

42
261

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

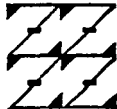


FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

LOS LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES (PMN)
INDUCIDOS A LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATON
SON CAPACES DE PRODUCIR UNA ACTIVIDAD
FORMADORA DE COLONIAS DE MACROFAGOS.

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
JOSE LUIS VENTURA GALLEGOS

U N A M
P R E
ZARAGOZA



LO HUMANO
ES
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR: M. EN C. MA. DE LOURDES MORA GARCIA
ASESOR: DR. BENNY WEISS STEIDER

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



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.

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVO A CABO EN EL LABORATORIO DE DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER, EN LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA", UNAM., BAJO LA DIRECCION DE LA M. en C. Ma. de LOURDES MORA GARCIA .

A MIS PADRES:

FRANCISCO, QUIEN ME DIO LA VIDA Y QUE SIEMPRE RECORDARE AUNQUE YA NO ESTE CON NOSOTROS.

EVARISTA, A QUIEN DEBO TODO LO QUE SOY, QUIERO REITERARLE MI MAS PROFUNDO AGRADECIMIENTO POR EL AMOR DE MADRE Y SU APOYO TOTAL.

A MIS HERMANOS:

CONCEPCION, FRANCISCO, AUDON, ANGELA, MARIA ELENA, CARMEN, VALENTINA Y ALFREDO, POR SU APOYO EN LA REALIZACION DE MIS METAS, MISMAS QUE HAN SIDO LAS SUYAS.

A MARISELA:

POR SU CARIÑO, PACIENCIA Y COMPRESION.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS:

ALICIA, ARTURO, CARLOS, DEYANIRA, JOSEFINA Y LAURA, POR SU AMISTAD INCONDICIONAL.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
MARCO TEORICO.....	4
Médula ósea.....	4
Hematopoyésis.....	5
Factores de crecimiento hematopoyético (CSF's).....	9
Células fagocíticas.....	19
OBJETIVOS.....	27
MATERIAL Y METODOS.....	28
Material biológico.....	28
Condiciones de cultivo.....	28
Obtención de células de médula ósea.....	28
Obtención de granulocitos de cavidad peritoneal.....	28
Obtención de macrófagos de cavidad peritoneal.....	29
Obtención de linfocitos de nódulos linfáticos.....	29
Medios condicionados de L-929.....	29
Ensayos de CSF.....	29
Identificación de tipos de colonias.....	30
Concentración de CSF's.....	30
Ensayos de neutralización.....	31
varios.....	31
RESULTADOS.....	32
DISCUSION.....	42
BIBLIOGRAFIA.....	46
APENDICES.....	62
A) Medio MEMD.....	62
B) Medio RPMI-1640.....	64
C) Solución Amortiguadora de Fosfatos.....	66
D) Técnica de Esterasas Inespecificas.....	67
E) Técnica de ELISA.....	69
AGRADECIMIENTOS.....	71

RESUMEN

Los macrófagos y granulocitos son células sanguíneas que participan en la respuesta inmune del organismo contra agentes patógenos, su desarrollo y funcionalidad está regulado por un conjunto de hormonas hematopoyéticas conocidas como Factores Estimuladores de Colonia (CSF's).

Hasta hace algunos años se había considerado al granulocito polimorfonuclear (PMN) como una célula caduca, incapaz de producción proteica, por el simple hecho de tener disminuido tanto ribosomas como el retículo endoplásmico.

Actualmente existen algunos trabajos en los que se ha demostrado la capacidad de síntesis de ARN y proteínas en el PMN. En particular, una área de interés es la producción de citocinas inmunoreguladoras por el PMN.

Debido a que existe poco conocimiento sobre la función inmunoreguladora del PMN, y que en reportes anteriores solo se han llevado a cabo *in vitro*, en el presente trabajo evaluamos la presencia de una Actividad Formadora de Colonia (AFC) tipo CSF en PMN's de cavidad peritoneal de ratón retados *in vivo* con Caseinato de Sodio.

