991*). Como todas las células tallo, la célula precursora que originará a los linajes sanguíneos posee dos propiedades fundamentales: la autorrenovación y la pluripotencialidad. La autorrenovación se define como la capacidad de la célula tallo para autopertuarse asegurando su proge y la de los demás linajes sanguíneos y la pluripotencialidad, como la facultad para originar a cada uno de los tipos celulares que conforman la sangre (*Jandl, 1991*).

La primera evidencia experimental de la presencia *in vivo* de una célula tallo pluripotente capaz de originar a los linajes mieloides y linfoides fue demostrada en 1961 por Till y McCulloch con sus experimentos de reconstitución hematopoyética realizados con ratones irradiados subletalmente y letalmente (*Till-McCulloch, 1961*). Ellos comprobaron que si se administraba de manera continua células de médula ósea de ratones no irradiados a ratones irradiados, éstos eran capaces de reconstituir por completo su hematopoyesis (*Till, 1982*). Debido a que al realizar la necropsia a este tipo de animales ellos encontraron en su bazo colonias macroscópicas mieloides, sugirieron que muy probablemente a la inoculación de células hematopoyéticas se debía su reconstitución. Análisis morfológicos posteriores demostraron que efectivamente estas colonias estaban constituidas principalmente de monocitos, granulocitos, eritrocitos y megacariocitos (*Wu y cols, 1968*). Posteriormente, fue posible demostrar la naturaleza

clonal y pluripotente de las células presentes en este tipo de colonias, mediante marcadores cromosómicos, utilización de retrovirus y ensayos de repoblación hematopoyética (Nowell y cols, 1970). Aunque en los estudios realizados por Till no fue posible detectar a células del linaje linfoide, subsecuentemente se pudo establecer su presencia (Abramson y cols, 1977).

Debido a la dificultades técnicas de aquel tiempo para purificar e identificar de manera precisa a la subpoblación de células hematopoyéticas pluripotentes responsables de esta repoblación se les denominó operacionalmente como Unidad Formadora de Colonias del Bazo o CFU-S (Colony Forming Unit-Spleen) (Till-McCulloch, 1961). Inicialmente, se consideró a la CFU-S como las células precursoras de todos los linajes sanguíneos. Sin embargo, estudios realizados a nivel celular por Magli en 1982 demostraron que las colonias generadas en el bazo de ratones letalmente irradiados diferían en su tiempo de aparición, así como en su capacidad de autorrenovación y diferenciación. Magli, en base a las características antes citadas logró demostrar la existencia de dos tipos de CFU-S: una a la que designó como temprana o CFU-S del día 9, la cual presentó un potencial de autorrenovación limitado además de originar únicamente células de origen mieloide, y una tardía o CFU-S del día 12 con mayor potencial de autorrenuevo así como con la capacidad de originar células tanto mieloides como linfoides (Magli y cols, 1982).

En aquel tiempo, las CFU-S del día 12 eran consideradas como las verdaderas células tallo. Sin embargo, como es conocido en la actualidad, debido a que la población de células precursoras representa una fracción muy pequeña del total de las células presentes en la médula ósea (aproximadamente entre el 0.05-0.1%), la purificación de la mismas presentó muchas dificultades técnicas. Caracterizar a nivel celular y purificar a la célula tallo pluripotente era una prioridad en muchos centros de investigación hematológica a principios de la década de los 80. Por esta razón, durante el curso de esa década hubo

varios intentos por purificar de la médula ósea a una subpoblación con capacidades de autorrenuevo y diferenciación análogas a las de la CFU-S. En 1979 Bradley y Hodgson describen a una subpoblación de células mieloides a la que denominan Unidad Formadora de Colonias con Alta Capacidad Proliferativa *HPP-CFU* (High Potencial Proliferative-Colony Forming Unit), obtenida después del tratamiento de ratones con 5-fluoracilo, un inhibidor de la adenilato sintetasa que provoca la muerte de las células que se encuentran en proliferación activa, con capacidades de autorrenovación, multipotencialidad y de reconstituir la hematopoyesis en ratones letalmente irradiados (*Bradley-Hodgson, 1979; McNiece y cols, 1992*). Sin embargo, dada la dificultad de identificar a algún marcador de superficie específico en esta subpoblación de células precursoras no fue posible su caracterización a nivel celular y molecular.

Dos hechos experimentales marcan el inicio de la caracterización molecular de esta subpoblación; la identificación del antígeno Thy-1 en células precursoras tallo y la aplicación de la tecnología de los anticuerpos monoclonales para su purificación. Es así, como Spangrude (1988) trabajando con células de médula ósea de ratón y con la ayuda de anticuerpos monoclonales altamente específicos dirigidos contra células maduras, logra separar una subpoblación de células hematopoyéticas precursoras que tienen la capacidad de reconstituir por completo los linajes mieloides y linfoides cuando son inoculadas en ratones que han sido irradiados subletalmente y letalmente (*Spangrude y cols, 1988*). Por la particularidad de la subpoblación de no presentar marcadores característicos de células mieloides y linfoides maduras, de expresar exclusivamente el antígeno Thy-1 y, de reaccionar específicamente contra un anticuerpo desarrollado para células precursoras, conocido como Sca (Stem cell antigen), él la designa como *Lin⁻ Thy-1^{lo} Sca⁺* (*Ikuta y cols, 1990; Ikuta y cols, 1992*).

Aunque la identidad de la célula *Lin⁻ Thy-1^{lo} Sca⁺* con la célula tallo pluripotente ha generado una gran controversia en virtud de que algunos investigadores han dicho que

no es más que la CFU-S del día 12 descrita por Magli en 1982 o la HPP-CFU descrita por Bradley y Hodgson en 1979 (*Lord-Dexter*, 1988), es importante comentar, sin embargo, que la identidad de la *Lin⁻ Thy-1^{lo} Sca⁺* con la célula tallo que identificaran Till y McCulloh en 1961, es el intento experimental más cercano realizado a nivel celular y molecular con el que se cuenta en nuestros días, encaminado a la identificación y purificación de las células tallo.

La importancia de los resultados anteriores radica en que al contar con una población homogénea de células con capacidad de autorrenovación y pluripotencialidad análogas a las descritas para las células tallo, se podrá estudiar a nivel subcelular y génico los procesos involucrados en el control de la proliferación y la diferenciación de las células hematopoyéticas tanto en condiciones normales como patológicas, además de ensayar pruebas de terapia genética para corregir disfunciones a nivel de células madre.

2. Poblaciones de células hematopoyéticas y su nomenclatura.

El sistema hematopoyético junto con otros tejidos con alta tasa de recambio celular, experimenta de manera continua una constante autorrenovación y diferenciación. El proceso biológico por el que se generan todas las células sanguíneas de nuestro organismo es conocido como hematopoyesis (*Dorshkind*, 1991). La hematopoyesis se inicia en la etapa fetal en los islotes sanguíneos, de este lugar pasa al hígado y después al bazo, para que en la etapa prenatal se instale de manera definitiva en la médula ósea de los huesos largos y se mantenga así durante toda la vida humana (*Christensen*, 1989; *Allen-Dexter*, 1990).

El proceso hematopoyético que se lleva a cabo en la médula ósea y que originará a los 8 tipos de células sanguíneas puede dividirse de manera hipotética en 4 compartimientos; el de las células tallo con alta capacidad de autorrenovación, el de las células progenitoras

de los diferentes linajes hematopoyéticos en el cual se amplifica el número de las mismas, el de maduración y el de las células funcionales, aptas para realizar sus diversas funciones biológicas (Fig 1).

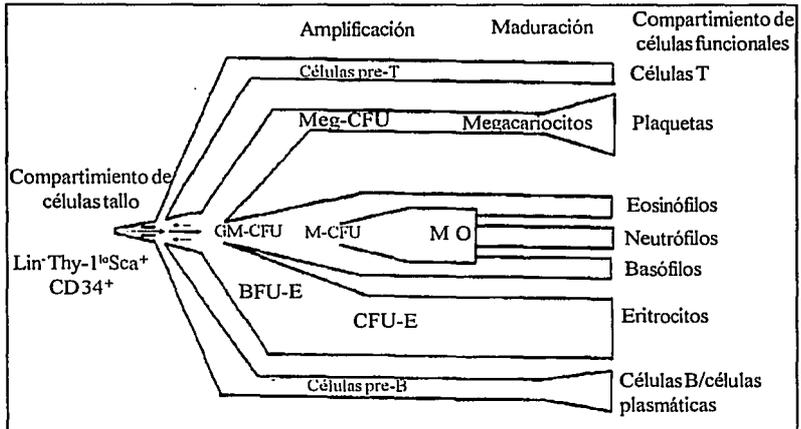


Figura 1. Modelo de los compartimientos de la hematopoyesis (células tallo, amplificación, maduración y funcional). Las flechas muestran el compartimiento de células tallo, caracterizado por la proliferación y la autorrenovación..

En la médula ósea los procesos de proliferación y diferenciación que se llevan a cabo son continuos, pasando las células del sistema hemato-linfoide de un estado indiferenciado a uno de diferenciación completa de manera imperceptible. Además, si tomamos en consideración que la cantidad de células tallo en la médula ósea es extremadamente pequeña (aproximadamente entre el 0.05% y el 0.1%), no es difícil imaginar los problemas técnicos a los que se han tenido que enfrentar los hematólogos para poder separarlas y poder estudiar así sus propiedades cinéticas, de desarrollo y de diferenciación.

Existen sin embargo, algunas técnicas que han permitido estudiar estas propiedades: utilizando diversos agentes químicos como la hidroxiurea, un inhibidor de la reducción

de ribonucleótidos a dextrorribonucleótidos, el 5-fluoracilo que es un inhibidor de la adenilato sintetasa, y pulsos de timidina tritiada a altas concentraciones (los que reducen de manera importante a las células que se encuentran en proliferación activa), se ha demostrado en los órganos hematopoyéticos estudiados la existencia de una jerarquía en la capacidad proliferativa de las células hematopoyéticas (*Becker y cols*, 1965; *Schofield y cols*, 1980; *Parker-Cheng*, 1991). En efecto, ha sido demostrado que las células tallo se encuentran fuera de ciclo celular, ya que aun después de estos tratamientos la médula ósea es capaz de regenerarse y de reconstituir a todos los linajes sanguíneos. Sin embargo, lo que sí es difícil evitar en los animales tratados es provocar una reducción importante de las cuentas leucocitarias. Los resultados anteriores han puesto en evidencia que en la médula ósea existe una diferencia en la tasa de proliferación, siendo mayor en las células progenitoras que en las células precursoras pluripotentes (*Hodgson-Bradley* 1980; *Wolf-Preistley* 1986). Biológicamente, resulta explicable este hecho pues es de esperarse que la población de células progenitoras tenga que amplificarse para cubrir de esta manera la demanda de células sanguíneas dependiendo de las necesidades del organismo, de ahí entonces su elevada tasa de recambio celular. En lo que se refiere a las células tallo solamente entrarían a ciclo celular como consecuencia de alguna demanda fisiológica ocasionada por el desgaste, la pérdida o alguna infección.

En cuanto a su capacidad de generar a más de un linaje sanguíneo, se ha demostrado en estudios *in vivo* que existen subpoblaciones celulares pluripotentes con la capacidad de originar a todos los linajes sanguíneos; la *Lin⁻Thy-1^bSca⁺*, en este caso sería considerada como la célula más relacionada con la célula tallo (*Spangrude*, 1991; *Ikuta y cols*, 1992). En lo que respecta a los cultivos *in vitro*, es sólo con el desarrollo de la técnica de crecimiento de células de médula ósea en geles como el agar, la cual es dependiente para su crecimiento de la presencia de factores solubles obtenidos de diversas fuentes celulares, que es posible estudiar el desarrollo de las células hematopoyéticas (*Pluznik-*

Sachs, 1965; Bradley-Metcalf, 1966). De esta manera, se identifican células con capacidades multipotentes, bipotentes y monopotentes las cuales originan a más de uno, a lo más dos y a lo más un linaje sanguíneo respectivamente (Schrader, 1985). La CFU-GEMM (Colony Forming Unit-Granulocyte, Erythroid, Megakaryocyte and Monocyte), es considerada una célula multipotente pues favorece el desarrollo de granulocitos, eritrocitos, megacariocitos y monocitos (Johnson-Metcalf, 1977; Hara-Ogawa, 1978). En lo que se refiere a células bipotentes la célula clásica por excelencia, que por cierto fue la primera que se identificó *in vitro* es la que origina a macrófagos y granulocitos y que es conocida como GM-CFU (Pluznik-Sachs, 1966). De manera posterior, fue identificado que los granulocitos eosinófilos y basófilos se originaban de una célula progenitora diferente de la GM-CFU, designándoles por esta razón Eo-CFU y B-CFU respectivamente (Johnson-Metcalf, 1980; Zucker-Franklin, 1981). Asimismo, han sido identificadas células progenitoras de linfocitos T y B (Tabla 1).

NOMBRE	ABREVIATURAS	TIPO CELULAR/SINONIMO
<u>Compartimiento de células tallo</u>		
Células tallo pluripotente	CFU-S Lin ⁺ Thy-1 ⁺ Sca ⁺ CD34 ⁺	Unidad formadora de colonias del bazo
Células tallo multipotente	CFU-GEMM CFU-Mix	
<u>Compartimiento de células progenitoras</u>		
Eritropoyético:		
Eritroide temprana	BFU-E	Unidad formadora del brote Eritroide
Eritroide tardía	CFU-E	Unidad formadora de colonias- Eritroides
Mielopoyético:		
Granulocito/Macrófago	GM-CFU	Unidad formadora de colonias Granulocito-Macrófago
Eosinófilo	Eo-CFU	Unidad formadora de colonias- Eosinófilas
Basófilo	B-CFU	Unidad formadora de colonias- Basófilas
Megacariopoyético:		
Megacariocito	Mega-CFU	Unidad formadora de colonias- Megacariocitos
Linfopoyético:		
Linfocito B	Células pre-B	Unidad formadora de colonias- Linfocitos B
Linfocito T	Células pre-T	Unidad formadora de colonias- Linfocitos T

Tabla 1. Nomenclatura de las células hematopoyéticas.

Gracias a los estudios realizados *in vivo* e *in vitro*, ha sido posible representar de manera hipotética el desarrollo de los diferentes linajes sanguíneos a partir de una célula tallo pluripotente (Fig 2). Es importante comentar que en este esquema existen algunas partes que aún están abiertas a discusión. La más importante, es que sólo la *CFU-S* y la *Lin⁻Thy-1^oSca⁺* son las únicas que han sido identificadas celular y molecularmente *in vivo*, las *CFU* para las otras células progenitoras de los diferentes linajes sanguíneos sólo han sido identificadas *in vitro*, no tienen contraparte *in vivo*.

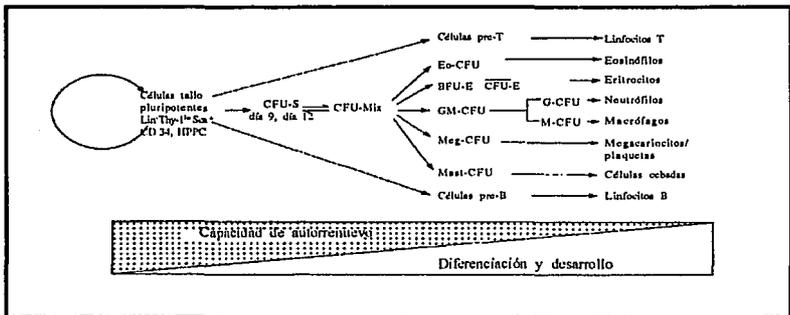


Figura 2. Diagrama hipotético propuesto del desarrollo de las células sanguíneas a partir de una célula tallo pluripotente. Ver abreviaturas en la tabla 1.

Es evidente que para que una célula tallo se diferencie primero hacia una célula progenitora y después a una célula madura con capacidades biológicas y funcionales definidas, debe existir un mecanismo biológico, que asegure por un lado un número constante de células sanguíneas y por el otro, que mantenga una reserva de células tallo listas para las necesidades propias del organismo. Este mecanismo se encargaría de mantener un suministro adecuado de células sanguíneas tanto en condiciones normales como de stress.

En la siguiente sección se analizarán algunos modelos propuestos para explicar como se regula la producción de células sanguíneas de manera normal.

B. Regulación hematopoyética y su microambiente.

1. Modelos de regulación hematopoyética.

Un aspecto de gran importancia que ha ocupado la atención de los biólogos celulares y moleculares durante mucho tiempo ha sido conocer cual es el mecanismo por el cual una célula tallo indiferenciada permanece en estado de latencia, se autorrenueva o entra a una ruta determinada de diferenciación. Aunque aún no existen modelos moleculares que expliquen como se lleva a cabo este mecanismo, hay varios paradigmas a nivel celular que tratan de demostrar los eventos encaminados a la diferenciación de las células hematopoyéticas y la conocida pérdida en su capacidad de autorrenovación sin menoscabo de la reserva de células tallo.

El primer modelo de regulación hematopoyética fue desarrollado en 1964 por Till y cols, quienes utilizando un programa de simulación postularon que la proliferación y la diferenciación de las células hematopoyéticas pluripotentes estaba regulada por un proceso estocástico (*Till y cols, 1964*). Este modelo de "nacimiento" (proliferación) y "muerte" (diferenciación) de las células hematopoyéticas estuvo basado en un análisis citológico de las colonias presentes en el bazo de ratones que habían sido irradiados y reconstituidos con células de médula ósea, en las cuales se encontró una gran aleatoridad en los tipos sanguíneos que las constituyan (*Till, 1976*). Unos años después Curry y Trentin (1967) desarrollan su teoría del Microambiente Inductivo Hematopoyético HIM (Hemopoietic Inductive Microenvironment), basándose en un análisis similar al anterior pero a nivel histológico de las colonias hematopoyéticas presentes en el bazo de ratones irradiados (*Curry-Trentin, 1967*). Como el papel del microambiente puede ser considerado en función de la producción de moléculas humorales reguladoras, a finales de la década de los 80 Van Zant y Goldwasser

postulan que la determinación a la diferenciación de la célula precursora pluripotente es el resultado de la competencia que se establece entre moléculas inhibitoras y estimuladoras (Kubaneck y cols, 1973; Van Zant-Goldwasser, 1979), ellos basan esta predicción en el efecto inhibitor de la eritropoyetina en la proliferación y diferenciación de la unidad formadora de colonias de granulocitos-macrófago (CFU-GM) por parte del factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) y en el mismo efecto inhibitor observado con el GM-CSF en la formación de colonias eritroides (Gordon y cols, 1985). De manera posterior a estos modelos Nicola y Johnson (1982) desarrollan su teoría de la "etapa obligada eritroide" (Nicola-Johnson, 1982). Al realizar un análisis morfológico de colonias multipotentes, ellos encuentran de manera invariable componentes eritroides, de ahí que postulen que en la diferenciación de las células hematopoyéticas esta fase sea fundamental. Posteriormente, Nakagata (1984) retoma el modelo de autorrenovación estocástica desarrollado por Till y cols, pero lo aplica a la diferenciación hematopoyética, designándolo como "modelo de diferenciación estocástico progresivo" (Nakagata y cols, 1982; Kunit y cols, 1985).

Resulta claro por lo anteriormente descrito, que a mitad de la década pasada los modelos elaborados para dilucidar el mecanismo que controla la autorrenovación y la diferenciación de las células hematopoyéticas eran de naturaleza estocástica o determinística. Recientemente, ha sido propuesto que el desarrollo de las células hematopoyéticas es determinística y que esta controlado por influencias tanto internas como externas (Novak-Stewart, 1991; Brown y cols, 1991). Bajo esta perspectiva en la actualidad se esta generalizando la idea de que el microambiente hematopoyético (células estromales, componentes de la matriz extracelular y factores de crecimiento), en conjunción con el programa genético de las células hematopoyéticas, desempeña un papel determinante en el camino del desarrollo que experimentan las células

hematopoyéticas para originar un tipo sanguíneo particular.