Los resultados demostraron que el PMN cuando es retado con un agente endotóxico tiene la capacidad de producir una AFC de macrófagos, similar a la inducida por el Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos (M-CSF). Además, utilizando ensayos de ELISA se identificó la presencia de M-CSF en Lisados de Granulocitos (LG) a través de anticuerpos específicos anti M-CSF. La AFC de macrófagos se vió totalmente inhibida cuando se introdujo anti M-CSF en ensayos formadores de colonias (técnica de bicapa), pero además, la AFC fue parcialmente inhibida cuando se utilizó anti GM-CSF. Por lo tanto, evidenciamos la capacidad productora de CSF's en PMN's inducidos a la cavidad peritoneal.

Asimismo, se discute que el PMN por ser una de las primeras células en responder y migrar hacia el sitio de afección, es lógico pensar que la secreción local de citocinas inmunoreguladoras como M-CSF y tal vez GM-CSF puedan ser importantes en la iniciación y amplificación de la respuesta inflamatoria y específica.

Finalmente, el presente trabajo aporta evidencia del papel inmunoregulador poco conocido del PMN frente a un reto endotóxico.

INTRODUCCION

La médula ósea es uno de los tejidos más organizados en el cuerpo, y tiene su papel principal en la formación de tejido hematopoyético, el cual da lugar a la formación de sangre, esta última se compone por plasma y distintos tipos celulares agrupados en leucocitos, eritrocitos y plaquetas.

La formación de células sanguíneas maduras se deriva de una población totipotencial compuesta de células denominadas "madre o tallo" las cuales están localizadas en la médula ósea. Las células "tallos" pueden proliferar y comprometerse hacia un linaje determinado dependiendo del estímulo de ciertas hormonas producidas por células accesorias medulares (estroma) o extramedulares. Las células sanguíneas maduras tienen una vida muy corta, por lo tanto, estas poblaciones son continuamente reemplazadas debido a la capacidad de auto-renovación y comprometimiento de las células "tallos".

Se han descrito ampliamente diferentes hormonas hematopoyéticas en las dos últimas décadas, éstas han sido purificadas, molecularmente clonadas y expresadas en diferentes sistemas para producir cantidades suficientes para uso en investigación y recientemente para su aplicación clínica.

Las hormonas hematopoyéticas comúnmente llamadas ahora factores estimuladores de colonias o CSFs (del inglés, Colony Stimulating Factor), han demostrado que regulan la sobrevivencia, proliferación, diferenciación y actividad funcional de células sanguíneas sobre todo del linaje mielóide (eritrocitos, megacariocitos, granulocitos y macrófagos).

Los Factores de crecimiento hematopoyéticos más ampliamente conocidos son: 1) Interleucina 3 o multi-Factor Estimulador de Colonias (IL-3 o multi-CSF), la cual participa en estadios iniciales del desarrollo hematopoyético principalmente a nivel de progenitores mieloides; 2) Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y macrófagos (GM-CSF), que actúa en etapas intermedias y terminales del desarrollo mielóide y principalmente de los linajes granulocítico y macrofágico; 3) Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (G-CSF), y 4) Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos (M-CSF), los cuales actúan en estadios terminales de diferenciación y actividad funcional de granulocitos y macrófagos respectivamente.

Varios estudios han demostrado que los CSFs son aún más que factores que inducen el crecimiento hematopoyético, puesto que ellos también pueden afectar una multitud de funciones en células maduras hematopoyéticas y no hematopoyéticas. Además, se sabe que numerosas citocinas son liberadas para estimular a las células responsables de la respuesta celular y humoral en el sistema inmune, y dentro de estas citocinas tenemos también a los factores de crecimiento hematopoyético (CSFs), los cuales potencian o incrementan la respuesta de células maduras mieloides en el sitio de infección o inflamación.

Desde hace varios años se sabe que en la respuesta inflamatoria están implicados las células sanguíneas, sobre todo aquellas del linaje granulocítico y macrofágico en

forma inespecífica, y en forma específica como células presentadoras de antígeno (macrófago) y linfocitos T y B, estos últimos son responsables de la respuesta celular y humoral (vía la secreción de anticuerpos). Mientras los linfocitos y macrófagos han evidenciado que tienen un papel importante en la respuesta inmune a través de la secreción de varias citocinas, incluyendo CSF's; los granulocitos habían sido considerados como una simple célula fagocítica incapaz de producir citocinas.

Debido a que recientemente se han encontrado algunas evidencias *in vitro* de la capacidad de síntesis de ARNm y proteínas sobre todo para IL-1, receptores de complemento y MHC de tipo I por parte de los granulocitos polimorfonucleares (forma madura del granulocito neutrófilo); actualmente varios investigadores son de la idea de que el polimorfonuclear (PMN) puede tener un papel importante en la respuesta inflamatoria e inmune a través de la producción de citocinas inmunoreguladoras como los CSF's. Puesto que estas células son las primeras en llegar a un sitio de inflamación, se podría esperar que la secreción local de CSF's sea importante para la iniciación y amplificación de la respuesta inflamatoria.

En base a las anteriores evidencias en este trabajo evaluamos si el PMN cuando es retado *in vivo* a través de endotoxina tiene la capacidad de producir alguna Actividad Formadora de Colonia (AFC) tipo CSF.

MARCO TEORICO

MEDULA OSEA.

Localizada en las cavidades de los huesos, la médula representa uno de los tejidos más grandes y altamente organizados en el cuerpo. Aproximadamente 85 % de la cavidad es ocupada por la médula, con un remanente 15 % ocupado por hueso trabecular tipo esponjoso. Estructuralmente la médula ósea puede ser dividida en 2 compartimientos: uno extra vascular, el cual es el sitio más importante de la hematopoyesis; y otro intravascular que consiste de delgados vasos sanguíneos denominados sinusoides (1). Como hemos visto antes, se ha manejado un concepto el cual es de interés en este trabajo: hematopoyesis, el cual puede ser definido como una serie de eventos consecutivos, en que a partir de una célula "tallo" primitiva da lugar a la formación de células sanguíneas funcionales (1-3).

Funcionalmente, la médula ósea juega un papel principal en la formación del tejido hematopoyético (4). Así, la médula contribuye en un adulto normal con cantidades producidas y liberadas diariamente hacia la circulación de aproximadamente 2.5 billones de células rojas, 1 billón de granulocitos y 2.5 billones de plaquetas por kilogramo de peso corporal (1,5).

En el nacimiento, virtualmente todas las cavidades óseas están completamente llenas de células hematopoyéticas, pero conforme avanza la edad los elementos hematopoyéticos (médula roja) son gradualmente reemplazados por tejido adiposo (médula amarilla), particularmente en las cavidades periféricas óseas (1). En el adulto, la médula hematopoyética se encuentra sólo en esternón, costillas, vértebras, clavículas, cráneo, pelvis y en los extremos proximales (epífisis) de huesos largos como fémures y húmeros (3-5).

Para que la médula ósea funcione adecuadamente es necesaria la presencia de los siguientes elementos (revisada en referencia 4):

- 1) Vitamina B12 y ácido fólico para la síntesis de ácidos nucleicos.
- 2) Hierro para síntesis de hemoglobina por parte de las células rojas y la adición de proteínas, lípidos y azúcares necesarios para la síntesis celular.
- 3) Un micro ambiente especializado en la médula ósea.
- 4) Función normal de células "tallo" (células totipotenciales) para generar la formación de todos los linajes celulares sanguíneos.
- 5) Regulación de una variedad de hormonas hematopoyéticas específicas (Eritropoyetina, G-CSF, M-CSF, reguladores de células tallo etc.).
- 6) Otras hormonas que pueden afectar la función medular. Andrógenos, que estimulan eritropoyesis y posiblemente progenitores no eritroides. Estrógenos, inhiben la trombopoyesis y granulopoyesis. Glucocorticoides, en dosis fisiológicas no influye materialmente en la hematopoyesis, sin embargo en altas dosis puede producir una eritrocitosis y ocasionalmente trombocitopenia. Hormona del crecimiento, la cual estimula la producción de células rojas. No obstante, poco es

conocido acerca del mecanismo de acción de estas hormonas en células de médula ósea.

7) Inhibición (feedback) de la producción de células de médula ósea. Los neutrófilos maduros ejercen un control negativo en granulopoyesis, lo cual puede involucrar lactoferrina. Un proceso similar puede existir en la producción de plaquetas; mientras que la saturación de oxígeno en el tejido inhibe la producción de eritropoyetina y como consecuencia eritropoyesis.