2. Función del microambiente celular en la hematopoyesis.

Tal vez el primer dato experimental con el que se cuenta acerca de la participación del microambiente hematopoyético en la génesis de las células hemáticas fue el que observó Russel (1979) en cepas de ratones que padecían de anemias hereditarias. Al analizar las cepas SI/SI^d y W/W^v ambas con anemia macrocítica, encontró que la cepa SI/SI^d se caracterizaba por presentar un microambiente celular hematopoyético defectuoso el cual se demostraba por su incapacidad de estimular la proliferación y desarrollo de colonias mieloides en su bazo cuando los ratones habían sido letalmente irradiados e inoculados con células de médula ósea normal. Por otro lado, la cepa W/W^v presentaba un defecto a nivel de la célula tallo (CFU-S) más que en el microambiente hematopoyético, lo cual se ponía en evidencia cuando ratones letalmente irradiados, eran inoculados con células de médula ósea provenientes de ratones W/W^v las cuales fallaban en reconstituir la hematopoyesis en este tipo de ratones (Russel, 1979)

Aunque los resultados obtenidos por Russel evidencian de manera clara el papel del microambiente en la regulación de la hematopoyesis, una de las pruebas más contundentes de su participación en la formación de células sanguíneas lo obtendría unos años después Dexter al utilizar los cultivos a largo plazo desarrollados por él mismo (Dexter-Lajtha, 1974) (ver sección C-2). Esta técnica permite el establecimiento de monocapas de células estromales provenientes de médula ósea, las cuales son capaces de favorecer un microambiente propicio para mantener un proceso hematopoyético continuo por periodos prolongados de 3 a 4 meses, mediante los cultivos a largo plazo fue posible producir una "cura" en las cepas arriba citadas,

al crecer células hematopoyéticas de la cepa *SI/SI*^d normales por sí mismas pero con un microambiente defectuoso sobre monocapas de células estromales provenientes de la cepa *W/W*^v las cuales tienen un microambiente normal pero una CFU-S defectuosa (*Dexter-Moore*, 1977). Los resultados obtenidos por Dexter y cols, evidencian la interdependencia a nivel celular entre las células hematopoyéticas y las estromales para una adecuada producción sanguínea, además plantean la posibilidad de estudiar esta interacción a nivel génico y humoral.

Existen otras pruebas experimentales de la participación del microambiente hematopoyético: tales como los trasplantes de médula ósea ectópicos los cuales necesitan la presencia de hueso, o el crecimiento de células de médula ósea en cámaras de difusión implantadas en la cavidad peritoneal los cuales desarrollan intrincados y complejos microambientes para su completo desarrollo (*Cronkite-Carsten*, 1980).

Es indudable la participación que tiene el microambiente presente en la médula ósea en la formación de todas las células sanguíneas de nuestro cuerpo. Para realizar un análisis más completo y poder entender la manera en que se lleva a cabo esta participación, es necesario analizar los componentes que lo conforman.

3. Componentes del microambiente hematopoyético.

De los análisis funcionales, citoquímicos, histológicos y bioquímicos realizados *in vivo* con la médula ósea de los vertebrados superiores y en particular la humana se ha podido establecer que el microambiente hematopoyético esta formado por dos grandes componentes 1) el sistema celular hematopoyético y 2) los componentes de la matriz extracelular.

El primer sistema esta constituido por células reticulares, células adventicias, y por adipocitos. La célula reticular representa la célula estromal básica de las áreas

hematopoyéticas de la médula ósea (*Westen-Bainon, 1979; Allen-Dexter, 1990; Dorshkind, 1990*). Ellas son las células dominantes del estroma medular con morfología dendrítica y procesos citoplasmáticos en forma de hojas ramificadas, lo que le permite formar una malla esponjosa sobre la que descansan las células hematopoyéticas primitivas (Fig 3). Las células adventicias o endoteliales representan el segundo

componente celular, éstas cubren las áreas de la superficie luminal de los sinusoides endoteliales, su principal papel consiste en regular el flujo de células hematopoyéticas maduras al torrente sanguíneo (*Chamberlain y cols 1975; Becker-DeBruyn, 1976*). El tercer componente del estroma es el adipocito, típico de la médula ósea no-hematopoyética grasa y probablemente derivado de la acumulación de lípidos por

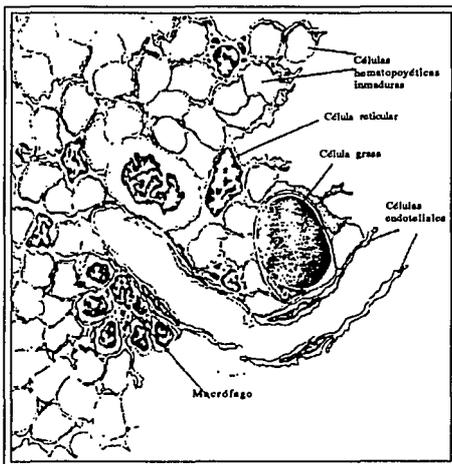


Figura 3. Representación simplificada de los elementos celulares que conforman el microambiente hematopoyético. (Tomado de Dexter, 1989).

las células adventicias (*Weiss, 1976; Weiss, 1981*). El principal papel de estas células es recubrir los espacios de la médula ósea no-hematopoyética con lo cual restringe que el proceso hematopoyético de los huesos largos humanos se localice cerca de las epífisis.

Los componentes de la matriz extracelular consisten en sustancias secretadas por las propias células estromales e incluyen fibronectina, colágena, laminina y algunos glicaminoglucanos (*Zuckerman-Wicha, 1983; Wight y cols, 1986*). Estas moléculas son responsables de la adherencia de una célula con otra y con su sustrato, asimismo, han

sido implicadas en ejercer efectos microambientales en la hematopoyesis (Weinstein, 1989). Estudios realizados *in vitro* se han dirigido a discernir cual o cuales de estas moléculas afectan de manera crucial el desarrollo de las células hematopoyéticas. Inicialmente, se pensó que el papel de estos componentes consistía en asegurar el anclaje con el substrato de las células hematopoyéticas pluripotenciales con lo cual se facilitarían su desarrollo. Sin embargo, cultivos de células de médula ósea utilizando substratos formados con moléculas de la matriz extracelular han fallado en estimular la hematopoyesis *in vitro* (Roberts y cols, 1987).

Por otro lado, existen datos experimentales que demuestran la habilidad de las moléculas de la matriz extracelular para unirse a factores de crecimiento hematopoyéticos. Es conocido que estos componentes tienen la capacidad además de "compartamentalizar" a factores tales como interleucina 3 (IL-3; Interleukin-3) y GM-CSF (Gordon y cols, 1987; Ruoslahti-Yamaguchi, 1991). Uno de los principales problemas que planteó esta situación fue conocer si esta unión estaba asociado con algún componente extracelular en la membrana de las células estromales, o si tenía que ver con las propias moléculas de matriz extracelular presentes en el medio y secretadas por las células estromales. Debido a que la adhesión entre las células estromales con las hematopoyéticas pluripotenciales es fundamental para que se establezca la hematopoyesis, resultó interesante suponer que la unión ocurría a nivel de moléculas presentes en la membrana de las células estromales (Allen-Dexter, 1990).

En 1988 Roberts y cols, demostraron que el proteoglicano sulfato de heparán presente en la membrana de las células estromales tenía la habilidad de unir GM-CSF e IL3. Inclusive, dieron evidencias de que si utilizaban la enzima heparatinasa la habilidad del sulfato de heparán de unir estos factores de crecimiento y de presentarlos a las células hematopoyéticas era fuertemente disminuida (Roberts y cols, 1988).

Es evidente, por lo anteriormente citado, la importancia que tiene el microambiente

hematopoyético en regular la proliferación, el desarrollo y la diferenciación sanguínea. Sin embargo, este papel regulador no habría sido posible ponerlo en evidencia, sin la ayuda de las técnicas de cultivo *in vitro* de células de médula ósea.

C. Sistemas para el estudio *in vitro* del sistema hematopoyético.

1. Cultivos a corto plazo.

Los cultivos a corto plazo, llamados así porque el tiempo de viabilidad de las células hemtopoyéticas en cultivo no es mayor de los 3 meses, ha permitido identificar a las células progenitoras para cada uno de los tipos sanguíneos conocidos, así como aportado evidencias de su clonalidad y de su capacidad de autorrenovación (Sachs, 1992). Es a mitad de la década de los 60 cuando Pluznik y Sachs y Metcalf y Bradley demuestran que las células de médula ósea pueden crecer y diferenciarse *in vitro* si se encuentran suspendidas en geles de agar y en contacto con una monocapa de células estromales (Pluznik-Sachs, 1965; Bradley-Metcalf, 1966) (Fig 4). Posteriormente, prueban que esto se debe a la producción de factores solubles de naturaleza glicoproteica producidos por las células estromales, ya que al sustituir a éstas por su medio con-

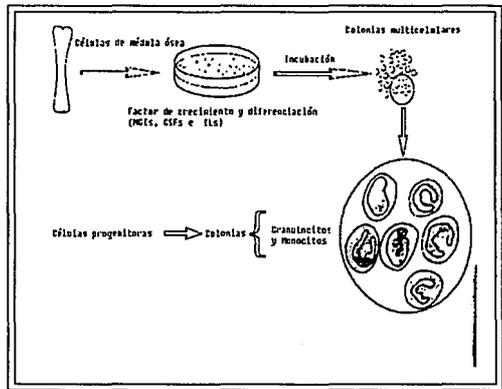


Figura 4. Etapas para el establecimiento de cultivos a corto plazo.

dicionado la proliferación y diferenciación mieloide continua (*Pluznik-Sachs, 1966; Metcalf, 1969*).

Inicialmente, Sachs y Metcalf utilizaron células de bazo y médula ósea de ratón para demostrar que pueden crecer y diferenciarse *in vitro*; unos años después, Pike y Robinson establecieron que con cultivos de células de médula ósea humana, se obtenían los mismos resultados (*Pike-Robinson, 1970*). Al contarse con un sistema en el que podía observarse el desarrollo y la maduración de las células hematopoyéticas bajo diferentes tipos de condiciones, esta rama de la biomedicina conocida como hematología experimental ha contribuido a establecer los conceptos básicos que sobre células progenitoras, determinación celular, factores de crecimiento y diferenciación se conocen actualmente.

La principal aportación de esta técnica de cultivo ha sido en la identificación de las células progenitoras hematopoyéticas (*Gordon-Barrett, 1985*). Las células progenitoras se podían inferir de manera indirecta en las colonias formadas por originar células completamente diferenciadas y distinguibles morfológicamente. De esta manera, ya que en la primera colonia descrita por Sachs y Metcalf se encontraron granulocitos y macrófagos se supuso que ellas derivaban de una célula progenitora bipotencial denominada en aquel tiempo de manera operacional como Unidad formadora de colonias Granulocito-Macrófago (GM-CFU) (*Sachs, 1987; Metcalf, 1989*).

De manera posterior, variando las condiciones de cultivo fue posible identificar a las células progenitoras para eosinófilos (Eo-CFU), basófilos (B-CFU), megacariocitos (Meg-CFU), eritrocitos (E-CFU) y células B y T (ver Tabla 1.). Además, al identificarse en este tipo de cultivos colonias mixtas compuestas de varios linajes mieloides se puso en evidencia que ellas podían originarse de células más primitivas multipotentes denominadas como *CFU-Mix* (*Fauser-Messner, 1979; Metcalf y cols, 1979*). De estos resultados se originó el esquema general de la hematopoyesis aceptado actualmente (ver Fig 2).

Otro aspecto, abordado por los cultivos a corto plazo estuvo encaminado a establecer si las colonias mieloides generadas *in vitro* provenían de clones de células progenitoras, o de muchos de ellos. Utilizando diversos procedimientos experimentales, se demostró su origen clonal:

- a). Después de estimular la proliferación de células de médula ósea y de experimentar éstas su primera división (lo cual se demostraba por formar un par de células en el cultivo), se procedía a sembrarlas a cada una por separado en las mismas condiciones; encontrándose en ambos casos colonias del mismo linaje sanguíneo (*Becker y cols* 1963).
- b). Al utilizarse células heterocigotas para la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), se encontraba que las colonias generadas contenían uno u otro alelo para esta enzima, pero no ambos (*Prchal y cols*, 1976; *Fialkow*, 1982).
- c). Al utilizarse marcadores genéticos como algunos retrovirus para distinguir a una célula progenitora de otra, también se demostró su clonalidad (*Fischbar y cols*, 1967).

Con la identificación de células progenitoras en los cultivos desarrollados por Sachs y Metcalf, se puso en evidencia que la célula tallo pluripotente entra a un estado de desarrollo, en el cual origina a una célula progenitora específica. Este proceso conocido como determinación definirá si la célula progenitora, producirá a uno, a dos o a varios de los linajes sanguíneos. Asimismo, los cultivos de células de médula ósea demostraron que la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas es dependiente de la presencia de varias moléculas de naturaleza glicoproteica. La utilización de esta técnica de cultivo permitió, primeramente, el aislamiento y purificación bioquímica de estos factores y posteriormente, con el desarrollo de la biología molecular; su secuenciación, clonación y finalmente su obtención en la forma recombinante (ver apartado D).

Son evidentes las contribuciones del cultivo de células de médula ósea a nuestro conocimiento del desarrollo que siguen las células sanguíneas influenciadas por factores humorales en los cultivos a corto plazo; con los cultivos de largo plazo se establece la

función del microambiente hematopoyético en la formación sanguínea.

2. Cultivos a largo plazo.

Con el desarrollo de la técnica de cultivo de células de médula ósea a largo plazo implementada por Dexter-Lajtha (1974), se demostró la importancia de las células estromales así como de los componentes de la matriz extracelular en la regulación de la hematopoyesis (Dexter-Lajtha, 1974). En la técnica original de Dexter un inoculo de células de ratón es colocada en una botella de cultivo y dos semanas después una monocapa de célula estromales se ha formado. La eliminación de las células no-adherentes presentes en este cultivo, así como la reinoculación con células de médula ósea fresca recién obtenida, origina un proceso hematopoyético que se mantiene continuo por espacio de 3 a 6 meses (Fig 5).

Un análisis ultraestructural inicial realizado por Allen y cols, de la monocapa de células estromales presentes en los cultivos Dexter, mostró que se encontraba constituida principalmente por célu-

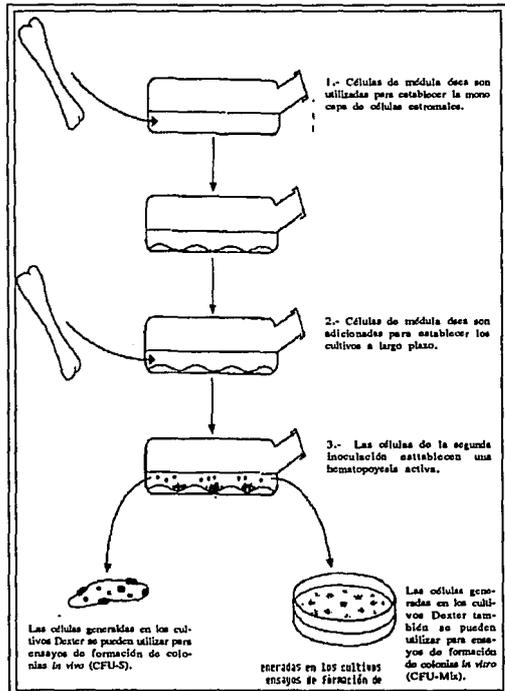


Figura 5. Etapas para el establecimiento de los cultivos de Dexter.

las endoteliales, células reticulares adventicias, fibroblastos, adipocitos y macrófagos (Allen-Dexter, 1990). Asimismo, el describió que de la misma manera como ocurría *in vivo* existía una distribución espacial de las células estromales; de tal manera que las células endoteliales se encontraban en la parte más superior del cultivo y en la parte más interna del mismo estaban los otros tipos celulares (Allen-Dexter, 1984). En lo que respecta, a las células hematopoyéticas tanto la célula pluripotente (CFU-S) como las células progenitoras se localizaban en el interior de la monocapa y del mismo modo como ocurre *in vivo*, los progenitores granulocíticos más maduros en la parte más superior junto a las células endoteliales, mientras que las menos diferenciadas en la parte más interna de la capa endotelial (Coulombel y cols, 1983; Allen-Dexter, 1990).

Es importante comentar que la descripción hecha por Allen acerca de la distribución de las células mieloides en este tipo de cultivos es muy parecida a la realizada por Simmons en 1984. Sin embargo, no ocurre de la misma manera en lo que respecta a las células estromales presentes en los cultivos Dexter. Gracias a la utilización de la microscopía electrónica de transmisión, de la microscopía electrónica de barrido, de la inmunocitoquímica y de la filmación en video, se ha podido establecer que las células predominantes en los cultivos Dexter son células con morfología fibroblastoide probablemente relacionadas con células reticulares y los adipocitos. En lo que se refiere a las células reticulares y células reticulares adventicias, así como a las células endoteliales su presencia no ha sido completamente confirmada, debido en parte, a la falta de marcadores de membrana confiables que permitan identificarlas de manera precisa (Bentley-Foidart, 1980; Dorshkind y cols, 1985; Gimble, 1990).

Existen varias aportaciones de los cultivos Dexter acerca de la potencialidad de las células hematopoyéticas, del papel que desempeñan las células estromales en la hematopoyesis y de la producción de factores de crecimiento hematopoyético por parte de estas últimas. En lo que se refiere a las células hematopoyéticas se ha podido

confirmar que la CFU-GEMM generada *in vitro* tiene la capacidad de repoblar el bazo de ratones letalmente irradiados y de reconstituir por completo los linajes linfóide y mielóide respectivamente (Schrader-Schrader, 1978; Jones-Villeneuve-Phillips, 1980).

En relación a la participación de las células estromales en el proceso hematopoyético, desde hace mucho tiempo ha sido conocido que la interacción entre células estromales y células hematopoyéticas es fundamental en la génesis de la sangre (Dexter, 1979; Bentley, 1981). Los cultivos Dexter han permitido estudiar si ésta interacción está relacionada con los tipos más frecuentes de uniones que se dan entre las células de nuestros tejidos. Análisis a nivel estructural utilizando fracturas por congelación (freeze fracture) y después observándolas por microscopía electrónica de transmisión han demostrado que las células hematopoyéticas no están unidas a las células estromales por ninguna clase de las uniones conocidas para otros tejidos: tight junctions, adherence zonulate junctions y gap junctions (Allen-Dexter, 1990; Dorshkind, 1990). Este hecho poco común, despertó el interés por conocer la manera en la que las células estromales y las células hematopoyéticas interactuaban para mantener el proceso hematopoyético en los cultivos Dexter.

Asimismo, existían datos que demostraban que el contacto físico entre estos dos tipos celulares era necesario para que tuviera lugar la proliferación y diferenciación sanguínea. Experimentos en los cuales se colocó una barrera física entre las células estromales y las células hematopoyéticas (que permitía exclusivamente el paso de moléculas solubles hacia ambos lados), demostró que las células hematopoyéticas invariablemente morían si no se encontraban en contacto con la capa estromal (Allen-Dexter, 1990), de esta manera, se demostraba que la presencia de moléculas solubles no es suficiente para que se dé el desarrollo hematopoyético.

En la actualidad, es aceptada que la participación de moléculas adhesivas es importante para que se establezca un íntimo contacto entre las células estromales y las células

hematopoyéticas; existen evidencias experimentales en las que se ha demostrado que es posible separar a linfocitos adheridos a células estromales por la adición a los cultivos de agentes quelantes como el EDTA o el EGTA (*Witte y cols*, 1987). Asimismo, se ha reportado que cierta clase de moléculas unidas a fosfatidilinositol son importantes en este tipo de contacto, ya que ésta interacción es disminuida si agrega a los cultivos fosfolipasas. Además, se ha comprobado la presencia en la membrana de las células estromales de moléculas de la familia del fosfatidilinositol denominadas como N-CAM, lo cual apoya esta hipótesis (*Thomas y cols*, 1988).

En lo que se refiere a la participación de los factores de crecimiento hematopoyéticos, en el control de la proliferación y diferenciación sanguínea en los cultivos Dexter; inicialmente se dudó que la proliferación y maduración de las células hematopoyéticas estuviera regulada por la producción de factores de crecimiento y diferenciación por parte de las células estromales (*Williams y cols*, 1978; *Dexter*, 1979). Esto se debió a la dificultad para detectarlos y aun cuantificarlos, lo que hizo pensar a algunos investigadores que la hematopoyesis en los cultivos Dexter podía estar regulada por algún otro factor todavía no identificado y diferente a los factores inicialmente descritos *in vitro* por Sachs y Metcalf (*Allen y cols*, 1990).

A principio de la década de los 80 Heard y Song demostraron experimentalmente que las células estromales producen factores reguladores de la proliferación y la diferenciación hemato-linfoide, demostrando que la principal dificultad para detectarlos consistía en la rápida unión e internalización a que están sujetas estas moléculas (*Heard y cols*, 1982; *Song y cols*, 1985). Lo anterior fue demostrado con el Factor estimulador de Colonias de Macrófagos o M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor), por lo cual el anticuerpo monoclonal anti-M-CSF usado, había fallado en detectarlo. Asimismo, ellos fueron capaces de demostrar que la principal molécula estimuladora de la hematopoyesis en los cultivos Dexter era GM-CSF (*Alberico y cols*, 1987).

A pesar de las evidencias anteriores, no era claro el papel de las células estromales en la producción de moléculas reguladoras del crecimiento y maduración hematopoyética, ya que en los experimentos realizados por estos investigadores utilizaron litio e irradiación como estímulo para poder detectar la presencia de M-CSF y GM-CSF. Un modelo más convincente fue el que desarrolló Gordon con el que demuestra que las células estromales producen GM-CSF de manera normal, el cual se une a ciertas moléculas que conforman la matriz extracelular conocidas como proteoglicanos (Gordon y cols, 1987). Un año después, Roberts y colaboradores, confirman esta unión pero lo importante de su trabajo es que identifican que el GM-CSF se une a una molécula presente en la membrana de las células estromales perteneciente a la familia de los proteoglicanos conocida como sulfato de heparán (Roberts y cols, 1988).

En base a estos resultados, en la actualidad es aceptado que la hematopoyesis en los cultivos a largo plazo participan moléculas de naturaleza humoral conocidos como factores estimuladores de colonias: CSFs (Colony stimulating Factors), además de que demostró que la incapacidad para detectarlos se debió a su "secuestro" por parte de los proteoglicanos presentes en la membrana de las células estromales. Otros datos interesantes en cuanto a la participación humoral de las células estromales para el control de la producción hematopoyética, son los que han identificado que bajo condiciones de activación son capaces de producir varios tipos de CSFs y de interleucinas (ILs, por sus siglas en inglés), dentro de las que destacan IL-7 y SCF (Stem Cell Factor) de los que son la fuente exclusiva (Miyajima y cols, 1992).

D. Moléculas reguladoras del crecimiento hematopoyético.

En esta sección se analizará brevemente la historia de los factores humorales responsables del crecimiento hematopoyético, así como sus principales características bioquímicas y moleculares, además de sus efectos biológicos más importantes.

1. Inductores de macrófagos y granulocitos (MGIs).

Históricamente, el estudio de los factores que regulan la proliferación y la diferenciación de células mieloides se inicia en 1906 con los estudios de Carnot y Deflandre en Francia, los cuales describen a la eritropoyetina como el factor responsable en la formación de células rojas o eritroides (*Carnot-DeFlandre*, 1906; *Jelkmann*, 1992). Aunque este es el primer dato de la participación de un factor humoral en la producción de células mieloides, el estudio de los mismos no vuelve a tomarse en cuenta sino ya entrada la década de los 60, cuando Leo Sachs en Israel, describe la presencia de un factor producido por células estromales capaz de estimular la formación de células pertenecientes al linaje macrófago-granulocito, el cual designa MGI (*Pluznik-Sachs*, 1965; *Bradley-Mercalf*, 1966).

En sus estudios pioneros Sachs describe dos tipos de MGIs; el inductor de macrófagos y granulocitos del tipo 1 (MGI-1) el cual se caracteriza por mantener la viabilidad de las células en cultivo, además de estimular su proliferación y el inductor de macrófagos y granulocitos del tipo-2 (MGI-2) el cual estimula preferentemente su diferenciación terminal, sin inducir su proliferación (*Lipton-Sachs* 1981; *Sachs*, 1987; *Sachs*, 1992). Asimismo, Sachs describe que los MGIs del tipo 1 pueden ser de 3 clases: el MGI-1M; el cual estimula la proliferación clonal de macrófagos, el MGI-1G; que induce la formación clonal de granulocitos-neutrófilos y el MGI-GM; que estimula la formación

clonal de ambos tipos celulares. Es importante mencionar que Sachs no únicamente describe a estos inductores de la proliferación y diferenciación mielomonocítica, sino además, las fuentes celulares productoras de los mismos, así como las masas moleculares relativas de estos factores (*Sachs, 1992*).

Como se verá en la siguiente sección, los factores MGI-1M, MGI-1G y MGI-GM descritos por Sachs son sinónimos de los factores M-CSF, G-CSF y GM-CSF descritos de manera posterior por la escuela australiana encabezada por Metcalf. Es curioso hacer notar, que aunque el grupo que inicialmente descubrió este factor fue el israelí llamándole MGI, es el término CSF del grupo australiano el más empleado hoy en día. Esta situación obedece a que este grupo, junto con otros investigadores en el mundo son los primeros en purificar a homogeneidad a los CSFs, además de caracterizarlos molecularmente y obtenerlos en forma recombinante.

2. Factores estimuladores de colonias (CSFs).

Aunque durante la mayor parte de la década de los 60 y 70 no existe un consenso acerca de si las siglas MGI o las de los CSFs son las más apropiadas para describir a estos factores que tienen el mismo efecto sobre células mielomonocíticas, un paso decisivo en adoptar las siglas CSFs es la secuenciación de aminoácidos y ácidos nucleicos de estas moléculas por la escuela australiana que culmina en la obtención de estos factores en forma molecularmente definida y recombinante (*Morstyn-Burgess, 1988; Metcalf, 1992*).

En un inicio se pensó, que la acción de los CSFs sobre células mieloides era linaje-específico ya que los factores descritos como GM-CSF, G-CSF y M-CSF afectaban los linajes granulocito-macrófago exclusivamente. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que los CSFs tienen un espectro de acción biológica sobre células

hematopoyéticas mucho más amplio (Tabla 2). Bazan ha descrito a estas propiedades biológicas de los CSFs sobre células mieloides de ser redundantes y promiscuas: más de un CSF puede actuar sobre una célula hematopoyética y una molécula de CSF puede tener efectos biológicos en más de una célula hematopoyética (Bazan, 1990).

Tabla 2. Efecto biológico de los CSFs sobre células hematopoyéticas y no hematopoyéticas.

CSFs	Célula blanco	Efectos biológicos
MULTI-CSF	CFU-S y CFU Mix	Estimulación a la proliferación y a la diferenciación
	Progenitores de eritrocitos, megacariocitos células cebadas y basófilos	Formación de colonias a alta concentración del factor
	Macrófagos y granulocitos	Proliferación y diferenciación.
	LMA	Favorece su crecimiento
GM-CSF	Progenitores mieloides Macrófagos	Efecto proliferador Formación de colonias a baja concentración del factor
	Granulocitos	Formación de colonias a alta concentración del factor
	LMA	Factor clonogénico
G-CSF	Neutrófilos y eosinófilos Epiteliales Macrófagos	Activación Proliferación Formación de colonias a alta concentración del factor
	Neutrófilos	Formación de colonias, estimulación, activación, recuperación in vivo después de depletación
	Fibroblastos Epiteliales tumorales Neutrófilos	Proliferación Proliferación Formación de colonias a alta concentración del factor
		Formación de colonias; altamente específico para la maduración del linaje monocito-macrófago; activación.
M-CSF	Macrófagos	

Los CSFs pertenecen a una familia de modificadores biológicos conocidos como citocinas: dentro de las que se incluyen a las interleucinas (IL-1 a IL-12), a los interferones (INF: α , β y γ) y a los factores de crecimiento (PDGF, EGF, FGF, IGF y TGF) (*Arai y cols*, 1990; *Aggarwal-Guterman*, 1992). Los CSFs son polipéptidos monoméricos de varios cientos de aminoácidos, solamente el M-CSF es un dímero compuesto de unidades de aproximadamente 14.5 KDa. Los pesos moleculares de los CSFs oscilan en un rango de los 20 000 a los 70 000 daltones, encontrándose variaciones en los pesos moleculares dependiendo del grado de glicosilación de estas moléculas (*Golde-Gasson*, 1988; *Dexter*, 1989; *Heyworth y cols*, 1990).

La importancia biológica de los CSFs en el control de la producción y diferenciación mieloide ha sido claramente demostrada *in vitro* e *in vivo*. Las células de médula ósea en cultivo mueren invariablemente si se les suprime de la presencia de estos factores; se ha demostrado que los CSFs ayudan en la viabilidad de las células de médula ósea al estimular la producción de ATP intracelular. *In vivo*, existe un claro incremento en las cuentas de leucocitos provocado por la administración exógena de los CSFs, observándose un relación dosis-dependiente para el caso de GM-CSF y G-CSF (*Ruef-Coleman*, 1990; *Moore*, 1991). Asimismo, los CSFs tienen la capacidad de favorecer diversas actividades biológicas en células hematopoyéticas principalmente en células del linaje granulocito-macrófago dentro de las que se incluyen: actividad bactericida, citotóxica y antitumoral (*Clark-Kamen*, 1987).

Para que los CSFs puedan desencadenar una respuesta biológica en las células blanco sobre las que inciden necesitan unirse a un receptor específico que para el caso de las células mieloides se encuentran en el orden de 500 a 50 000 receptores/célula (*Nicola*, 1989). Con el empleo de las herramientas de clonación molecular, los receptores de los CSFs han sido purificados a homogeneidad, a excepción del M-CSF que pertenece a la subfamilia de receptores presentes en los factores de crecimiento con un dominio

intracelular tirosina-cinasa dentro de los que se incluyen el receptor para PDGF y para el ligando del receptor c-kit conocido como SCF (Stem Cell Factor), los receptores para IL-2, (cadena β), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, G-CSF, GM-CSF y EPO carecen de un dominio intracitoplasmático tirosina-cinasa (Cosman y cols, 1990; Gillis, 1991).

La característica principal de esta familia de receptores, conocida como la superfamilia de las citocinas, es su elevada homología en la región extracelular N-terminal, la cual tiene una extensión aproximada de 210 aminoácidos, caracterizándose por presentar dos pares de cisteínas además de algunos triptófanos y la secuencia Ser-Trp-X-Ser-Trp (donde X es un aminoácido no conservado) en la porción C-terminal. No ocurre de la misma manera con el dominio intracelular el cual varía desde los muy cortos como en el caso del GM-CSF (54 aminoácidos) hasta los muy largos como en la IL-4 (568 aminoácidos) (Fig 6).

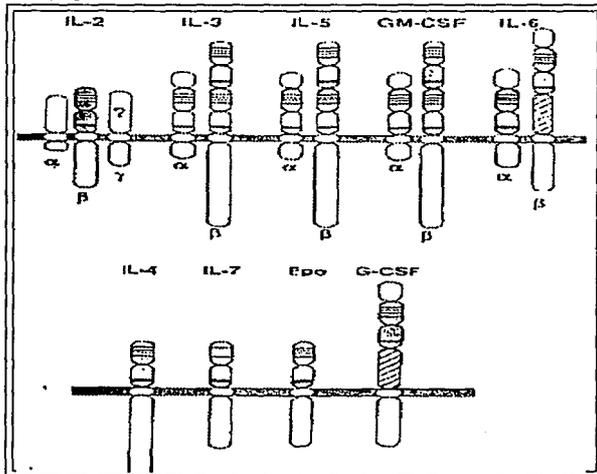


Figura 6. La superfamilia de los receptores para los factores estimuladores de colonias y la interleucinas. En la parte superior se encuentran los receptores que necesitan dos subunidades para formar un receptor de alta afinidad. En la inferior, aquellos que tienen alta afinidad por si solos o cuando forman homodímeros.

La localización génica para algunos de los receptores pertenecientes a esta superfamilia así como para la gran mayoría de los CSFs y algunas interleucinas ha sido obtenida. Es de particular interés destacar que la mayoría de los CSFs, exceptuando al G-CSF que se encuentra en el cromosoma 17, se localizan en el cromosoma 5 juntos con los genes para IL-4, IL-5, SCF, el receptor para PDGF y el receptor para M-CSF (el proto-oncogene *c-fms*) (Dexter, 1989).

Es importante comentar que los CSFs no son los únicos factores que poseen la capacidad de estimular la producción y maduración hematopoyética ya que otro grupo de moléculas conocidas como interleucinas (IL-1 a IL-12) también pueden incidir en el desarrollo hematopoyético, ya sea actuando de manera directa o indirecta.

3. Interleucinas (ILs).

Inicialmente, las interleucinas (ILs) fueron descritas como moléculas producidas por células blancas o leucocitos cuya característica principal consistía en mediar respuestas inmunes o inflamatorias (Oppenheim, 1981). Sin embargo, con el advenimiento de la biología molecular que facilitó la purificación de las interleucinas a homogeneidad, permitió evaluar sus efectos biológicos en otros tipos celulares. De esta manera, ahora es conocido que las interleucinas 1, 2, 4, 5, y 6, (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5 y IL-6) pueden participar en la proliferación y la diferenciación de las células hematopoyéticas tanto de manera directa como indirecta (Balkwill-Burke, 1989; Platzer, 1989). Asimismo, recientemente se han identificado a las interleucinas 7, 8, 9, 10 y últimamente a la 11 y 12 con lo cual el espectro de modificadores biológicos que inciden en el compartimiento hematopoyético se ha ampliado de manera considerable (Aggarwal-Gutterman, 1992; Metcalf, 1992).

Es importante hacer notar que las interleucinas pueden actuar del mismo modo que

los CSFs en diferentes estadios del desarrollo hematopoyético. Así tenemos que la IL-1 actúa a nivel de la célula tallo multipotencial haciéndola susceptible a responder a otros factores de crecimiento (*Dinarelli*, 1991). Asimismo, nuestro grupo ha confirmado que este factor también tiene efectos directos sobre células mieloides ya que estimula su diferenciación (*Mendoza y cols*, 1990; *Santiago y cols*, 1992). En lo que se refiere a la IL-4 y a la IL-6, ambas estimulan la formación de colonias mieloides sobre todo cuando se usan en combinación con otros CSFs. Sin embargo, existen reportes de que solas pueden ejercer efectos biológicos principalmente en células del linaje monocito-macrófago (*Van Snick*, 1990; *Paul*, 1991). De particular interés es la IL-5, que a diferencia de las otras interleucinas es específico en su efecto biológico ya que estimula exclusivamente la proliferación y diferenciación de eosinófilos humanos y en ratones de células "mast" (cebadas) (*Sanderson*, 1992).

En lo que se refiere a las interleucinas últimamente definidas, se sabe que la IL-7 participa en estadios iniciales del desarrollo linfoide: células pre-B y pre-T, pero carece de acción biológica en células B maduras no así en linfocitos T (*Goodwin-Namen*, 1992). La IL-8 ha sido identificada por sus capacidades quimiotácticas sobre granulocitos-neutrófilos, sin afectar su proliferación o su diferenciación (*Zachariae-Matsushima*, 1992). La IL-9 se ha asociado con el desarrollo de los linfocitos T y de células cebadas (*Moeller y cols*, 1990). En lo que se refiere a la IL-10, se ha visto que tiene efectos inhibidores de la producción de interferón γ y de otras citocinas sobre linfocitos T auxiliares (*Moore y cols*, 1990). Aunque la IL-9 y la IL-10 no poseen efectos biológicos sobre células mieloides, la IL-11, además de sus efectos sobre células linfoides, estimula el desarrollo de los megacariocitos, siendo considerado por esta razón un factor linfohematopoyético (*Paul y cols*, 1990; *Musashi y cols*, 1991). En el caso de la IL-12 se ha descrito que sus principales efectos son sobre células T citotóxicas y NK (*Stern y cols*, 1990; *Mercalf*, 1992). De esta manera, la participación de los CSFs y de las ILs en el

tativa y las segundas de la inducida (*Miyajima, 1992*). Dada la amplia distribución de las células del linaje monocito-macrófago en el organismo y de su capacidad de responder en situaciones normales y de "stress" es considerado como una célula sensora y administradora de las respuestas biológicas.

E. El macrófago como administrador celular en la producción de granulocitos-neutrófilos.

En esta sección, se analizarán los aspectos antes descritos haciendo énfasis en la función de los macrófagos en la producción de los granulocitos-neutrófilos.

1. Origen, distribución y principales características bioquímicas y funcionales.

Los macrófagos o células del sistema fagocito-mononuclear, es el término comúnmente empleado para designar a las células fagocíticas derivadas de la médula ósea. Los fagocitos-mononucleares se originan de un progenitor bipotencial conocido como GM-CFU. La GM-CFU que tiene la capacidad de originar tanto a los macrófagos como a los granulocitos posteriormente quedará determinada, por mecanismos aún poco comprendidos, y originará al primer descendiente del linaje monocítico: el monoblasto, el cual de manera posterior se diferenciará a promonocito y éste finalmente a monocito (*Lasser, 1983; Nelson, 1991*).

Es importante comentar, que este proceso de monocitopoyesis se lleva a cabo en aproximadamente 6 días en la médula ósea y una vez completado, una parte de los monocitos pasan al torrente sanguíneo y la otra, se agrupa como monocitos marginales, listos a ser requeridos en condiciones de "stress". Se considera macrófago o histiocito cuando pasa del torrente sanguíneo a los diferentes órganos y tejidos del organismo donde reside por meses y, se cree inclusive que por años. Una vez que el macrófago se ha establecido en un órgano o tejido particular, adquiere características y propiedades

específicas determinadas por el microambiente circundante (*Foster-Landy*, 1981; *Dean-Jessup*, 1986). Sin embargo, independientemente del lugar donde se localicen, los macrófagos conservan ciertos atributos por los cuales se pueden distinguir de otros tipos celulares (Tabla 3).

Tabla 3. Atributos de los fagocitos mononucleares.

1. Apariencia morfológica	Células mononucleares de 10 a 15 micras de diámetro
2. Características citoquímicas	Actividad de: esterasa no-específica, peroxidasa, secreción de lisosima, de 5'-nucleotidasa y aminopeptidasa
3. Determinantes antigénicos	Receptores para Fc-gamma, para C3b, para CSF y para lactoferrina
4. Características funcionales	Fagocitosis de bacterias opsonizadas, de esferas de poliestireno y de hierro Pinocitosis
5. Secreción de glicoproteínas y proteínas específicas	Proteínas plasmáticas, componentes del complemento, prostaglandinas, enzimas secretoras y no secretoras

En la Figura 8, se representa de manera esquemática el desarrollo del macrófago así como su distribución y los principales nombres con las que se conocen a estas células dependiendo del tejido o órgano donde se localicen. Es importante destacar que la concentración de los macrófagos en los diferentes órganos y tejidos es disímil, siendo mayor en el hígado, el bazo, los nódulos linfáticos, la médula ósea, el alvéolo pulmonar, las cavidades pleural y peritoneal y, menor en cerebro, piel y fluido sinovial (*Gordon y cols*, 1988).