La médula ósea no sólo está compuesta por células "tallo" y progenitores hematopoyéticos en varios estadios, existen a su vez un tipo de células especializadas que en conjunto se denominan células estromales, éstas en la última década han sido bastante estudiadas, principalmente en el contexto del papel que juegan en la regulación de las células "tallo" y su progenie en la médula ósea (6-9). Se ha determinado que las células estromales funcionan físicamente como una matriz de soporte, pero su función más importante es que poseen la capacidad de regular la producción de células sanguíneas a través de la síntesis y liberación de hormonas hematopoyéticas, que influyen en el crecimiento y maduración de las células primitivas formadoras de sangre (10,11).

Las células estromales están compuestas por células macrofágicas, células tipo fibroblásticas y endoteliales principalmente (1,12). Sin embargo, existen otros tipos celulares que tal vez no tengan influencia directa o por lo menos no se ha determinado sobre células formadoras de sangre, pero forman parte del microambiente hematopoyético especializado, estas células son: los osteoclastos, osteoblastos, y lipocitos (adipocitos) los cuales comprenden la mayoría de la médula ósea amarilla, no obstante, estos últimos tipos celulares juegan un papel importante en las funciones óseas, como la formación de hueso y resorción de calcio (1,13).

Así la médula ósea es un tejido que posee el microambiente favorable para sostener y controlar la proliferación, y la maduración (diferenciación) de las células sanguíneas según las necesidades corporales durante toda la vida (12,13).

HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis como ya la habíamos definido antes, es el "simple" proceso de formación de células sanguíneas funcionales (1-3).

En el humano, las células sanguíneas tienen su génesis en las primeras semanas de vida intrauterina (3). La hematopoyesis comienza en la segunda semana de vida embrionaria en el mesénquima, en donde se desarrolla una red confluyente de vasos sanguíneos que se anastomosan y se dirigen al saco vitelino, donde también existe hematopoyesis embrionaria. A partir de la sexta semana de vida intrauterina, se forma un endotelio que rodea todo el sistema hematopoyético y aparecen focos germinativos en el bazo y en el hígado, que es el centro principal de la hematopoyesis, predominando la eritropoyesis, seguida por la mielopoyesis y la macaropoyesis, y por último los macrófagos (1-3).

Apartir de la segunda semana de vida fetal, la hematopoyesis aparece en la médula ósea de la clavícula y otros huesos, y es el centro hematopoyético más importante en la segunda mitad de la gestación y de la vida postnatal. Después del

nacimiento decae la hematopoyesis del hígado y el bazo, y conforme el individuo se desarrolla, la cavidad medular del esqueleto aumenta y la grasa sustituye a la mayor parte de la médula ósea activa en el esqueleto periférico (2,3,5).

Las sangre es uno de los tejidos que en comparación de los demás en el cuerpo es de una consistencia coloidal, formada por un fluido (principalmente agua) denominado plasma, en el cual están embebidas diferentes sustancias nutritivas y hormonas. Además del plasma, la sangre contiene varios tipos celulares, los cuales desempeñan diferentes funciones a través de la circulación en el sistema vascular. Así, las células sanguíneas llevan a cabo funciones tales como el transporte de oxígeno, sustancias nutritivas, productos de excreción y desecho del metabolismo, y defensa contra agentes patógenos o nocivos para el organismo (14-16).

Las células sanguíneas se dividen en tres grupos: 1) eritrocitos, los cuales se encargan del transporte de hemoglobina, la cual sirve para fijar al oxígeno permitiendo llevarlo así a todo el organismo; 2) plaquetas, no son células como tal, pero se derivan de células gigantes denominadas megacariocitos, en sí las plaquetas son corpúsculos que realizan la función de coagulación a través de un tapón físico y de ciertos factores denominados de coagulación que son secretados por ellas y el endotelio vascular; y 3) leucocitos, quienes se encargan de la defensa del organismo y del desecho de células senescentes y malignas (14, 17, 18).