Debido a su amplia distribución, los fagocitos mononucleares tienen la facultad para "monitorear" el *status quo* del organismo y, responder a diferentes tipos de señales: físicoquímicas, humorales y celulares tanto en condiciones normales como de "stress". Cuando se altera el estado homeostático interno, el macrófago experimenta un proceso de activación liberando una gran variedad de enzimas, hormonas, proteínas y modificadores

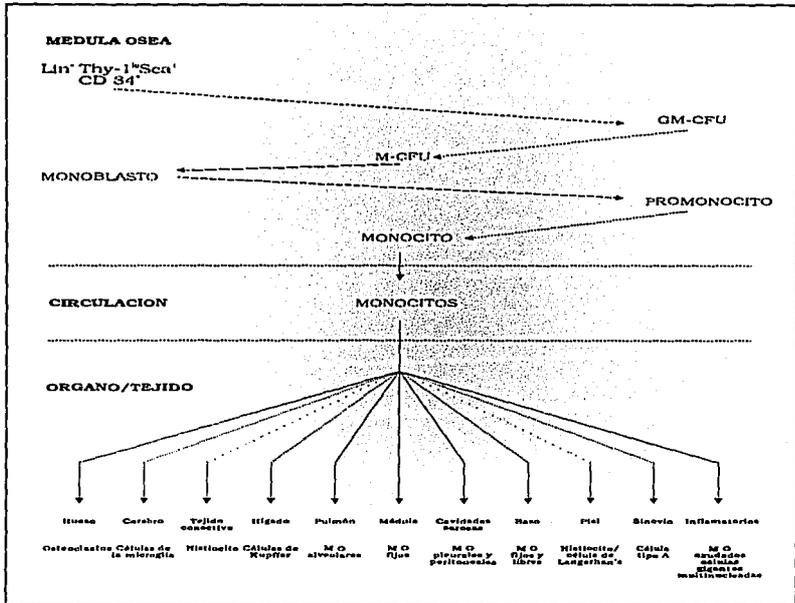


Figura 8. Origen y distribución de los fagocitos mononucleares.

biológicos, cuya función principal es restablecer el equilibrio interno (Tabla 4).

Como consecuencia de la secreción de estos productos biológicos el macrófago tiene la capacidad de modular una gran variedad de actividades fisiológicas: dentro de las que se incluyen las inmunológicas y las de eliminación de detritus celulares. En lo que se refiere al compartimento hematopoyético, se sabe que el macrófago es capaz de producir varios tipos de CSFs (*Powandi y cols*, 1988). Sin embargo, como veremos en la subsiguiente sección, es sólo hasta el año de 1988 que se empiezan a dar evidencias cualitativas y cuantitativas del papel de los fagocitos-mononucleares en la regulación de la hematopoyesis, particularmente en la generación de granulocitos-neutrófilos.

Tabla 4. Productos biológicos producidos por el macrófago.

1. Enzimas secretoras	Lisozomales, hidrolasas, β -galactosidasa, β -glucoronidasa, N-acetilglucosaminidasa, lisozima, nucleasas, ribonucleasas, deoxiribonucleasas, fosfatasas, fosfatasa ácida, alfa-náptil, lipasas de lipoproteínas, arginasa, proteínasas (catepsinas: B, D, H, L, N), activador del plasminógeno, colagenasas (tipos: I-IV), elastasa, tromboplastina, proteína amiloide, hialuronidasa
2. Enzimas no-secretoras	Lactato-deshidrogenasa, peroxidasa, transglutaminasa, 5'-nucleotidasa
3. Proteínas plasmáticas	Alfa-2-macroglobulina, fibronectina, transcobalamina II, apolipoproteína E, proteínas de coagulación, tromboplastina tisular, factores V, VII, IX y X, componentes del complemento (C1, C2, C3, C4, C5), properidina, factor B y D, inhibidor de C3b
4. Sustancias de bajo peso molecular	Radicales de oxígeno libre, peróxido de hidrógeno, cAMP, timina, uracilo, ácido úrico, prostaglandinas (E2, I2, F2, 6-ceto-PG F1, leucotrieno C)
5. Factores reguladores de la función celular	Interleucina-1, interleucina-3, interleucina-6, interleucina-8, factor de necrosis tumoral, factor de crecimiento derivado de plaquetas, interferón, eritropoyetina, factor de crecimiento de fibroblastos, factor angiogénico

2. El macrófago y su papel en la producción y diferenciación de los granulocitos-neutrófilos.

Las primeras evidencias experimentales para considerar a las células del sistema monocito-macrófago con un papel importante en la generación de los granulocitos-neutrófilos, se basan en los experimentos realizados en 1987 por Rich en Alemania. Al estar estudiando el papel inhibitorio de la lactoferrina, la cual se conocía desde 1979 era un inhibidor de la hematopoyesis, encontró que la formación de colonias hematopoyéticas no era disminuida por esta proteína, sino por el contrario, era estimulada (Rich-Sawatzki, 1987).

Cuando Rich y cols, evaluaron los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de macrófagos residentes cultivados en presencia de lactoferrina, sobre células de médula ósea en cultivos en agar, encontraron que las colonias que se desarrollaban en este sistema consistían principalmente de granulocitos-neutrófilos. Estos resultados demostraban que la lactoferrina provocaba que el macrófago produjera un factor (es) de crecimiento y diferenciación de neutrófilos. Una prueba más contundente del papel de la lactoferrina en la generación de los granulocitos-neutrófilos, la obtendría un poco después cuando inoculó *in vivo* esta molécula y, demostró que los conteos de neutrófilos en sangre periférica se incrementaban claramente en comparación con los controles (Rich, 1988).

De esta manera, Rich y cols, fueron los primeros en dar evidencias de que el macrófago puede regular la producción de los granulocitos-neutrófilos. Sin embargo, estos resultados no demuestran que esta producción de neutrófilos inducida por la lactoferrina, sea a consecuencia de la secreción por parte del macrófago de un factor de crecimiento específico para los granulocitos.

Otra línea de investigación independiente, encaminada a demostrar la participación de los macrófagos en la producción y diferenciación de los granulocitos-neutrófilos es la que

se persigue en el presente trabajo doctoral. Los primeros resultados que nos hicieron pensar en ese sentido fueron los obtenidos previamente en nuestro laboratorio, en los cuales dábamos evidencias de que la producción de los CSFs en condiciones normales es célula-específica y dependiente del ciclo celular (*Zambrano y cols, 1989 b*).

Debido a que era conocido desde inicios de la década de los 70, que los sobrenadantes de los cultivos de fibroblastos originaban colonias de macrófagos fue aceptado que este tipo celular producía M-CSF (*Stanley y cols, 1970*). Unos años después Weiss y cols, demuestra que las células epiteliales son la principal fuente de GM-CSF. Como posteriormente se comprueba que los linfocitos T son los principales productores de IL-3, este mismo investigador propone que la producción de los CSF es célula específica (*Zambrano y cols, 1989 a*). Sin embargo, en lo que se refiere a la producción de G-CSF no existían datos acerca de cual sería el tipo celular involucrado. Una aproximación de que los macrófagos pudieran participar en la génesis de los granulocitos fue obtenida por nuestro grupo al estar trabajando con monocitos derivados de médula ósea y, estudiar que tipo de CSF producían (*Zambrano y cols, 1988*).

Tratando de demostrar que la producción de los CSFs es célula específica y dependiente del ciclo celular, encontramos que cuando estimulábamos a proliferar a monocitos derivados de la médula ósea con el factor M-CSF (factor de crecimiento de macrófagos) estos eran capaces de producir un CSF con diferente masa molecular al M-CSF empleado y a los reportados previamente para GM-CSF e IL-3 (*Zambrano y cols, 1988; Zambrano y cols, 1989 a*). Este resultado apoyaba nuestra hipótesis de la producción célula-específica de los CSFs. Asimismo, el hecho de que los monocitos de médula ósea produjeran un factor con actividad estimuladora de colonias, despertó nuestro interés por estudiar las características bioquímicas y biológicas de este CSF.

La aproximación bioquímica se obtuvo cuando el CSF derivado de monocitos de médula ósea se purificó parcialmente obteniéndose una masa molecular de 45 kd. (*Mora*

y cols, 1988). Además, reportes citados en la bibliografía corroboraban que el CSF de 45 kd reportado por nuestro grupo había sido detectado con la misma masa molecular en macrófagos residentes e inducidos de cavidad peritoneal (*Calgano y cols, 1982*), en una línea de tipo macrófagico y en monocitos de sangre periférica humana (*Lotem y cols, 1980; Sullivan y cols, 1985*), haciendo suponer que las células del sistema monocito-macrófago producen un CSF que es célula-específica.

Pero la interrogante principal consistía en conocer el tipo celular mielóide sobre el que incidía este CSF. Debido a que los macrófagos producen sustancias con capacidades diferenciadoras sobre granulocitos (*Nathan, 1987; Paveri y cols, 1988*) y tomando en consideración que hemos propuesto que la producción de los CSF es célula-específica, en este trabajo se estudiará si el CSF de 45 kd es un factor de producción y diferenciación de granulocitos-neutrófilos (G-CSF). Asimismo, si esta molécula tiene efectos diferenciadores sobre este linaje y además, si es producida por macrófagos normales indicando la naturaleza célula-específica del G-CSF.

Por otra parte, debido a que células no-hematopoyéticas del tipo de los fibroblastos participan en la producción de las células sanguíneas a través de la secreción de CSFs, en particular de M-CSF, el cual estimula el crecimiento de los macrófagos y de que como ha sido demostrado por nuestro grupo, los macrófagos bajo el estímulo del M-CSF producen un CSF de 45 kd y de que es conocido que los macrófagos producen factores con actividades mitógenas sobre fibroblastos (*Leibovich, 1978; Lovhaug y cols, 1986*), la segunda fase de este trabajo doctoral estudiará si este CSF de 45 kd es un factor de crecimiento para fibroblastos normales.

De demostrarse lo anterior, se estaría dando evidencias de la interrelación que existe a nivel humoral entre células hematopoyéticas y estromales en la regulación de la producción de granulocitos-neutrófilos.

***PLANTEAMIENTO
DEL PROBLEMA***

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de la función que tienen los factores estimuladores de colonias (CSFs) sobre la producción hematopoyética se ha expandido de manera considerable desde la primera descripción que se hiciera de los mismos hace más de 28 años. En un inicio el interés se centró en conocer cuales eran los tipos celulares que participaban en la producción de estas moléculas, demostrándose que casi cualquier tejido u órgano de nuestro organismo tenían la capacidad de generar los CSFs (*Sachs, 1992; Metcalf, 1992*).

Posteriormente, el estudio se enfocó en conocer qué células de manera normal producen CSFs, comprobándose que bajo condiciones normales los principales tipos son: los fibroblastos que producen M-CSF, las células epiteliales que producen GM-CSF y los linfocitos T que producen IL-3 (*Zambrano y cols, 1990 a; Zambrano y cols, 1990 b; Ihle y cols, 1982*).

En lo que se refiere al G-CSF, aunque se han descrito diversos tipos celulares tanto normales como tumorales que toman parte en su producción (*Berdel y cols, 1989*), el papel del macrófago en producir este factor no había sido considerado. Como se describió en el marco teórico los primeros datos reportados de la participación de los macrófagos en la producción de los granulocitos fue con los trabajos de Rich y cols, en 1988, demostrando que los macrófagos eran capaces de favorecer el desarrollo, tanto *in vitro* como *in vivo*, de los granulocitos en presencia de lactoferrina (*Rich, 1988*). Sin embargo, en sus estudios no demuestra que sea como consecuencia de la producción de los macrófagos de algún factor de crecimiento particular, o de G-CSF.

De manera independiente, resultados previos obtenidos por nuestro grupo demostraron que las células del linaje monocito-macrófago previamente estimulados con endotoxinas o como consecuencia de su proliferación; estimulaban la formación de colonias de granulocitos en cultivos de médula ósea (*Mora y cols, 1988; Zambrano y cols, 1990 a*).

Los datos indicaban la posibilidad de que los macrófagos estuvieran secretando al medio un factor o factores responsables de la generación de granulocitos.

Teniendo en cuenta los antecedentes antes descritos, en este trabajo se estudió si los macrófagos tanto normales como provenientes de una línea celular transformada tienen la capacidad de secretar G-CSF como consecuencia de su activación o como parte de su producción normal, además de caracterizar el peso molecular de este factor y de contribuir al concepto de que la producción de los CSFs es célula-específica.

Por otra parte, teniendo en consideración que durante el proceso hematopoyético se necesita una íntima asociación entre las células estromales y las células hematopoyéticas para la producción de células sanguíneas *de novo*, además de que es conocido que los CSFs producidos por cierto tipo de células estromales, como los fibroblastos y las células epiteliales, estimulan a su vez a las células hematopoyéticas de manera parácrina a producir *de novo* CSFs y de que recientemente ha sido demostrada la presencia de receptores de CSF en células tumorales (*Shoukat y cols, 1988; Berdel y cols, 1989*), en este trabajo se estudió si el CSF producido por macrófagos, que suponemos es G-CSF, a su vez posee la capacidad parácrina de estimular la proliferación de fibroblastos, ya que de demostrarse este efecto indicaría la existencia de un mecanismo de retroalimentación humoral positiva para la producción de los granulocitos.

***HIPOTESIS
Y
OBJETIVOS***

HIPOTESIS

Existen evidencias experimentales que demuestran que la producción del GM-CSF, del M-CSF y de la IL-3 es célula-específica. Para el caso del G-CSF aunque ha sido descrito su producción tanto por células normales como tumorales, aún no se ha identificado el tipo celular principal en su generación. Teniendo en consideración resultados de nuestro grupo de que las células del linaje monocito-macrófago de varios órganos y tejidos producen un inductor con actividad tipo CSF de 45 KD; se sugiere que esta molécula pueda ser un factor con capacidad de proliferación y diferenciación de granulocitos (G-CSF).

Por otro lado, debido a la cooperación que se genera entre los macrófagos y los fibroblastos en los procesos de reparación de tejido (cicatrización) como consecuencia de traumatismo, en la que es bien conocido que los macrófagos producen varios factores de crecimiento para fibroblastos y los fibroblastos factores de proliferación y diferenciación hematopoyética, y de que recientemente se ha demostrado la presencia de receptores para algunos CSF en células estromales de origen tumoral, sugerimos que el CSF de 45 kd que producen los macrófagos o el mismo rhG-CSF pueden ser factores de proliferación de fibroblastos. Esto pondría en evidencia la existencia de un mecanismo que controlaría tanto la repación de tejido como la generación de células sanguíneas efectoras (en este caso granulocitos).

OBJETIVO GENERAL

Estudiar si las células del linaje monocito-macrófago producen un inductor de la proliferación y diferenciación de granulocitos, caracterizar bioquímicamente el peso molecular de este factor, determinar si esta producción es general de macrófagos y si este inductor o el rhG-CSF tienen la capacidad de estimular la proliferación de fibroblastos.

Objetivos Particulares

- 1.- Estudiar si macrófagos normales de médula ósea y de cavidad peritoneal son capaces de producir un inductor con actividad estimuladora de colonias de granulocitos.
- 2.- Evaluar si la línea de tipo macrofágico WR19M.1 produce un inductor con actividad estimuladora de colonias de granulocitos.
- 3.- Determinar bioquímicamente el peso molecular aparente del inductor con actividad estimuladora de colonias de granulocitos.
- 4.- Evaluar si este inductor parcialmente purificado tiene efectos sobre la formación de colonias de granulocitos, además de estimular sus funciones efectoras como la fagocitosis de partículas de latex sobre granulocitos y en poblaciones de macrófagos.
- 5.- Estudiar si el inductor parcialmente purificado posee la capacidad de estimular la proliferación de fibroblastos tanto a baja como a alta densidad.

MATERIAL
Y
METODOS

MATERIALES Y METODOS.

Se utilizaron ratones de 4 a 8 semanas de edad, de la cepa CD-1 como donadores de células de médula ósea, de macrófagos residentes e inflamatorios de la cavidad peritoneal, así como de pulmones y riñones para la obtención de fibroblastos y células epiteliales respectivamente.

Condiciones de cultivo.

Tanto los cultivos de células hematopoyéticas como de las células estromales, se realizaron en una atmósfera de 10% de CO₂, a 37° C y con 95% de humedad relativa. Se utilizó medio de cultivo mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM: Sigma Chemical Co; St. Louis, MO), suplementado con 10% de suero de caballo para los cultivos de las células hematopoyéticas (Microlab, D.F. México) y con suero fetal de bovino (Microlab) al mismo porcentaje para los cultivos de fibroblastos de pulmón y células epiteliales de riñón. Antes de su uso tanto el suero de caballo como el suero fetal de bovino fueron inactivados a 56° C por 30 minutos.

Una vez que se preparó el DMEM (Apéndice I), se le adicionó 100 ug/ml de estreptomycin, 100 U/ml de penicilina G cristalina y 3.7 g/ml de bicarbonato de sodio (Sigma) antes de utilizarlo como medio de cultivo.

En los cultivos celulares se utilizaron cajas de petri de 60 x 15 mm de diámetro (Nunc), Dinamarca) para el crecimiento de los fibroblastos de pulmón y de las células epiteliales de riñón y para los cultivos de las células hematopoyéticas cajas de petri de 35 x 10 mm de diámetro (Nunc). Para los ensayos de proliferación celular se utilizaron placas de fondo plano de 96 pozos (Nunc).

Células:

Fibroblastos de pulmón.

Para la obtención de fibroblastos del pulmón los animales fueron sacrificados por dislocación médulo-encefálica. Posteriormente, se realizó una incisión ventral a nivel del tórax y se extrajeron los pulmones. Ambos órganos fueron lavados en solución amortiguadora de fosfatos (SAF) (Apéndice II) hasta eliminar la mayor cantidad de sangre. Se cortaron los pulmones sin desgarramiento del tejido, en trozos de 3 mm aproximadamente. Los pedazos de pulmón se colocaron en un matraz erlenmeyer de 50 ml adicionándole 10 ml de una solución al 0,05% de colagenasa tipo IV (Sigma). El matraz con los pulmones se colocó en baño de maría a 37 ° C durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se retiró la solución enzimática y se agregó colagenasa recién preparada a la misma concentración y temperatura, pero incubadas por 15 min.

Una vez realizadas estas dos disgregaciones enzimáticas, todo el contenido se pasó a través de una malla de nylon para separar al tejido no disgregado, colectándose todo el contenido en un tubo cónico de 50 ml. El tubo cónico con las células fue colocado en un baño de hielo por 5 minutos para inactivar a la enzima.

Se centrifugó todo el contenido a 70 x g por 5 min, desechándose el sobrenadante. Esta operación se repitió en 3 ocasiones más utilizando 5 ml de SAF, a las mismas revoluciones y por el mismo periodo.

Las células obtenidas se contaron con la ayuda de un hemocitómetro y se sembraron 5 X 10³ en cajas de 60 x 15 mm de diámetro por 7 días.

Células epiteliales de riñón.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación médulo-encefálica, posteriormente se realizaron dos incisiones dorso-laterales extrayéndose los riñones. Estos se colocaron en una caja de petri que contenía 5 ml de SAF. Antes de su procesamiento se descapsularon y se cortaron en trozos de aproximadamente 3 mm. Hecha esta operación los trozos del tejido se pasaron a un matraz erlenmeyer de 50 ml, precediendo a su disgregación enzimática.

Para ello, se agregó dependiendo de la cantidad de tejido, de 10 a 20 ml de tripsina tipo II (Sigma) a una concentración de 0.25 % en SAF. El matraz con el tejido y la solución enzimática se colocó en baño de maría a 37 ° C por 10 minutos. Después de transcurrido este tiempo, se retiró la solución enzimática con la ayuda de una pipeta estéril y se agregaron 20 ml de solución enzimática recién preparada colocándose nuevamente el matraz en baño de maría a 37 ° C pero ahora por 30 a 45 min (esto dependerá de la cantidad del tejido disgregado).

Una vez que se alcanzó aproximadamente un 75% de disgregación del tejido, se procedió a pasar todo el contenido del matraz a través de una malla de nylon para retener al tejido no disgregado, colectándose el contenido en un tubo cónico de 50 ml. Se procedió a inactivar a la enzima ya sea colocando el tubo en un baño de hielo por 5 minutos o agregando a aquél 0.5 ml de suero de caballo o fetal de bovino.

Realizado lo anterior, se centrifugó a 70 g por espacio de 3 minutos, se desechó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados más con 5 ml de SAF c/u por el mismo periodo de tiempo. Se contó el número celular y se sembró de 5×10^5 a 1×10^6 células en cajas de petri de 60 X 15 mm, incubando por espacio de 7 días.

Células de médula ósea.

Se sacrificó al ratón por el procedimiento ya descrito. Posteriormente, se hizo una incisión a nivel medio de cada una de las dos extremidades anteriores del animal para extraer los 2 huesos fémurs, los cuales fueron colocados en 5 ml de DMEM. Después de lo cual se procedió a quitarles el exceso de tejido muscular con la ayuda de pinzas y tijeras estériles.

Realizada la operación anterior se procedió a desalojar el tejido medular, para ello se emplearon jeringas de insulina estériles con las cuales se tomó 1 ml de DMEM haciéndolo fluir de un extremo a otro del hueso. Se repitió la operación hasta conseguir que la mayor cantidad del tejido medular fuera desalojado (el número de células hematopoyéticas obtenidas por este procedimiento debe estar en un valor aproximado de $15 \text{ a } 20 \times 10^6$).

Una vez hecho lo anterior, se centrifugaron las células de médula ósea a $70 \times g$ por 5 min, repitiéndose la operación 2 veces más bajo las mismas condiciones. Se contaron las células con la ayuda de un hemocitómetro, sembrando 5×10^5 células para los ensayos en agar.

Macrófagos y granulocitos "inflamatorios" de la cavidad peritoneal

Para la obtención de macrófagos y granulocitos "inflamatorios" de la cavidad peritoneal, los ratones fueron inyectados i.p. con 3 ml de caseinato de sodio (Difco Laboratories, Detroit, MI) al 10% en SAF. Mediante lavado peritoneal, los granulocitos fueron colectados a las 16 hrs y los macrófagos a los 4 días mediante el procedimiento siguiente: una vez sacrificados los ratones se realizó una incisión de aproximadamente 5 mm a nivel del abdomen; con una jeringa de 20 ml se introdujeron 10 ml de SAF, se agitó ligeramente la cavidad peritoneal y se retiró el mayor volumen posible, esta operación se repitió 3

veces más (la cantidad de granulocitos obtenidos fluctúa entre los $10-12 \times 10^6$ y para los macrófagos entre $6-8 \times 10^6$).

Los macrófagos residentes fueron obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones no tratados, utilizando el mismo procedimiento para retirar a las células ya descrito para los granulocitos y los macrófagos "inflamatorios". Con la finalidad de homogenizar a las poblaciones obtenidas, las células retiradas tanto de los ratones tratados como de los no tratados fueron colocadas en cajas de petri de 5 ml en presencia de DMEM al 10% en suero de caballo e incubadas a 37°C por 1 hora. Transcurrido este tiempo las células adherentes fueron utilizadas como macrófagos y las flotantes, en el caso de los ratones inyectados por 16 hrs, como granulocitos.

Mediante tinción con Giemsa, los cultivos de macrófagos fueron 97% puros con 3% de granulocitos contaminantes y los cultivos de granulocitos 95% puros con un 5% de macrófagos.

Obtención de medio condicionado.

Con la finalidad de obtener CSFs provenientes de fibroblastos, células epiteliales, macrófagos residentes e inflamatorios de la cavidad peritoneal, los sobrenadantes de los cultivos en el segundo pasaje, para el caso de los fibroblastos y de las células epiteliales fueron retirados a los 7 días de cultivo después de haberse cultivado durante este periodo de tiempo 1.5×10^5 y 2.5×10^5 fibroblastos y células epiteliales respectivamente.

Para el caso de las células monocíticas, los sobrenadantes fueron retirados después de cultivar 4×10^6 macrófagos residentes o "inflamatorios" en presencia o ausencia de 10 microgramos de lipopolisacáridos de *Salmonella typhimurium* (Difco, Detroit, MI).

En el caso de la línea de tipo macrofágico WR19M. l una vez de haberse sembrado 5×10^5 , los sobrenadantes se retiraron al cuarto día de cultivo.

En todos los casos, los medios condicionados (MC) así obtenidos fueron congelados a -20 ° C hasta su utilización.

Ensayo de formación de colonias.

Los medios condicionados producidos durante el cultivo de las diferentes estirpes celulares empleadas en este trabajo (macrófagos residentes e inducidos y células epiteliales y fibroblásticas) fueron evaluados en cuanto a su capacidad de inducir la formación de colonias en células de médula ósea.

Para ello, fue utilizada la técnica de doble capa en agar (*Pluznik-Sachs, 1965*), la cual consistió en colocar en una caja de petri de 60 x 35 mm de diámetro dos capas de agar: la primera al 0.6% la que contiene el MC a ser evaluado y la segunda al 0.3% que contiene a las células de médula ósea (aproximadamente 5×10^5 células por caja). Se incuban los cultivos por espacio de 7 días, posteriormente se evalúan los cultivos con la ayuda de un microscopio invertido. Todas las agrupaciones celulares mayores o iguales a 20 células fueron consideradas como colonias.

Determinación de la morfología de las colonias.

La evaluación de la morfología celular de las colonias inducidas por los diferentes MC empleados en este estudio, fueron realizadas por una modificación de la técnica de transferencia del agar a portaobjetos (*Jazbieh y cols, 1986*). Para ello, la capa superior de agar es cortada en secciones de aproximadamente 2.5 X 1 cm y sobre éstas es sobrepuesta una hoja de papel filtro Whatman del No 2 (Whatman Incorporated, Clifton, NJ).

Tan pronto como el agar conteniendo las colonias se adhiere al papel filtro es retirado

y transferido a un portaobjetos. Se deja secar durante 30 a 45 min después el papel filtro es separado del agar cuidadosamente. Se tiñen las colonias embebidas en el agar, fijándolas previamente con etanol por 3 minutos, con Giemsa al 10% por espacio de 10 a 15 min.

El criterio utilizado para asignar morfología celular fue el siguiente: cuando las colonias contenían células pequeñas con núcleo delgado en forma de anillo fueron consideradas como granulocitos en banda, cuando el núcleo fue segmentado como granulocitos maduros y cuando las colonias fueron grandes en tamaño y vacuoladas fueron registradas como macrófagos. Las colonias con células inmaduras fueron registradas como blásticas.

Ensayo de proliferación celular.

Para los ensayos de proliferación celular de los cultivos de fibroblastos y células epiteliales se utilizaron dos técnicas diferentes. La primera consistió en sembrar 1.5×10^5 fibroblastos en presencia de 3 ng/ml de IL-1, 4 ng/ml de M-CSF y 400 ng/ml de G-CSF por 7 días. Posteriormente, esta estirpe celular fue disgregada enzimáticamente con tripsina (Sigma) al 0.1% en SAF. Después, la enzima fue desactivada agregando 0.5 ml de SFB y lavadas 3 veces con SAF a 70 g por 5 min. Finalizada esta operación se desechó el sobrenadante y los fibroblastos así obtenidos fueron resuspendidos en un volumen de 2 ml de DMEM y evaluado su número celular mediante un hemocitómetro y utilizando un microscopio compuesto.

En la segunda técnica, se utilizó la incorporación de timidina tritiada como un índice de la síntesis de DNA (Baserga, 1990). Para ello, se sembraron 2.5×10^3 células de tipo fibroblástico y 7.5×10^3 células epiteliales en placas de 96 pozos (Nunc), en DMEM al 10% en SFB durante 6 días. Posteriormente, se desechó el sobrenadante de las placas de 96 pozos y se hicieron 3 lavados con DMEM para eliminar las trazas de SFB. Se

adicionaron los CSFs a una concentración de 100 ng para el factor M-CSF, 100 ng para GM-CSF, 100 ng para IL-3 y 250 ng para G-CSF.

Las placas fueron incubadas por 16 horas, tiempo después del cual se adicionaron 100 microlitros (μ l) de timidina tritiada (Dupont, USA) a una concentración de un microcurie/ml (actividad específica de 15 Ci/ mmol) y se incubó nuevamente pero ahora por 8 horas. Transcurrido este tiempo se procesó cada placa por separado en un cosechador MH-12 (Beckman Instruments de México), utilizando papel para cosechadora Brandel con centellador absorbido (Beckman). Después de realizada la cosecha se transfirió el papel a líquido de centelleo Brandel y se procedió a su lectura en contador de centelleo (Beckman).

Determinación de desmogleína.

La técnica de la determinación de desmogleína fue utilizada para corroborar el origen de las estirpes celulares empleadas (Mueller-Frank, 1983). Para ello, se obtuvieron desmosomas de hocico de bovino y los anticuerpos anti-desmogleína se obtuvieron de conejos inmunizados con desmogleína (Laemmli, 1970).

Por otra parte, tanto las estirpes celulares con morfología fibroblástica como epitelial se dejaron proliferar en portaobjetos hasta saturación. Posteriormente, fueron fijadas con metanol y permeabilizadas con acetona a -20° C por 5 minutos e incubadas con anticuerpos anti-desmogleína de conejo por 30 minutos. Después con IgG-isotiocianato fluoresceínada anti-conejo de carnero (FITC). Las células fueron lavadas exhaustivamente entre cada incubación con solución amortiguadora Tris (SAT) conteniendo 1% (p/v) de albúmina de suero de bovino. Las células fueron montadas finalmente en SAT conteniendo 90% (p/v) de glicerol y 1 mg/ml de parafernildiamina.

Únicamente los cultivos que por examen visual tuvieron morfología epitelial y que

fueron positivas para desmogleína se utilizaron como células epiteliales y aquéllos con morfología fibroblástica y negativos para desmogleína como fibroblastos.

Purificación de la molécula de 45 Kd del MC de la WR19M.1.

Tres mililitros del MC de la WR19M.1 (MC-WR19M.1) fueron pasados en una columna de 80 X 2.5 cm de diámetro que contenía sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals; Uppsala, Suecia). Como eluyente se utilizó SAF (pH 7.2) a 4 °C a un intervalo de flujo de 15 ml/hr obteniéndose 50 fracciones de 4.7 ml cada una.

Se usó azul dextran para determinar el volumen de exclusión, mientras que la transferrina, la ovoalbúmina, media hemoglobina y el citocromo C como proteínas de referencia. El perfil de elución de las proteínas fue siempre leído a 280 nm.

RESULTADOS

RESULTADOS

La línea celular de tipo macrófago WR19M.1 produce un inductor con actividad estimuladora de colonias de granulocitos.

Con la finalidad de estudiar si células del linaje monocito-macrófago producen factores humorales con capacidad de estimular la producción y la diferenciación de granulocitos-neutrófilos, se analizó primero si el medio condicionado de la línea transformada de tipo macrófago WR19M.1 (MC-WR19M.1) estimulaba la formación de colonias de granulocitos en cultivos de células de médula ósea de ratón.

El MC-WR19M.1 fue utilizado al 10% para los ensayos de formación de colonias. Como controles positivos se utilizaron en el mismo porcentaje los MC de fibroblastos y de células epiteliales (MCF y MCE respectivamente) y como control negativo un cultivo al cual no se le adicionó MC (Tabla 1.).

Tabla 1. Número y porcentaje de colonias con diferente morfología.

NUMERO DE COLONIAS (Porcentaje)					
Inductores	Granulocitos		Macrófagos	Blastos	Total
	Bandas	Segmentados			
—	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
MC-WR19M.1	45(18)	190(76)	15(6)	0(0)	250(100)
MCE	45(9)	185(37)	225(45)	45(9)	500(100)
MCF	3(1)	26(9)	260(90)	0(0)	289(100)

Las células de médula ósea fueron cultivadas en agar por 7 días en presencia del medio condicionado de la línea de tipo macrófago WR19M.1 y de los medios condicionados por fibroblastos y células epiteliales. El término banda se refiere a células con núcleo en forma de anillo; el de segmentado a células con núcleo segmentado. (-), indica control sin inductor.

Los resultados obtenidos muestran que el MC-WR19M.1 tiene la capacidad de inducir preferentemente la formación de colonias de granulocitos (235 colonias, lo que representa el 94% del total) además, de estimular la proliferación de colonias de macrófagos aunque en menor cantidad (sólo el 6% del total de colonias formadas). Como puede observarse en la Tabla 1, los MC usados como controles positivos para colonias de granulocitos-macrófagos y para macrófagos (MCE y MCF respectivamente), estimularon esencialmente esos tipos celulares.

La línea celular de tipo macrófágico WR19M.1 produce un factor de 45 Kd con actividad tipo G-CSF.

Una vez que se demostró que la línea de tipo macrófágico WR19M.1 produce un inductor con actividad formadora de colonias de granulocitos, se analizó el peso molecular de este inductor. Para ello, 2 ml del MC-WR19M.1 fueron colocados en una columna para cromatografía que contenía sephadex G-100 para ser separados molecularmente, se obtuvieron 100 fracciones de 4.5 ml cada una (Fig 1.).

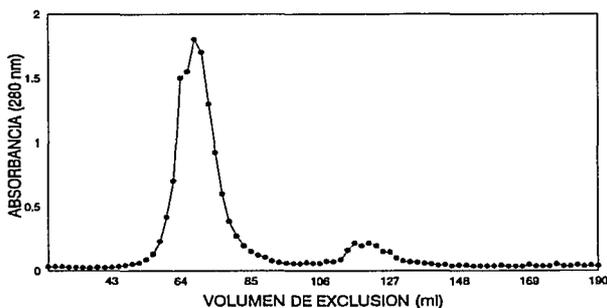


Figura 1. Absorbancia y volumen de exclusión del medio condicionado de la línea WR19M.1.

Las fracciones fueron utilizadas al 10% en los ensayos biológicos, evaluándose su capacidad de formar colonias en cultivos de células de médula ósea y se encontró que el inductor tenía un peso molecular de aproximadamente 45 Kd (Fig 2.). Al realizar el análisis morfológico de las colonias inducidas por la fracción de 45 Kd en cultivos de células de médula ósea, encontramos que indujo sólo colonias de granulocitos (Tabla 2). Como la fracción de 45 Kd tuvo el mismo efecto biológico que el rhG-CSF (conocido inductor de la diferenciación de granulocitos), el que se utilizó como control positivo, sospechamos que esta fracción contiene probablemente una actividad tipo G-CSF. En este ensayo se utilizaron como recombinantes control rhIL-1 e rhIL-2, los cuales no tienen efecto conocido en la proliferación de granulocitos, y como control negativo cultivos de médula ósea sin ningún inductor.

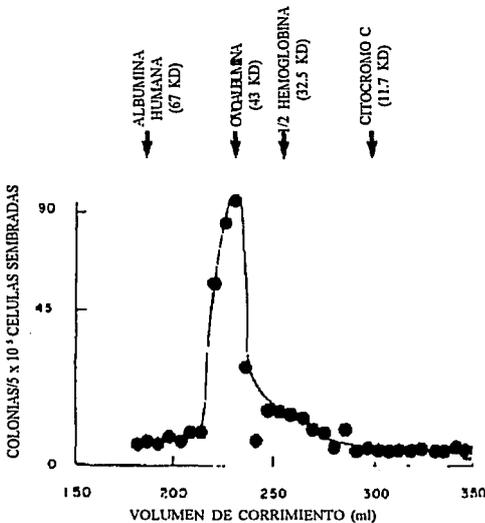


Figura 1. Perfil de la cromatografía del MC-WR19M.1 y ensayo de actividad biológica de las fracciones obtenidas en células de médula ósea. En la parte superior, se indican las proteínas de referencia utilizadas.

Tabla 2. Número y porcentaje de colonias con diferente morfología.

Inductores	NUMERO DE COLONIAS (Porcentaje)				
	Granulocitos		Macrófagos	Blastos	Total
	Bandas	Segmentados			
—	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
rhIL-2	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
rhIL-1	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
rhG-CSF	15(3)	428(83)	72(14)	0(0)	515(100)
Fracción 45-KD	0(0)	14(100)	0(0)	0(0)	14(100)

Las células de médula ósea fueron cultivadas en agar por 7 días en presencia de la fracción de 45 Kd y del rhG-CSF; como recombinaantes control se utilizó rhIL-2 e rhIL-1. El término banda se refiere a células con núcleo en forma de anillo; el de segmentado a células con núcleo segmentado. (-), indica control sin inductor.

La fracción de 45 Kd y el rhG-CSF estimulan de manera similar la fagocitosis y la diferenciación morfológica en granulocitos "inflamatorios" y de médula ósea.

Debido a que el MC-WR19M.1 contenía un inductor con actividad tipo G-CSF con un peso molecular de 45 Kd y que ésta molécula tiene propiedades de diferenciación en granulocitos, decidimos estudiar si este inductor poseía efectos de activación de funciones efectoras de granulocitos maduros; como la fagocitosis de partículas de latex, así como la de inducir diferenciación de granulocitos de médula ósea.

Con este propósito, se utilizó la fracción de 45 Kd al 10% y se evaluó su capacidad de estimular la diferenciación de la morfología de los granulocitos de médula ósea, así como de su capacidad de incremento de la fagocitosis en esta población y en granulocitos "inflamatorios" de la cavidad peritoneal. Se encontró que esta fracción con actividad tipo

G-CSF fue un fuerte inductor de ambas propiedades diferenciadoras, sin embargo, no fue la única fracción que tuvo capacidad de activación y de diferenciación, ya que se detectó otra de un peso molecular de aproximadamente de 17 Kd (Fig 3.).

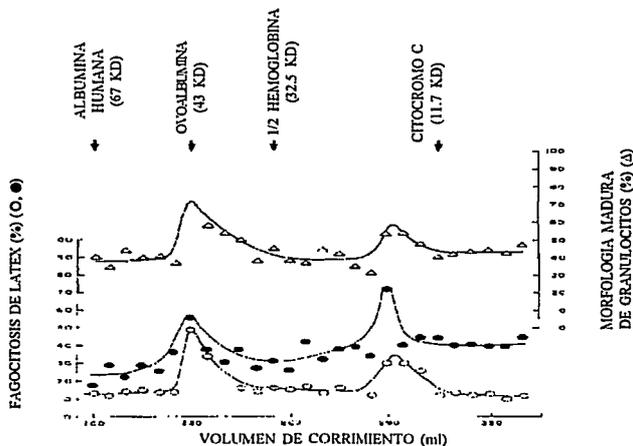


Figura 3. Perfil de la cromatografía del MC-WR19M.1 y ensayo de actividad biológica de las fracciones obtenidas en cuanto a su capacidad de inducir diferenciación morfológica en granulocitos medulares (Δ) y de incrementar la ingesta de partículas de latex en granulocitos inflamatorios de la cavidad peritoneal y de médula ósea (\circ) (\bullet). En la parte superior, se indican las proteínas de referencia utilizadas.

Asimismo, se evaluó si el rhG-CSF tenía la capacidad de inducir las propiedades de activación y de diferenciación ya citadas en granulocitos obtenidos de médula ósea; encontrándose que el rhG-CSF fue un importante agente inductor de ambas propiedades de manera similar a las observadas con la fracción de 45 Kd (Tabla 3). Como controles positivos se emplearon MCF y MCE los cuales estimulan principalmente la formación y maduración de colonias de macrófagos y de granulocitos-macrófagos respectivamente. Como controles negativos se utilizaron cultivos de granulocitos sin inductor.

Tabla 3. Morfología y porcentaje de granulocitos de médula ósea (MO) que fagocitaron partículas de latex y morfología de los cultivos de MO después de 4 días de cultivo.