Los leucocitos agrupan literalmente a tres tipos celulares: 1) linfocitos, los cuales componen el sistema inmune llevando a cabo la respuesta específica, a su vez se dividen en linfocitos T y B, los primeros son responsables de la inmunidad celular y los últimos son los productores de anticuerpos llevando a cabo la inmunidad humoral; 2) macrófagos, en sangre periférica son llamados monocitos, pero cuando abandonan el torrente sanguíneo se convierten en macrófagos, los cuales completan el cuadro del sistema inmune, estas células eliminan por fagocitosis a microorganismos patógenos, cuerpos extraños y células senescentes; y 3) granulocitos, que dependiendo de sus propiedades de tinción pueden clasificarse en neutrófilos, eosinófilos y basófilos, todos ellos se ha visto que tienen la capacidad de fagocitar, pero los basófilos y eosinófilos tienen funciones muy especializadas y normalmente en sangre periférica son poco observables (16-19).

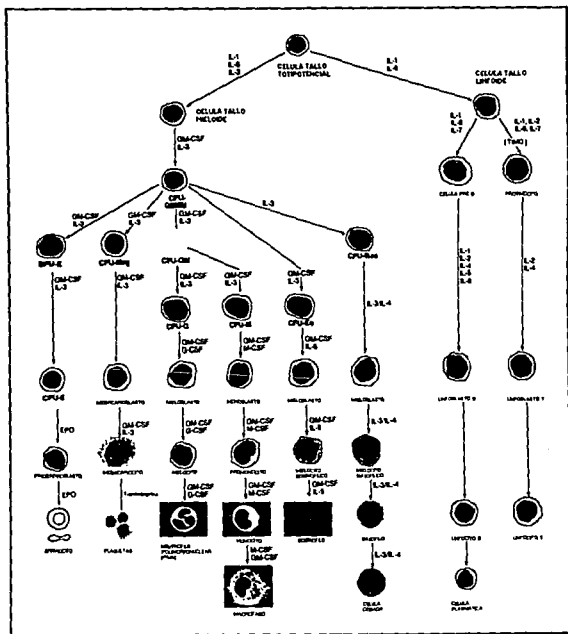
La mayor población de los granulocitos está dada por los neutrófilos polimorfonucleares o polimorfos, los cuales representan la forma madura de este tipo de granulocito, éstos engloban, lisan y digieren bacterias a través de sus numerosos lisosomas y vesículas secretoras (gránulos). Los granulocitos son células de vida corta y normalmente mueren durante el ataque al agente infeccioso (20).

Las células sanguíneas maduras tienen una vida limitada, y son incapaces de renovarse por sí mismas. El reemplazamiento de células hematopoyéticas periféricas gastadas, es la función de elementos primitivos denominados células "madre o tallo". Las células sanguíneas no se originan por oleadas, y con excepción de linfocitos T que maduran en el timo, las demás células permanecen en la médula ósea hasta completar su maduración (21), por lo tanto en la médula podemos observar todos los tipos celulares y en diferentes estadios (ver Figura 1).

Han sido propuestas dos teorías divergentes sobre las células tallo, la teoría monofilética y la teoría polifilética. La primera propone una célula precursora común para todas las células sanguíneas; la célula tallo totipotencial, que bajo la influencia

Figura 1: Diagrama de un modelo hematopoyético. En el diagrama ilustramos el principio aceptado generalmente, de que a partir de una célula tallo común puede originar a todas las células de la sangre. El eje principal lo constituye la célula madre o tallo totipotencial, esta célula da origen por un lado a la célula tallo linfóide y por otro a la célula tallo mielóide. Esta última ha sido llamada Unidad Formadora de Colonia del bazo (CFU-S, del inglés Colony Forming Unit-Spleen), Unidad Formadora de Colonia de Granulocitos Eritrocitos Macrófagos Megacariocitos (CFU-GEMM, del inglés Colony Forming Unit-Granulocyte Erythroid Macrophage Megakariocyte) en los sistemas de cultivo *in vitro*. En el diagrama se incluyen factores de crecimiento hematopoyéticos, como los factores estimuladores de colonias (CSFs), interleucinas (IL's), Eritropoyetina (EPO) y Trombopoyetina, y su acción en los diferentes niveles de maduración de las células hematopoyéticas y linfoides.