Inductores	Porcentaje de fagocitosis de granulocitos de MO	PORCENTAJE DE MORFOLOGÍA				
		Granulocitos		Macrófagos	Blastos	Total
		Bandas	Segmentados			
—	7	53	14	25	8	100
MCE	31	16	65	11	8	100
MCF	19	7	61	19	13	100
MC-WR19M.1	20	15	62	18	5	100
rhG-CSF	24	10	67	12	11	100

Los granulocitos de MO fueron cultivados durante 7 días en presencia de diferentes MC y del rhG-CSF. El término banda se refiere a células con núcleo en forma de anillo; el de segmentado a células con núcleo segmentado. (-), control sin inductor.

Actividad mitogénica de la fracción cromatográfica de 45 Kd y del rhG-CSF sobre fibroblastos normales de pulmón.

Teniendo en consideración que los fibroblastos producen M-CSF (factor de crecimiento de macrófagos) y de que como consecuencia de este estímulo los macrófagos producen un CSF de 45 kd (Zambrano y cols, 1989 a; Zambrano y cols, 1989 b), el cual hemos demostrado en la primera parte de este trabajo que es de tipo G-CSF, además de que recientemente se ha demostrado la presencia de receptores para CSFs en células tumorales y que es conocido que los macrófagos producen factores de crecimiento para fibroblastos (Nathan, 1987); quisimos estudiar si el MC-WR19M.1, la fracción de 45 Kd y el rhG-CSF tenían efectos mitogénicos sobre fibroblastos, ya que ello evidenciaría la existencia de un mecanismo interdependiente entre los fibroblastos y los macrófagos para la producción de granulocitos-neutrófilos.

Con este fin, utilizamos 1×10^5 fibroblastos de pulmón en presencia del MC-WR19M.1 al 10%, como control positivo utilizamos rhIL-1, un potente mitógeno para fibroblastos, y rhIL-2 como recombinante control ya que no posee efectos de proliferación en fibroblastos. Los resultados obtenidos muestran que el MC-WR19M.1 es un mitógeno notable para estas células inclusive más aún que la rhIL-1 (segunda columna, Tabla 4). Por otro lado, al utilizar las fracciones obtenidas de la cromatografía del MC-WR19M.1 al 10% para determinar la existencia de algún mitógeno para fibroblastos, encontramos que únicamente la fracción de 45 Kd estimuló la proliferación de este tipo celular (Fig 4.).

Tabla 4. Inducción de la proliferación de fibroblastos de pulmón.

Inductor	Número de fibroblastos ($\times 10^5$)	
	Baja densidad	Alta densidad
—	7.2 \pm 0.1	8.8 \pm 0.5
MCWR19	21.7 \pm 0.1	11.6 \pm 0.8
Fracción de 45 kd	11.4 \pm 0.07	ND
rhG-CSF	21.3 \pm 0.1	12.8 \pm 0.5
rhIL-1	10.4 \pm 0.9	11.6 \pm 0.7
rhIL-2	4.8 \pm 0.3	8.4 \pm 0.2

Los cultivos a baja densidad (1×10^5 fibroblastos) fueron mantenidos por 7 días y los cultivos a alta densidad (8×10^5 fibroblastos) por 5 días. ND, no realizado.

Por otro lado, para determinar si el G-CSF es un factor de crecimiento para fibroblastos, se empleó rhG-CSF; como puede observarse en la segunda columna de la Tabla 4, esta molécula también es un fuerte inductor de la proliferación de los fibroblastos.

Asimismo, se decidió estudiar si el MC-WR19M.1 y el rhG-CSF podían estimular la proliferación de fibroblastos mantenidos confluentes (8×10^5). Como control positivo se utilizó nuevamente rhIL-1 y la rhIL-2 como recombinante control. Los resultados

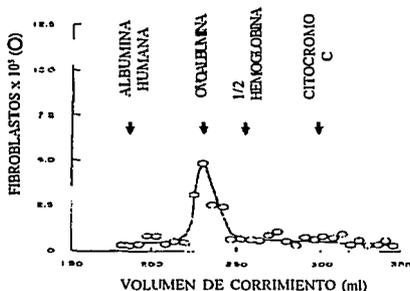


Figura4. Perfil de la cromatografía del MC-WR19M.1 y ensayo de actividad biológica de las fracciones obtenidas en fibroblastos de pulmón. En la parte superior, se indican las proteínas de referencia utilizadas.

obtenidos muestran que ambos inductores estimularon la proliferación de fibroblastos, siendo mayor la provocada por el rhG-CSF y similares las inducidas por el MC-WR19M.1 y por la rhIL-1 (tercera columna, Tabla 4.).

Efectos similares del MC-WR19M.1 y del rhG-CSF en la incorporación de timidina tritiada por fibroblastos de pulmón.

Para comprobar los efectos observados con el sobrenadante de la línea WR19M.1 y con la molécula rhG-CSF sobre la proliferación de los fibroblastos de pulmón ya descritos por conteo celular, decidimos evaluar si el efecto proliferativo podía ser determinado utilizando una técnica más sensible. Se empleó la técnica de incorporación de timidina tritiada como un índice de división celular (*Baserga*, 1990), utilizando los MC de las líneas WR19M.1, como fuente de actividad tipo G-CSF, de la línea HTB-9 que es conocido produce constitutivamente G-CSF (*Burgess*, 1988) a diferentes porcentajes (25, 50 y 100%). Además, del MC de macrófagos residentes normales estimulados con LPS (MacR⁺), debido a que es conocido que los macrófagos producen factores de crecimiento

para fibroblastos cuando son activados con endotoxinas (Nathan, 1987), como control positivo se utilizó PDGF (Platelet Derived Growth Factor) conocido mitógeno de células de tejido conectivo y como control negativo cultivos de fibroblastos sin inductor. Los resultados obtenidos confirman de manera general que el MC-WR19M.1 contiene un inductor con actividad mitógena para fibroblastos, ya que hubo un incremento en la incorporación de timidina tritiada por parte de los fibroblastos cuando se empleó al 25% el MC-WR19M.1 (Fig 5.). Asimismo, de que el G-CSF producido por la línea HTB9 también tiene un comportamiento muy parecido (Fig 5.).

En lo que se refiere al Mac-R⁺, también tuvo efecto en la incorporación de timidina tritiada, siendo más evidente cuando se utilizó el MC al 25%. El PDGF fue un buen control inductor de la proliferación de fibroblastos (Fig 5.).

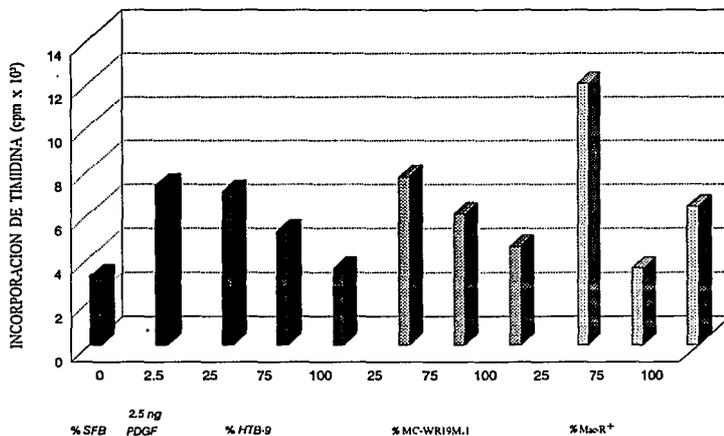


Figura 5. Efecto de diferentes inductores sobre la incorporación de timidina ³H en fibroblastos normales. Fibroblastos (2.5 x 10⁵) fueron mantenidos 4 días en cultivo, después se agregaron los inductores por 16 horas y posteriormente la timidina ³H por 8 horas.

Diferentes efectos mitogénicos de los CSF: IL-3 y M-CSF sobre fibroblastos de pulmón.

Dado que las evidencias experimentales obtenidas en este trabajo demuestran que G-CSF es un factor de crecimiento de fibroblastos, decidimos estudiar la capacidad de otros CSF en provocar la incorporación de timidina en este tipo celular. Para ello, se sembraron 2.5×10^3 fibroblastos en presencia de 100 ng de rhIL-3, 50 ng de rhM-CSF y 250 ng rhCSF. Como control positivo se utilizó 2.5 ng de rhPDGF, rhIL-2 como recombinante control y como control negativo cultivos a los que no se les agregó recombinante alguno.

Los resultados obtenidos muestran, que la rh IL-3 y el rhM-CSF tienen un efecto importante en la incorporación de timidina tritiada, siendo mayor la provocada por la rhIL-3 (Fig 6.). Estos resultados indican que los fibroblastos proliferan en respuesta a varios tipos de CSFs, evidenciando además la posible existencia de un mecanismo cooperador a nivel humoral entre los fibroblastos y los CSFs.

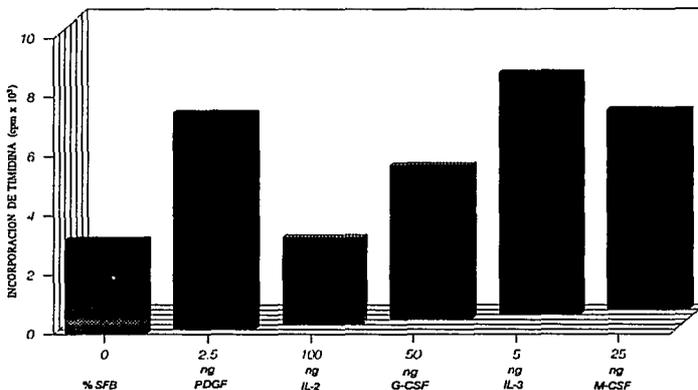


Figura 6. Efecto de diferentes inductores sobre la incorporación de timidina ^3H en fibroblastos normales. Fibroblastos (2.5×10^3) fueron mantenidos durante 4 días en cultivo, después se agregaron los inductores por 16 horas y posteriormente timidina ^3H por 8 horas.

Los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal y no los "inflamatorios" tienen la capacidad de producir un inductor con actividad tipo G-CSF y de estimular la proliferación de fibroblastos.

Una vez que determinamos que una línea celular de tipo macrofágico produce un inductor de la formación de colonias de granulocitos y proliferador de fibroblastos, se procedió a estudiar si las células normales del linaje monocito-macrófago activadas o sin activar poseen esta misma capacidad. Para ello, se sembraron 4×10^6 macrófagos residentes e "inflamatorios" en presencia o ausencia de LPS, con la finalidad de determinar si en condiciones normales o de activación los macrófagos producían un inductor de la proliferación y diferenciación de granulocitos y/o proliferador de fibroblastos.

Los resultados muestran que sólo los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos residentes estimulados con LPS (Mac-R⁺) tuvieron la capacidad de inducir la formación de colonias de granulocitos y en menor proporción colonias de macrófagos, y similares en composición a las inducidas por el rhG-CSF (Tabla 5.). Los MC de macrófagos residentes sin LPS y los "inflamatorios" con LPS (Mac-R y Mac-I⁺ respectivamente), no indujeron la formación de colonias de granulocitos. En este experimento se utilizó LPS para descartar su contribución en la diferenciación hematopoyética, rhIL-1 y rhIL-2 como recombinantes control ya que no poseen efectos sobre la diferenciación de la morfología en granulocitos y rhM-CSF como control positivo de colonias de macrófagos.

Por otro lado, cuando se evaluó la capacidad del Mac-R, el Mac-I⁺ y el Mac-R⁺, sobre su capacidad de estimular la proliferación de fibroblastos normales, el Mac-R⁺ estimuló en mayor cantidad la proliferación de fibroblastos tanto a baja como a alta densidad (Tabla 6) y de incorporación de timidina triada (Fig 5).

Tabla 5. Efecto de los medios condicionados de macrófagos residentes e inflamatorios sobre la diferenciación morfológica en células de médula ósea.

Inductores	Número de Colonias (Porcentaje)				
	Granulocitos		Macrófagos	Blastos	Total
	Bandas	Segmentados			
—	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
rhIL-2	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
rhIL-1	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
LPS	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Mac-R	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Mac-I ⁺	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Mac-R ⁺	103(16)	361(56)	142(22)	39(6)	645(100)
rhG-CSF	69(11)	431(69)	87(14)	38(6)	625(100)
rhM-CSF	0(0)	0(0)	113(100)	0(0)	113(100)

Las células de médula ósea fueron cultivadas en agar por 7 días en presencia del medio condicionado de la línea de tipo macrófágico WR19M.1 y de los medios condicionados por fibroblastos y células epiteliales. El término banda se refiere a células con núcleo en forma de anillo; el de segmentado a células con núcleo segmentado. (-), indica control sin inductor.

Tabla 6. Efecto de los medios condicionados de macrófagos residentes e inflamatorios sobre la proliferación de fibroblastos.

Inductor	Número de fibroblastos ($\times 10^5$)			
	Baja	densidad	Alta	densidad
—	6.8 \pm 1.0		5.7 \pm 0.2	
Mac-I ⁺	7.6 \pm 0.3		7.2 \pm 0.3	
Mac-R ⁺	10.8 \pm 0.9		8.4 \pm 0.4	
rhG-CSF	9.5 \pm 0.4		8.8 \pm 0.3	

Cultivos a baja densidad (1×10^5 fibroblastos) fueron mantenidos por 7 días y cultivos a alta densidad (8×10^5 fibroblastos) por 5 días.

El inductor con actividad tipo G-CSF presente en el MC-WR19M.1 y en la fracción de 45 kd no inducen fagocitosis en macrófagos residentes e "inflamatorios" de la cavidad peritoneal pero sí en granulocitos.

Tomando en consideración que el inductor con actividad de diferenciación de granulocitos presente en el MC-WR19M.1 y en la fracción de 45 Kd sólo estimuló la diferenciación de la morfología de este linaje hematopoyético, quisimos evaluar si este inductor tenía algún efecto sobre la fagocitosis tanto en macrófagos como en granulocitos. Con este fin, cultivamos 4×10^6 macrófagos residentes e "inflamatorios" en presencia del MC-WR19M.1 y de la fracción de 45 Kd al 10% en los cultivos, y evaluamos la capacidad de estos inductores de estimular la fagocitosis de partículas de latex en las poblaciones ya citadas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, no hubo fagocitosis de partículas de latex ni en macrófagos residentes ni en los "inflamatorios" cuando se incubaron en presencia del MC-WR19M.1 y de la fracción de 45 Kd. Caso contrario fue el que se presentó en los granulocitos, en la que ambos inductores sí estimularon la fagocitosis de partículas de latex, un efecto parecido se observó con el rhG-CSF empleado (Tabla 7). En estos experimentos se emplearon como controles MCF y MCE como diferenciadores de macrófagos y macrófagos-granulocitos respectivamente. Además, de LPS como control positivo ya que es conocido que en su presencia se estimula la capacidad de fagocitosis en los macrófagos. Asimismo, como negativo un cultivo al cual no se le adicionó inductor.

Tabla 7. Efecto de la fracción de 45-KD, del MC-WR19M.1 y del rhG-CSF sobre el incremento de fagocitosis de partículas de latex en macrófagos residentes, inflamatorios y en granulocitos.

Tipo celular	Fagocitosis (Porcentaje)						
	—	rhG-CSF	MC-WR19M.1	Fracción de 45 kd	MCE	MCF	LPS
MacR	21	16	17	19	20	23	30
MacI	15	12	10	12	13	12	27
Granulocitos	13	24	25	24	15	15	18

Porcentaje de fagocitosis de latex por macrófagos residentes (Mac-R) e inflamatorios (Mac-I) de la cavidad peritoneal, y en granulocitos de médula ósea después de 2 días de cultivo en presencia de diferentes inductores.

DISCUSSION

DISCUSION

Los trabajos realizados por Sachs y Metcalf en la década de los 60 pusieron en evidencia que la proliferación y la diferenciación mielóide es regulada por la acción de los factores humorales (agrupados en la familia de los modificadores biológicos conocidos como HGF), denominados MGIs o CSFs. Con el paso de los años se han encontrado muchas de las propiedades biológicas y bioquímicas de los CSFs, además, con el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética y de clonación molecular se ha podido obtener con elevada pureza a estos factores pudiéndose corroborar la gran mayoría de los efectos biológicos descritos inicialmente por estos investigadores. Sin embargo, un aspecto que aún no ha quedado bien esclarecido es el relacionado con las fuentes celulares encargadas de la producción fisiológica de los CSFs en condiciones normales.

A este respecto, es bien conocido que existen diferentes fuentes de CSFs en el organismo dentro de las que se incluyen fluidos como el suero y la orina, órganos como el pulmón y la placenta y estirpes celulares como los macrófagos, los fibroblastos y las células endoteliales principalmente (Clark-Kamen, 1987). No obstante, la amplitud de las fuentes productoras de los CSFs en el organismo, aún no se ha esclarecido si la producción de los CSFs ocurre de manera normal o es consecuencia de la respuesta del cuerpo a situaciones de reto inmunológico, infección o stress. Existen dos escuelas del pensamiento que tratan de explicar el mecanismo biológico que desencadena la producción de los CSFs: la escuela australiana postula que esta producción ocurre cuando el organismo es sujeto de infecciones por agentes patógenos y que células inmunocompetentes como el macrófago y el linfocito T son el principal aporte de los CSFs, los cuales se encargarían tanto de la producción de nuevas células efectoras, como de su activación para eliminar al agente patógeno (Allen-Dexter, 1990; Miyajima y cols, 1992; Metcalf, 1992).

Por otro lado, la otra escuela (Weiss y cols) propone, dado que se encuentran CSFs en

el suero y la orina de personas sanas, que la producción de estos inductores es controlada por un mecanismo celular endógeno o constitutivo, en el cual participan las células que se encuentran en proliferación activa en el organismo (*Zambrano y cols*, 1990 a; *Zambrano y cols*, 1990 b). De acuerdo a sus primeros trabajos en los que indicaron que los fibroblastos y las células epiteliales, en condiciones de proliferación activa, son la principal fuente de M-CSF y de GM-CSF respectivamente, y de que posteriormente fue descrito que los linfocitos T, bajo las mismas condiciones, producen Multi-CSF o IL-3, propone que la producción de los CSFs en condiciones normales es célula-específica y dependiente del ciclo celular (*Zambrano y cols*, 1989 b). Sin embargo, en lo que se refiere a la célula o células productoras del otro CSF denominado G-CSF, aún no se tenían datos que indicaran cual era el tipo celular que participaba en su producción de esta molécula. El papel del macrófago en la regulación de la producción de los granulocitos-neutrófilos ya había sido descrita en 1987 por Rich y cols. Sin embargo, este investigador y su grupo no dieron evidencias experimentales que hicieran pensar de que se trataba de G-CSF (*Rich*, 1987; *Rich*, 1988).

En este trabajo se dan evidencias que indican que las células del linaje monocito-macrófago son la principal fuente de un inductor con capacidad de formar colonias de granulocitos-neutrófilos. El hecho de que la línea celular de macrófagos WR19M.1 y de que los macrófagos residentes normales de la cavidad peritoneal secreten esta molécula demuestra que las células del linaje monocito-macrófago tienen un papel importante en la génesis de estas células fagocíticas. De acuerdo a Miyajima los fagocitos mononucleares se encargan de la producción constitutiva de los CSFs en el organismo y los linfocitos T de la adaptativa (*Miyajima y cols*, 1992), en este contexto los resultados obtenidos sugieren que la producción intrínseca de los CSFs por parte de los macrófagos tiene como función, entre otras muchas, la de generar a las células del linaje granulocítico.

La purificación bioquímica parcial de este inductor con actividad formadora de

colonias de granulocitos indica de que se trata de un factor con un peso molecular de 45 Kd. Este peso molecular es semejante al reportado previamente por Calcagno y cols, en una línea de macrófagos, el cual fue cuantificado por ultracentrifugación (Calcagno y cols, 1982) y a los reportados para macrófagos residentes e "inflamatorios" de ratón (Lotem y cols, 1980) y al encontrado en monocitos de sangre periférica humana (Sullivan y cols, 1985), lo que sugiere que las células del linaje monocito-macrófago producen la molécula de 45 KD de manera célula-específica.