CFU-B: Unidad Formadora de Colonia de Estallido Eritroide. CFU-E: Unidad Formadora de Colonia Eritroide. CFU-GM: Unidad Formadora de Colonia de Granulocitos y Macrófagos. CFU-G: Unidad Formadora de Colonia de Granulocitos. CFU-M: Unidad Formadora de Colonia de Macrófagos. CFU-Eo: Unidad Formadora de Colonia de Eosinófilos. CFU-Bas: Unidad Formadora de Colonia de Basófilos. CFU-Meg: Unidad Formadora de Colonia de Megacariocitos (Tomada de referencias 22-28).



de factores humorales, puede renovarse por sí misma, proliferar y diferenciarse a todas las líneas celulares hematopoyéticas. En contraste, la teoría polifilética propone la existencia de una célula tallo para cada tipo celular sanguíneo (29).

Till y MacCulloch (1961) fueron de los primeros que aportaron las evidencias iniciales de la existencia de una célula precursora totipotencial. Ellos demostraron el potencial de células "tallo" al irradiar letalmente a ratones para destruir todas las células hematopoyéticas. La muerte de los animales podía evitarse si éstos eran transfundidos con suspensiones celulares de médula ósea normal de ratones donadores (30).

En el estadio temprano de recuperación, los bazo y médulas de los animales transfundidos mostraron estadios tempranos de proliferación, nódulos macróscopicos de células hematopoyéticas en proceso de proliferación. En los primeros 7 a 10 días cada uno de los nódulos tuvieron sólo una línea celular (eritrocitos, mielocitos o megacariocitos), y los nódulos presentes en el día 14 mostraron poblaciones celulares mezcladas. Las células que formaron colonias se les llamó unidad formadora de colonias del bazo CFU-S (del inglés, Colony Forming Units - Spleen). Esto sugirió que quizás los nódulos que aparecen en el día 7 (7-10 días), estuvieron formados de más células tallo unipotenciales comprometidas maduras, mientras que los nódulos del día 14 fueron derivados de una célula tallo totipotencial más primitiva (30).

Experimentos adicionales proporcionaron evidencias directas sobre la existencia de células tallo totipotenciales, en donde células de médula ósea normal se irradiaron severamente, lo suficiente para causar daño cromosómico (aberraciones). Las células irradiadas fueron transfundidas a ratones letalmente irradiados, observándose que tenían la capacidad de formar varios tipos celulares sanguíneos con las mismas aberraciones cromosómicas en nódulos del bazo. Además, suspensiones celulares de los bazo podían ser inyectados en ratones letalmente irradiados y generar nódulos de células con aberración similar (31). Sin embargo, las CFU-S sólo tenían la capacidad de generar células mieloides, y no linfoides (32).

Otros estudios a través de marcadores cromosomales únicos, y utilizando el ensayo de CFU-S han evidenciado que las células mieloides y linfoides probablemente tienen una célula progenitora común, capaz de generar CFU-S y progenitores linfoides (33).

Por lo tanto, las evidencias experimentales apoyan fuertemente a la célula tallo monofilética. En base a estas evidencias, las células hematopoyéticas pueden ser divididas en tres compartimentos dependiendo de la madurez (24,34).

En orden de maduración, estos compartimentos son:

- 1) Células totipotenciales primitivas, capaces de auto-renovarse y diferenciarse a todas las líneas celulares sanguíneas,
- 2) Células progenitoras comprometidas, destinadas a desarrollarse a diferentes tipos celulares,
- 3) Células maduras con funciones especializadas que disminuyen la capacidad de proliferación.

Por lo tanto, de esta forma se pudo determinar las características de las células progenitoras como son: auto-renovación, producción de progenie diferenciada, y alta capacidad de proliferación y auto-regulación (29,31,35).