Al evaluar la capacidad de la fracción de 45 KD de inducir diferenciación de la morfología o de activar funciones efectoras en células de médula ósea, resultó en una inducción de ambas propiedades, pero únicamente en células del linaje de los granulocitos. Es importante, mencionar que ésta última propiedad también se presentó en granulocitos "inflamatorios" de la cavidad peritoneal, lo que indica la facultad de la molécula o moléculas presentes en la fracción de 45 KD de estimular la proliferación, la maduración y la activación de los granulocitos-neutrófilos. Como los resultados aquí presentados son similares a los encontrados con el rhG-CSF, pensamos que apoyan de manera significativa que el factor o factores presentes en la fracción cromatográfica de 45 Kd sea en realidad un modificador biológico de la familia de los CSF; debido principalmente a que estas moléculas se distinguen por estimular la proliferación y diferenciación de células progenitoras mieloides así como de favorecer sus funciones de activación y efectoras en células maduras, como las que provoca el inductor de 45 KD en los progenitores de los granulocitos y sobre los granulocitos "inflamatorios" de la cavidad peritoneal.

Además, resulta importante mencionar que la capacidad de proliferación y de diferenciación del inductor con actividad tipo-G-CSF sobre los granulocitos no se manifiestan en otros tipos mieloides, esto se demuestra por la incapacidad del inductor de 45 Kd de estimular la diferenciación de otros linajes hematopoyéticos en los cultivos

en agar (Tabla 2.), así como de fallar en la inducción de la fagocitosis de partículas de latex en los macrófagos residentes y en los "inflamatorios" de la cavidad peritoneal (Tabla 7.). Esta especificidad biológica del inductor de 45 Kd sobre la proliferación, diferenciación y activación en los granulocitos es compatible con la reportada para el factor G-CSF, ya que esta molécula es reconocida por su receptor, que en células hematopoyéticas, sólo se encuentra en los granulocitos (*Souza y cols*, 1986). Es por ello, que sería esencial estudiar en otro trabajo la expresión de receptores para G-CSF sobre granulocitos-neutrófilos inducidos por el inductor de 45 kd con actividad tipo G-CSF .

Los datos que apoyan el que la actividad tipo G-CSF con peso molecular de 45 Kd sea en realidad G-CSF, son: 1) su capacidad de inducir la proliferación, diferenciación y activación de los granulocitos tanto de médula ósea como "inflamatorios", efecto que es parecido al que provoca la molécula recombinante rhG-CSF, 2) La especificidad biológica observada por el inductor de 45 kd en los granulocitos y no en otras poblaciones de células fagocíticas como los macrófagos residentes e "inflamatorios", lo que concuerda con las propiedades biológicas reportadas para el G-CSF y 3) la capacidad del inductor de 45 kd de estimular la proliferación de los fibroblastos, la cual es compartida con la detectada en el medio condicionado de la línea HTB-9 (que es conocido produce de manera permanente G-CSF), y con la molécula recombinante G-CSF. Sin embargo, estas pruebas no son contundentes para afirmar que la actividad tipo G-CSF presente en la fracción de 45 KD sea en realidad la molécula G-CSF, ya que son indirectas, necesitando realizar ensayos con la fracción de 45 Kd en presencia de anticuerpos policlonales dirigidos contra G-CSF o por otro lado, utilizar esta fracción cromatográfica para mantener el crecimiento de alguna línea dependiente de G-CSF, lo que demostraría de manera inequívoca la presencia o ausencia del factor G-CSF. Teniendo en consideración que en este trabajo no se realizaron las pruebas anteriores para demostrar de manera fehaciente que el inductor con capacidad de estimular la proliferación, diferenciación

y activación en los granulocitos, y con la facultad de incrementar la proliferación de los fibroblastos, sea en realidad la molécula G-CSF, decidimos referirla como actividad tipo G-CSF (G-CSF-like activity).

Otro aspecto importante que se reporta en este trabajo es el relacionado con el efecto mitogénico de la actividad tipo G-CSF de 45 Kd, del medio condicionado de la línea HTB-9 y del factor rhG-CSF sobre fibroblastos de pulmón. La capacidad de estos inductores de estimular la proliferación en células que no pertenecen al linaje hematopoyético, es una propiedad biológica nueva no descrita con anterioridad para el G-CSF. Aunque recientemente se ha reportado el efecto del GM-CSF sobre la proliferación de células pequeñas de pulmón, así como del efecto de otros CSF principalmente sobre carcinomas (*Shoukat y cols*, 1988; *Berdal y cols*, 1989), los resultados aquí reportados son diferentes ya que este estudio se realizó sobre células normales de origen no epitelial. Asimismo, es conviene señalar que en este ensayo los sobrenadantes de los cultivos de las células HTB-9, WR19M.1 y Mac-R⁺ provocaron una disminución en la proliferación de los fibroblastos, cuando se utilizaron al 75% y al 100% (Fig 5). Consideramos que el comportamiento observado con estos sobrenadantes, pudo deberse a la falta de nutrientes, a la presencia de algún metabolito tóxico o a ambos, ya que hay que recordar que los sobrenadantes son retirados hasta el cuarto día de cultivo.

El hecho de que tanto el inductor de 45 kd con actividad tipo G-CSF, como del rhG-CSF fueran potentes mitógenos sobre fibroblastos de pulmón tanto a baja como a alta densidad, incluso en un rango mayor que la rhIL-1; un potente mitógeno para fibroblastos, indican la importancia que puede tener el G-CSF en regular la proliferación normal de este tipo celular. En el contexto de la producción sanguínea el que las células del linaje monocito-macrófago sean la fuente principal de una actividad estimuladora de granulocitos (actividad tipo G-CSF) y de que éste factor tenga la capacidad de estimular la proliferación de los fibroblastos, provocando que estos produzcan M-CSF, que al incidir

sobre células monocíticas las estimularía a producir *de novo* G-CSF, estaría indicando la existencia de un mecanismo regulador a nivel celular y humoral en la producción de granulocitos neutrófilos (Fig 7.).

Evidentemente, para corroborar esta hipótesis sería necesario estudiar el efecto mitógeno del G-CSF sobre fibroblastos derivados de médula ósea o bien sobre alguna línea de fibroblastos de médula ósea ya establecida. Sin embargo, los resultados aquí presentados nos hacen pensar en la posible existencia de un mecanismo regulador entre los fibroblastos y los macrófagos en la producción de los granulocitos-neutrófilos; en el que los macrófagos al secretar G-CSF estimularían la diferenciación de la morfología de los granulocitos (Fig 3 y Tabla 2), pero además el G-CSF favorecería la proliferación de los fibroblastos (Tabla 4 y Fig 6). Como consecuencia del desencadenamiento de este mecanismo, la proliferación y diferenciación de los granulocitos puede ocurrir a través de dos rutas principales interdependientes: a) en la primera, los macrófagos secretan G-CSF al medio extracelular como resultado de la proliferación de los precursores de los monocitos o por el reconocimiento de algún antígeno en bacterias. En la segunda, los macrófagos estimulan a los fibroblastos a proliferar a través de la participación del G-CSF, lo que provoca que éstos secreten M-CSF al medio, y este factor a su vez estimule a los precursores de monocitos a proliferar y producir más G-CSF (Fig 7). De acuerdo

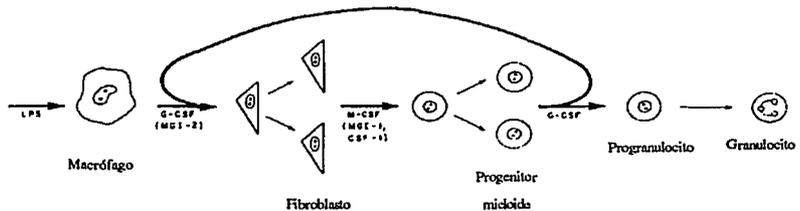


Figura 7. Mecanismo celular y humoral hipotético propuesto para el control de la producción de los granulocitos-neutrófilos.

a este mecanismo hipotético se aseguraría un suministro constante de los granulocitos en condiciones normales y/o de stress.

Por otra parte, es importante mencionar que el efecto observado sobre la incorporación de timidina provocado tanto por el MC-WR19M.1, la actividad tipo G-CSF y por el rhG-CSF, confirman los resultados primeramente descritos utilizando conteo en hemocitómetro, apoyando la validez de este método de cuantificación siempre y cuando se controlen de manera adecuada las variables para la separación de las células de la monocapa adherida a la superficie de cultivo, y la homogenización de las mismas en la toma de muestras. Evidentemente, la incorporación de timidina tiene una gran ventaja sobre el conteo en hemocitómetro, ya que es una técnica muy sensible aceptada universalmente como un indicador de división celular.

Asimismo, con el empleo de esta técnica se pudo demostrar el efecto mitógeno de otros CSFs: el M-CSF y la IL-3, lo cual nuevamente nos señala la importancia que pueden tener los CSFs en la proliferación de las células estromales. Estos resultados nos hacen pensar en que los fibroblastos realmente poseen receptores para estos factores. Desde un punto de vista biológico el que los fibroblastos tengan la capacidad de unir a uno o varios de los tipos de los CSFs aquí estudiados, estaría apoyando la hipótesis propuesta en este estudio acerca de la interrelación humoral existente entre células hematopoyéticas y estromales en el control de la producción mieloide. Por consiguiente, sería apropiado evaluar la capacidad mitogénica de los CSFs en otros tipos de celulares estromales que conforman a la médula ósea como las células epiteliales y los adipocitos. Llama la atención, sin embargo, que tanto el M-CSF como la IL-3 hayan provocado una mayor incorporación de timidina sobre los fibroblastos que la ocasionada por G-CSF (Fig 6.). En la actualidad no tenemos una explicación biológica a tal resultado, aunque se puede especular que el efecto observado sea como consecuencia de la producción por parte de los fibroblastos de otro factor mitogénico que sinergice con el M-CSF o con la IL-3 provocando un mayor

incremento en la incorporación de timidina triada.

Por último, es conveniente señalar que los resultados aquí presentados apoyan la hipótesis de que los macrófagos tienen la facultad de producir un inductor con actividad tipo G-CSF que estimula la proliferación, diferenciación y activación sólo de los granulocitos, que el rhG-CSF posee también estas propiedades y que este inductor de 45 kd y el rhG-CSF estimulan la proliferación de fibroblastos normales. Consideramos que estos resultados contribuyen al conocimiento de las células que participan en la producción de los CSFs, además de dar evidencias por primera vez que el rhG-CSF, el rhM-CSF y el rhIL-3 tienen la capacidad de ser mitógenos para células normales no-hematopoyéticas.

APENDICES

APENDICES

APENDICE I

MEDIO DE EAGLE MODIFICADO POR DULBECCO (DMEM)

Este medio se utilizó para mantener los cultivos de células de médula ósea, fibroblastos y células epiteliales, así como las líneas celulares utilizadas. Su composición química se enlista a continuación.

AMINOACIDOS	CONCENTRACION (mg/ml)
L-Arginina	84.0
L-Cistina	62.57
L-Glutamina	584.0
Glicina	30.0
L-Histidina HCL	42.0
L-Isoleucina	105.0
L-Leucina	105.0
L-Lisina HCL	146.0
L-Metionina	30.0
L-Fenilalanina	66.0
L-Serina	42.0
L-Treonina	95.0

L-Triptófano	16.0
L-Tirosina (Sal disódica)	104.6
L-Valina	94.0

VITAMINAS

D-Ca Pantotenato	4.0
Cloruro de Colina	4.0
Acido Fólico	7.2
Inositol	7.2
Nicotinamida	4.0
Piridoxal HCL	4.0
Riboflavina	0.4
Tiamina	4.0

SALES INORGANICAS

Cloruro de Calcio Anhidro	200.0
Nitrato de Hierro III Monohidratado	0.1
Cloruro de Potasio	400.0
Sulfato de Magnesio Anhidro	97.67
Cloruro de Sodio	6400.0
Fosfato Monosódico Monohidratado	125.0

OTROS COMPUESTOS

L-Glucosa	4500.0
Rojo Fenol	15.0

Mediante agitación, se diluyen en agua bidestilada 13.4 g/l del medio de Eagle en polvo, se adiciona posteriormente 3.4 g/l de bicarbonato de sodio y los antibióticos: Penicilina G 100 U/ml y Estreptomina 100 u/ml. Se afora a 1000 ml agitando hasta disolver el polvo evitando la sobrealimentación. El pH se ajusta a 6.9 y se esteriliza por filtración con bióxido de carbono, pasándolo a través de una membrana Millipore con diámetro de poro de 22 micras. Se almacena a 4 °C hasta el momento de su uso.

APENDICE II

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (SAF)

Esta solución amortiguadora se utiliza para mantener condiciones fisiológicas estables a un pH de 7.0 por periodos que no excedan las 2 horas. La capacidad de amortiguación es proporcionada por las sales de fosfato, de acuerdo a la siguiente formulación:

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

Todos los componentes se disuelven en 1000 ml de agua bidestilada, ajustándose el pH entre un valor aproximado de 7.2-7.4 con HCL 8N. La solución es esterilizada con membranas Millipore con diámetro de 0.22 micras. Se almacena a la solución amortiguadora a 4 ° C hasta su uso.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- **Abramson S, Miller RG and Phillips RA (1977).** The identification in adult of bone marrow of pluripotential and restricted cells of the myeloid and lymphoid systems. *J Exp Med* 145:1567.
- 2.- **Aggarwal BB and Gutterman JU (1992).** Human cytokines: Handbook for basic and clinical research. Boston: Blackwell Scientific Publication; p-441.
- 3.- **Alberico TA, Ihle JN, Liang C-M, McGrath HE and Quesenberry PJ (1987).** Stromal growth factor production in irradiated lectin exposed long term murine bone marrow cultures. *Blood* 69:827.
- 4.- **Allen TD (1987).** Time lapse video microscopy using an animation control unit. *J Microsc* 147:129.
- 5.- **Allen TD and Dexter TM (1990).** Marrow Biology and Stem Cells. In: Colony stimulating Factors, Immunology series 49. Dexter TM, Garland JM and Testa NG, eds. New York: Marcel Dekker, Inc, p-475.
- 6.- **Allen TD and Dexter TM (1984).** The essential cells to the haemopoietic microenvironment. *Exp Hematol* 12:517.
- 7.- **Allen TD, Simmons PJ, Dexter TM, Hirsch S and Gordon S (1983).** Stromal cell types in long-term marrow cultures. *Exp Hematol* 11 (suppl 14):127.

8.- Arai K, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N and Yokota T (1990). Cytokines: Coordinators of immune and inflammatory responses. Annu Rev Biochem 59:783.

9.- Balkwill FR and Burke F (1989). The cytokine network. Immunol Today 10:299.

10.- Baserga R (1990). Measuring parameters of growth. In: Baserga R, ed. Cell growth and division: A practical approach. Oxford: IRL Press; 1-16.

11.- Bazan JF (1990). Haemopoietic receptors and helical cytokines. Immunol Today 11:350.

12.- Becker AJ, McCulloch EA and Till JE (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. Nature 197:452.

13.- Becker AJ, McCulloch EA, Siminovitch L and Till JE (1965). The effect of differing demands for blood cell production on DNA-synthesis by hemopoietic colony-forming cells of mice. Blood 26:296.

14.- Becker RP and DeBruyn PH (1976). The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation, a scanning electron microscopic investigation. Am J Anat 145:183.

15.- Berdel WE, Danhauser-Riedl S, Steinhauser G and Winton EF (1989). Various human hematopoietic growth factors (interleukin-3, GM-CSF, G-CSF) stimulate clonal

growth of nonhematopoietic tumor cells. *Blood* 73:80.

16.- Bentley SA (1981). A close range cell-cell interaction required for stem cell maintenance in continuous bone marrow culture. *Exp Hematol* 9:303.

17.- Bentley SA and Foidart JM (1980). Some properties of marrow derived adherent cells in tissue culture. *Blood* 56:1006.

18.- Berdel WE, Danhauser-Riedl S, Steinhäuser G and Winton EF (1989). Various human hematopoietic growth factors (interleukin-3 GM-CSF, G-CSF) stimulate clonal growth of nonhematopoietic tumor cells. *Blood* 73:80

19.- Bradley TR and Hodgson GS (1979). Detection of primitive macrophage progenitor cells in mouse bone marrow. *Blood* 54:1446.

20.- Bradley TR and Metcalf D (1966). The growth of mouse bone-marrow cells *in vitro*. *Aust J Exp Biol Med Sci* 44:553.

21.- Brown G, Jones NA, Bunce CM, Lord JM, Owen PJ and Patton WN (1991). Haemopoiesis: A lottery or genomic determinis?. *Brit J Hematol* 79:527.

22.- Burgess AW (1988). The biology of colony stimulating factors. *Can Res* 23:1848.

23.- Calcagno M, Pérez JR, Waldo MG, Cabrera G and Weiss-Steider B (1982). Evidence of the existence of a factor that induces Fc receptors on bone marrow cells. *Blood* 59:756.

24.- Carnot P and Deflandre C (1906). Sur l'activité hemopoïétique des différents organes au cours de la régénération du sang. *CR Acad Sci Paris* 143:432.

25.- Chamberlain JK, Leblond PF and Weed RI (1975). Reduction of adventitial cell cover: an early direct effect of erythropoiesis on bone marrow ultrastructure. *Blood Cells* 1:665.

26.- Christensen RD (1989). Hematopoiesis in the fetus and neonate. *Pediatric Res* 26:531.

27.- Clark SC and Kamen R (1987). The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 236:1229.

28.- Cosman D, Lyman SD, Ikzerda RL, Beckmann MP, Park LS, Goodwin RG and March C (1990). A new cytokine receptor superfamily. *TIBS* 15:265.

29.- Coulombel L, Eaves AC and Eaves CJ (1983). Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive hemopoietic progenitors in the adherent layer. *Blood* 62:291.

30.- Cronkite EP and Carsten AL (1980). Diffusion chamber culture. In: Cronkite EP, Carsten AL, eds. Hemopoiesis, Cloning of Tumors, Cytogenetic and Carcinogenic Assays. Nueva York: Springer-Verlag Berlin, Heidelberg; 12-32.

31.- Curry JL and Trentin JJ (1967). Hemopoietic spleen colony studies. I. Growth and

differentiation. *Develop Biol* 15:395.

32.- Dean RT and Jessup W (1986). Mononuclear phagocytes: Physiology and pathology. New York: Elsevier, Amsterdam ; p-345.

33.- Dexter TM and Lajtha LG (1974). Proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*. *Brit J Haematol* 28:525.

34.- Dexter TM and Moore MAS (1977). *In vitro* duplication and "cure" of hemopoietic defects in genetically anaemic mice. *Nature* 269:412.

35.- Dexter TM (1979). Cell interactions *in vitro*. In: Clinical haematology. Lajtha L (ed). Philadelphia: Saunder WB; 8:453.

36.- Dexter TM (1989). Haemopoietic growth factors. *Brit Med Bull* 45:337.

37.- Dexter TM and Spooncer E (1987). Growth and differentiation in the hemopoietic system. *Ann Rev Cell Biol* 3:423.

38.- Dexter TM (1979). Cell interactions *in vitro*. *Clin Haematol* 8:453.33.

39.- Dinarello CA (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77:1627.

40.- Dorshkind K (1991). Hemopoietic system. *Encyclopedia Hum Biol* 4:165.

41.- Dorshkind K, Schouest L and Fletcher WH (1985). Morphologic analysis of long-

term bone marrow cultures that support B-lymphopoiesis or myelopoiesis. *Cell Tissue Res* 239:375.

42.- Dorshkind K (1990). Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu Rev Immunol* 8:111.