A mediados de los 60's se empezaron a desarrollar métodos para el cultivo de células hematopoyéticas de médula ósea de ratón, esto pudo lograrse a través de técnicas de cultivo *in vitro* en un medio semisólido (agar). Estas técnicas introducidas por *Pluznik* y *Sachs* en 1965 (36), y por *Bradley* y *Metcalf* en 1966 (37), dieron lugar a grandes avances en el conocimiento de los fenómenos que caracterizan a la hematopoyésis. En estos trabajos se evidenció que no bastaban las condiciones nutricionales habituales para el desarrollo de células progenitoras hematopoyéticas, sino que era necesario incluir suero, proteína de orina o medio condicionado (sobrenadante de un cultivo de células en forma líquida) de ciertos tipos celulares previamente determinados (23).

Por otra parte, existen dos escuelas : una determinística y otra estocástica en lo que se refiere a la diferenciación de la célula tallo. La visión determinística sostiene que las influencias exteriores (incluida señales hormonales) dirigen la diferenciación de la célula tallo o madre (38); mientras que la estocástica defiende la visión de que la decisión para autor-enovarse o diferenciarse , así como el linaje a seguir, ocurre al azar (29,39).

Para discernir las anteriores visiones, *Ogawa* desarrolló métodos de cultivo de células primitivas de médula ósea, determinando que el desarrollo de colonias hacia cierto linaje se llevaba de una forma al azar, inclusive al separar células de esas colonias y colocarlas en otros cultivos, éstas presentaban el mismo comportamiento (29).

De acuerdo con el modelo determinístico, el entorno químico dirige la diferenciación de las células madre, o las compromete al menos a una vía de desarrollo. Las células de soporte (estroma) y varias moléculas que se unen a las células madres, podrían aportar señales para su diferenciación, de tal forma que cuando las colonias son estudiadas sin tejido de soporte, estas señales no son detectadas (38).

Las señales involucradas en el modelo determinístico, podrían ser la expresión de receptores, de tal manera que la célula tallo pueda determinar su diferenciación dependiendo de la señal hormonal. Sin embargo, lo que regula la expresión inicial de estos receptores o los tipos, es aún desconocido (38).

De los modelos manejados, lo más probable es que no se contrapongan, sino que existan ambos mecanismos, por lo que ambos modelos continúan produciendo más evidencias.

FACTORES DE CRECIMIENTO HEMATOPOYETICO (CSF's).

El estudio de los factores humorales que controlan el desarrollo y la maduración de las células hematopoyéticas se inicia a principios de este siglo, cuando en 1906 *Carnot* y *Deflandre* describen a la eritropoyetina como el factor responsable de la proliferación y la diferenciación de las células rojas o eritroides (40).

Posteriormente pasaría más de medio siglo para que el estudio de las moléculas implicadas en el crecimiento y desarrollo hematopoyético fuera nuevamente considerado. En esta etapa destacaron hechos importantes como: el desarrollo de técnicas de cultivo de células progenitoras hematopoyéticas en matrices semisólidas

y la identificación de factores solubles en sobrenadantes de células estromales con capacidad en la proliferación de células hematopoyéticas (36,37).

Hoy en día se conocen alrededor de 20 factores que están implicados en la regulación de las células hematopoyéticas y linfoides. Aquellas que regulan el tejido linfóide se denominan interleucinas (IL's, del inglés Interleukin), y los que regulan el tejido hematopoyético o mielóide son llamados factores estimuladores de colonia (CSF's, del inglés Colony Stimulating Factor) (41).

Los CSF's e IL's, a pesar de que se han definido literalmente como reguladores mieloides o linfoides respectivamente, ambos tipos pueden colaborar en forma cruzada a lo largo de la proliferación y diferenciación de las células sanguíneas (véase Figura 1) (39).

De esta manera, a continuación se hace una descripción de los aspectos más relevantes de los factores que están implicados directamente en la regulación de células mieloides (principalmente de granulocitos y macrófagos) (Cuadro 1).

Multi CSF o IL-3.

El factor comúnmente referido como Interleucina 3 (IL-3) o multi-CSF ha indicado que juega un papel central en regular la producción de todos los tipos celulares sanguíneos incluyendo, macrófagos, megacariocitos, células cebadas o basófilos (mast), eosinófilos, neutrófilos, eritroblastos y probablemente precursores de células T y B (42).