43.- Fauser AA and Messner HA (1979). Identification of megakaryocytes, macrophages and eosinophils in colonies of human bone marrow containing neutrophils, granulocytes and erythroblasts. *Blood* 53:1023.

44.- Fialkow PJ (1982). Cell lineages in hematopoietic neoplasia studied with glucose-6-phosphatedehydrogenase cell markers. *J Cell Physiol* 37:23.

45.- Fischberg Z, Lewis JP and Trobaugh FE (1967). Colony formation on spleen of irradiated mice injected with human marrow cells. *Exp Hematol* 13:22.

46.- Foster O and Landy M (1981). Heterogeneity of mononuclear phagocytes. London: Academic Press; p-279.

47.- Gillis S (1991). Cytokine receptors. *Curr Opin Immunol* 3:315.

48.- Gimble JM (1990). The function of adipocytes in the bone marrow stroma. *The New Biol* 2:304.

49.- Golde DW and Gasson JC (1988). Hormones that stimulate the growth of blood cells. *Sci Am* 259:62.

50.- Goodwin RG and Namen AE (1992). Interleukin-7. In: Aggarwal BB and Gutterman JU, eds. *Human cytokines: Handbook for basic and clinical research*. Boston: Blackwell Scientific Publication 168-180.

51.- Gordon MY and Barrett AJ (1985). The haemopoietic microenvironment. In: Gordon MY and Barrett MJ, eds. *Bone marrow disorders: The biological basis of clinical problems*. New York: Blackwell Scientific Publications, p-422.

52.- Gordon MY and Barrett AJ (1985). Haemopoietic precursor cells. In: Gordon MY and Barrett AJ, eds. *Bone marrow disorders: The biological basis of clinical problems*. London: Blackwell scientific publications; 20-59.

53.- Gordon MY, Riley GP, Watt SM and Greaves MF (1987). Compartmentalization of a haematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. *Nature* 326:403.

54.- Gordon S, Keshav S and Chung (1988). Mononuclear phagocytes: Tissue distribution and functional heterogeneity. *Curr Opin Immunol* 1:26.

55.- Hara H and Ogawa M (1978). Murine hemopoietic colonies in culture containing normoblasts, macrophages and megakaryocytes. *Am J Hematol* 4:23.

56.- Heard JM, Fichelson S and Varet B (1982). Role of colony stimulating activity in mouse long-term bone marrow cultures: Evidence for its production and consumption by adherent cells. *Blood* 59:761.

57.- Heyworth CM, Vallance SJ, Whetton AD and Dexter TM (1990). The biochemistry and biology of the myeloid haemopoietic cell growth factors. *J Cell Sci*; Suppl 13:57.

58.- Hodgson GS and Bradley TR (1980). Properties of haematopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: Evidences for a pre-CFU-S cell. *Nature* 281: 381.

59.- Ihle JN, Keller J, Henderson L, Klein F and Palaszynski EW (1982). Procedures for the purification of interleukin 3 to homogeneity. *J Immunol* 129:2431.

60.- Ikuta K, Uchida N, Friedman J and Weissman IL (1992). Lymphocyte development from stem cells. *Ann Rev Immunol* 10:759.

61.- Ikuta K, Kina T, MacNiel I, Uchida N, Peault B, Chien Y-H and Weissman IL. (1990). A developmental switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells. *Cell* 62:863.

62.- Jandl JH (1991). Blood cell formation. In: Jandl JH, ed. *Blood: Pathophysiology*. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications, Inc; 1-23.

63.- Jazbieh M, Ali-Osman F and Murphy MJ (1986). Rapid method for permanent slide preparation of colonies in soft agar cultures. *Int J Cell Cloning* 4:368.

64.- Jelkmann W (1992). Erythropoietin: Structure, control of production and function. *Physiol Rev* 72:449.

65.- Johnson GR and Metcalf D (1977). Pure and mixed erythroid colony formation *in vitro* stimulated by spleen conditioned medium with no detectable erythropoietin. Proc Natl Acad Sci (USA) 74:3879.

66.- Johnson GR and Metcalf D (1980). Detection of a new type of mouse eosinophil colony by Luxol-fast blue staining. Exp Hematol 8:549.

67.- Jones-Villanueva E and Phillips RAJ (1980). Potentials for lymphoid differentiation by cells from long-term cultures of bone marrow. Exp Hematol 8:65.

68.- Kubanek B, Bock O, Heit W, Bock E and Harriss EB (1973). Size and proliferation of stem cell compartments in mice after depression of erythropoiesis. In: Hemopoietic stem cells. Ciba F.

69.- Kurnit DM, Matthyse S, Papayannopoulou T and Stamatoyannopoulos G (1985). Stochastic branching model for hemopoietic progenitor cell differentiation. J Cell Physiol 123:55.

70.- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680.

71.- Lasser A (1983). The mononuclear phagocytes system. A review. Human Path 14:108.

72.- Leibovich SJ (1978). Production of macrophage-dependent fibroblast-

stimulating activity (M-FSA) by murine macrophages: effects on BALBc 3T3 fibroblasts. *Exp Cell Res* 113:47.

73.- Lipton J and Sachs L (1981). Characterization of macrophage and granulocyte inducing proteins for normal and leukemic myeloid cells produced by the Krebs ascites tumor. *Biochem Biophys Acta* 673:552.

74.- Lord BI and Dexter TM (1988). Purification of haemopoietic stem cells the end of the road?. *Immunol Today* 9:376.

75.- Lotem J, Lipton J and Sachs (1980). Separation of different molecular forms of macrophage and granulocyte inducing proteins for normal and leukemic myeloid cells. *Int J Cancer* 25:763.

76.- Lovhaug D, Pelus LM, Nordlie EM, Boyum A and Moore MAS (1986). Monocyte-conditioned medium and interleukin-1 induce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production in the adherent cell layer of murine bone marrow cultures. *Exp Hematol* 14:1037.

77.- Magli MC, Iscove NN and Odartchenko N (1982). Transient nature of early hematopoietic spleen colonies. *Nature* 295:527.

78.- McNiece IK, Bertonecello I, Kriegler AB, Quesenberry PJ and Zsebo KM (1992). In: Murphy MJ, ed. Colony-forming cells with high proliferative potential. Dayton: Alpha-Med Press. 267-278.

- 79.- Mendoza JF, López R y Weiss B (1991). Inducción de receptores Fc y efecto proliferador de la interleucina- 1 y 2 recombinates humanas (rhIL-1 y rhIL-2) sobre las líneas WR19M.1 y WEHI3BD. Sangre (España), 36:205.
- 80.- Mendoza JF, López R, Machuca C, Sánchez L, Hernández J y Weiss B (1993). Los factores estimuladores de colonias (CSFs) y las interleucinas (ILs): reguladores de la producción hematopoyética. Sangre (España) (En prensa).
- 81.- Mertelsmann R (1990). Lymphohaemopoietic growth factors in cancer therapy. Berlin: Springer-Verlag; p-90.
- 82.- Mertelsmann R and Herrmann F (1990). Hematopoietic growth factors in clinical applications. New York: Marcel Dekker Inc; p-496.
- 83.- Metcalf D (1989). The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. Nature 339:27.
- 84.- Metcalf D (1969). Studies of colony formation *in vitro* by mouse bone marrow cells. I. Continuous cluster formation and relation of cluster to colonies. J Cell Physiol 74:323.
- 85.- Metcalf D (1992). Hemopoietic regulators. TIBS 32:286.
- 86.- Metcalf D, Johnson GR and Mandel TE (1979). Colony formation in agar by multipotential hemopoietic cells. J Cell Physiol 98:401.

87.- Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T and Arai K (1992). Cytokine receptors and signal transduction. *Ann Rev Immunol* 10:295.

88.- Moeller J, Hultner L, Schmitt E, Breuer M and Dormer P (1990). Purification of MEA, a mast cell growth-enhancing activity, to apparent homogeneity and its partial aminoacid sequencing. *J Immunol* 144:4231.

89.- Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA and Mosmann TR (1990). Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 248:1230.

90.- Moore MAS (1991). The clinical use of colony stimulating factors. *Ann Rev Immunol* 9:159.

91.- Mora ML, Cáceres JR, Mendoza JF, Santiago E, Zambrano IR y Weiss-Steider B (1988). Determinación de la capacidad del factor inductor de macrófagos y granulocitos (MGI) de 45 Kda, para inducir la aparición de otros MGIs. XXIX Jornada Anual AMEH; Tijuana, BC.

92.- Morstyn G and Burgess AW (1988). Hemopoietic growth factors: A review. *Can Res* 48:5624.

93.- Mueller H and Frank NW (1983). Biochemical and immunological characterization of desmoplakins I and II: The major polypeptide of the desmosome plaque. *J Mol Biol* 47:671.

94.- Musashi M, Yang YC, Paul SR, Clark SC, Sudo T, Ogawa M. Direct and synergistic effects of interleukin-11. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 88:765.

95.- Nakahata T, Gross AJ and Ogawa M (1982). A stochastic model of self-renewal and commitment to differentiation of primitive hemopoietic stem cells in culture. *J Cell Physiol* 113:445.

96.- Nathan CF (1987). Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79:319.

97.- Nelson DS (1991). Macrophages. *Enc Hum Biol* 4:853.

98.- Nicola NA (1989). Hemopoietic cell growth factors and their receptors. *Ann Rev Biochem* 58:45.

99.- Nicola NA and Johnson GR (1982). The production of committed hemopoietic colony-forming cells from multipotential precursor cells *in vitro*. *Blood* 60:1019.

100.- Nowell PC, Hirsch BE, Fox DH and Wilson DB (1970). Evidence for the existence of multipotential lymphohematopoietic stem cells in the adult rat. *J Cell Physiol.* 75:151.

101.- Novak JP and Stewart CC (1991). Stochastic versus deterministic in haemopoiesis: What is what?. *Brit J Hematol* 78:149.

102.- Oppenheim JJ (1981). Lymphokines. In: Oppenheim JJ, Rosenstreich DL and Potter M, eds. *Cellular functions in immunity and inflammation*. London: Edward

Arnold, 259-282.

103.- Parker WB and Cheng YC (1991). Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Phar Ther* 48:381-395.

104.- Paul SR, Bennett F and Calvetti JA (1990). Molecular cloning of cDNA encoding interleukin 11, stromal cell derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 87:7512.

105.- Paul WE (1991). Interleukin-4: A prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 77:1859.

106.- Paveri P, Walz A, Dewald B and Baggiolini (1988). A novel neutrophil activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 167:121.

107.- Pike BL and Robinson WA (1970). Human bone marrow colony growth in agar gel. *J Cell Physiol* 76:77.

108.- Platzer E (1989). Human hematopoietic growth factors. *Eur J Hematol* 42:1.

109.- Pluznik DH and Sachs L (1965). The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J Cell Comp Physiol* 66: 319.

110.- Pluznik DH and Sachs L (1966). The induction of clones of normal "mast" cells by a substance from conditioned medium. *Exp Cell Res* 43:553.

111.- Powandi M, Oppenheim JJ, Kluger MJ and Dinarello CA (1988). Monokines and other nonmyelocytic cytokines. New York: Alan R Liss; p-269.

112.- Prchal JF, Adamson JW, Steinmann L and Fialkow PJ (1976). Human erythroid colony formation *in vitro*: evidence for clonal origin. J Cell Physiol 89:489.

113.- Rich IN (1988). The macrophage as a production site for hematopoietic regulator molecules: Sensing and responding to normal and pathophysiological signals. Anticancer Res 8:1015.

114.- Rich IN and Sawatzki G (1987). The role of lactoferrin in regulating colony stimulating factor production. In: Najman A, Guigon M, Gorin N-C and Mary J-Y, eds. The inhibitors of hematopoiesis. Paris: John Libbey Eurotext; p-67.

115.- Roberts R, Gallagher J, Spooncer E, Allen TD, Bloomfield F and Dexter TM (1988). Heparan sulphate bound growth factors: A mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis. Nature 332:376.

116.- Roberts RA, Spooncer E, Parkinson EK, Lord BI, Allen TD and Dexter TM (1987). Metabolically inactive 3T3 cells can substitute for marrow stromal cells to promote the proliferation and development of multipotent haemopoietic stem cells. J Cell Physiol 132:203.

117.- Ruef C and Coleman DL (1990). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor: Pleiotropic cytokine with potential clinical usefulness. Rev Infect Diseases 12:41.

118.- Ruoslahti E and Yamaguchi Y (1991). Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 64:867.

119.- Russel ES (1979). Hereditary anemias of the mouse: A review for geneticists. *Adv Gen* 20:357.

120.- Sachs L (1987). The molecular control of blood cell development. *Science* 238:1374.

121.- Sachs L (1992). The molecular control of hematopoiesis: From clonal development in culture to therapy in the clinic. *Int J Cell Cloning* 10:196.

122.- Sanderson CJ (1992). Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 79:3101.

123.- Santiago E, Mendoza JF, Corona T, López R, Mora L, Flores F and Weiss-Steider B (1992). Induction of Fc receptors on murine macrophages and leukemic cells by human interleukin-1. *Europ Cytokine Network* (submitted).

124.- Schofield R, Lord BI, Kyffin S and Gilbert CW (1980). Self-maintenance capacity of CFU-S. *J Cell Physiol* 103:355.

125.- Schrader JW (1985). Bone marrow differentiation *in vitro*. *Crit Rev Immunol* 4:197.

126.- Schrader JW and Schrader S (1978). *In vitro* studies on lymphocyte

differentiation. I. Long-term *in vitro* culture of cells giving rise functional lymphocytes in irradiated mice. J Exp Med 148:823.

127.- Shoukat D, Gabourg L, Galloway P and Eaves C (1988). 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) 85:9253.

128.- Simmons PJ (1984). Ph. D. Thesis. Victoria University of Manchester.

129.- Song ZX, Shaddock R, Innes D, Waheed A and Quesenberry PJ (1985). Hematopoietic factor production by a cell line (TC-1) derived from adherent murine marrow cultures. Blood 69:1120.

130.- Spangrude GJ, Heimfeld S and Weissman IL (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. Science 241:58.

131.- Spangrude GJ (1991). Hematopoietic stem-cell differentiation. Curr Opin Immunol 3:171.

132.- Stanley ER, McNeil TA and Chan SH (1970). Stimulation of bone marrow colony growth *in vitro* by human urine. Brit J Hematol 18:585.

133.- Stern AS and Podlaski FJ (1990). Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B lymphoblastoid cell. Proc Natl Acad Sci (USA) 87:6808.

- 134.- Souza LM, Boone TC and Gabilove J (1986).** Recombinant human granulocyte-colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science* 232:61.
- 135.- Sullivan R, Lipkin EW, Bell R, Larsen NE and McCarroll LH (1985).** The kinetics of the production of granulocyte-monocyte colony stimulating activity (GM-CSA) by isolated human monocytes: response to bacterial endotoxin. *Prog Clin Biol Res* 184:173.
- 136.- Thomas PS, Pictrangeli CE, Hayashi SI, Schachner N, Goridis C, Low MG and Kincade PW (1988).** Demonstration of neural cell adhesion molecules on stromal cells that support lymphopoiesis. *Leukemia Res* 2:171.
- 137.- Till JE (1982).** Stem cells in differentiation and neoplasia. *J Cell Physiol SUPP* 1.
- 138.- Till JE, McCulloch EA and Siminovitch L (1964).** A stochastic model of stem cell proliferation based on the growth of spleen-colony forming cells. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 51: 29.
- 139.- Till JE (1976).** Regulation of hemopoietic stem cells. In: *Stem cells of renewing populations*, Cairnie AB, Lala PK and Osmond DG (eds). Acad Press, NY p 143.
- 140.- Till JE and McCulloch EA (1961).** A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Rad Res* 14:213.
- 141.- Van Zant and Goldwasser E (1979).** Competition between erythropoietin and

colony-stimulating factor for target cells in mouse marrow. *Blood* 53:946.

142.- Van Snick J (1990). Interleukin-6: An overview. *Ann Rev Immunol* 8:253.

143. Watson JD, Crosier PS, March CJ, Conlon PJ, Mochizuki DY, Gillis S and Urdal DL (1986). Purification to homogeneity of a human hematopoietic growth factor that stimulates the growth of murine interleukin 3-dependent cell line. *J Immunol* 137:854.

144.- Weinstein R, Riordan MA, Wene K, Kreezko S, Zhou M and Dainiak N (1989). Dual role of fibronectin in hematopoietic differentiation. *Blood* 73:111.

145.- Weiss L (1976). Hematopoietic microenvironment of the bone marrow: An ultrastructural study of the stroma in rats. *Anat Rec* 186:161.

146.- Weiss L (1981). Haemopoiesis in mammalian bone marrow. In *Microenvironments in haemopoietic and lymphoid differentiation*, Ciba Foundation Symposium 84, Porter R and Whelan J (eds). Pitman Medical, London, p-67.

147.- Westen H and Bainton DF (1979). Association of alkaline-phosphatase-positive reticulum cells in bone marrow with granulocyte precursors. *J Exp Med* 50:919.

148.- Wight TN, Kinsella MG, Keating A and Singer JW (1986). Proteoglycans in human long-term bone marrow cultures: Biochemical and ultrastructural analysis. *Blood* 67:33-13.

149.- Williams N, Jackson H, Sheridan APC, Murphy MJ, Elste A and Moore MAS

(1978). Regulation of megakaryopoiesis in long-term murine bone marrow cultures. *Blood* 51:245.

150.- Williams N, Jackson H, Sheridan AP, Murphy MJ, Elste A and Moore MAS (1978). Regulation of megakaryopoiesis in long-term murine bone marrow cultures. *Blood* 51:245.

151.- Witte PL, Robinson M, Henley A, Low MG, Stiers DL, Perkins S, Fleischman RA and Kincade PW (1987). Relationships between B-lineage lymphocytes and stromal cells in long-term bone marrow cultures. *Eur J Immunol* 17:1473.

152.- Wolf NS and Prestley (1986). Kinetics of early and late spleen colony development. *Exp Hematol* 14:676.

153.- Wu AM, Till JE, Semonovitch L and McCulloch EA (1968). Cytological evidence for a relationship between normal hemopoietic-colony forming cells and cells of the lymphoid system. *J Exp Med* 127:455.

154.- Zachariae COC and Matsushima K (1992). Interleukin-8. In: Aggarwal BB and Gutterman JU, eds. *Human cytokines: Handbook for basic and clinical research*. Boston:Blackwell Scientific Publication 181-195.

155.- Zambrano IR, Cáceres JR, Mendoza JF, Santiago E, Mora LM, Morales MG, Corona MT and Weiss-Steider B (1989 a). Evidences that fibroblast and epithelial cells produce a specific type of macrophage and granulocyte inducer, also known as colony stimulating factor, and that monocyte-macrophages can produce another factor with

proliferative inducing activity on myeloid cells and differentiative activity on macrophages. In: Orlic, ed. Molecular and cellular control of hematopoiesis. New York : Annal of the New York Academy of Sciences; 141-155.

156.- Zambrano IR, Mendoza JF, Cáceres JR, Santiago E, Mora LM, Marín TNJ and Weiss-Steider B (1989 b). Evidence that the macrophage-granulocyte inducer (MGI) is produced during cell proliferation, stored in G0, released in G1, cell specific and induces the secretion of other colony-stimulating activities (CSA). *Exp Hematol* 17:267.

157.- Zambrano IR, Mora ML, Mendoza JF, Cáceres JR, Santiago E y Weiss-Steider B (1988). Determinación del peso molecular del CSF proveniente del medio condicionado de la línea leucémica de tipo macrofágico WR19M.1. XXIX Jornada Anual AMEH; Tijuana, BC.

158.- Zucker-Franklin D, Grusky G, Hirayama N and Schnipper E (1981). The presence of mast cell precursors in rat peripheral blood. *Blood* 58:544.

159.- Zuckerman KS and Wicha (1983). Extracellular matrix production by adherent cells of long-term murine bone marrow cell cultures. *Blood* 61:540.