Propiedades: La IL-3 es un monómero de 23 a 32 Kd para el ratón (43), mientras que la molécula humana es de alrededor de 15 a 17 Kd (44), aproximadamente 40-50 % de su masa es debida a carbohidratos (43). Análisis de IL-3 sintetizada en bacterias ha mostrado que la porción de carbohidratos no es necesaria para su acción *in vitro* o *in vivo* (45).

Gen y ARNm: El gen de IL-3 tiene mayor divergencia evolutiva que otros genes de factores hematopoyéticos; la molécula de ratón es 54 % homóloga a la de rata a nivel de proteína (46), la de ratón y gibón son 29 %, y la de gibón y humana son 93 % (47); debido a la baja homología no existe reactividad cruzada entre especies (humano a ratón y viceversa) (43). Sin embargo, 2 de los 4 residuos de cisteínas de IL-3 de ratón están presentes en la molécula humana, indicando la existencia de un puente disulfuro importante en la estructura proteica (48).

El gen de la IL-3 está localizado en el cromosoma 5 (5q 23-31) para el sistema humano (49), y para el ratón en el cromosoma 11 (11 subbanda B1) (50). El gen posee 4 intrones y en conjunto tiene 2 200 pares de bases (en humano), y el ARNm tiene una longitud de alrededor de 1000 bases, y la proteína madura consta de 133 aa (aminoácidos) en la molécula humana (44), y 140 aa en rata y ratón (51).

Fuente: Normalmente la fuente celular predominante son los linfocitos T activados (52), y en otros tipos celulares normales no linfoides se han detectado actividades tipo IL-3, sin embargo, los datos presentados no son concluyentes ya que dichas actividades no fueron purificadas y los ensayos fueron indirectos (51). En células leucémicas se han detectado altas concentraciones de IL-3, como es el caso de WEHI-3B (mielomonocítica), la cual fue utilizada para la identificación, caracterización y posteriormente clonación de IL-3 (53-55).

CUADRO 1 : Algunas características de los factores estimuladores de colonias.

ACRONICO	FACTOR	FUENTE	PM	FUNCION
IL-3	Interleucina 3 *Multi-Factor Estimulador de Colonia	Cel. T	15,000- 30,000d	Factor de crecimiento hematopoyético multipotencial
G-CSF	Factor Est. de Colonias Granulocíticas	Cel. End. Monocitos	23,000- 32,000d	Estimula el crecimiento de col. de Granulocitos
M-CSF	Factor Est. de Colonias de Macrófagos	Fibroblastos Monocitos Cel. Epit. Sac. Vit. Emb.	45,000- 90,000d	Estimula la formación de col. hacia macrófagos
GM-CSF	Factor Est. de Colonias Granulocíticas y macrofágicas *Inductor de Granulocitos y Macrófagos *Actividad Est. de Col. Granulocítica y Macrofágica	Fibroblastos Cel. End. Macrófagos Cel. T Osteoblastos Cel. Epit. Cel. Músc. liso Cel. Mesénquima	18,000- 30,000d	Estimula precursores hematopoyéticos hacia la prol. y formación de Col. oscuras "in vitro"

* Nombres alternativos.

PM: Peso Molecular en daltones (d).

Elaborado de referencias 22,23,26,94.

Funciones: En cultivos de médula ósea o células del bazo la IL-3 estimula principalmente la formación de colonias típicas de granulocitos y macrófagos. Sin embargo, una pequeña proporción de las colonias formadas son de células mast (basófilos), eosinófilos, megacariocitos y células eritroides (principalmente precursores). Por lo tanto se ha inferido que la IL-3 tiene un amplio rango de células responsivas, lo cual incluye a precursores multipotenciales (56,57). Normalmente las células tallo primitivas permanecen en un estado no proliferante y no son dependientes de IL-3 para su sobrevivencia (58). Sin embargo, en el punto en el cual las células responden a IL-3, estas células parecen ser dependientes de IL-3 para su sobrevivencia (53). Estudios *in vitro* utilizando condiciones libres de suero han demostrado que la eficiencia con la que soporta la diferenciación de colonias hematopoyéticas es mucho menor de la que se presume (59), por lo tanto son necesarios más análisis para esclarecer el papel de IL-3 en la diferenciación.

Receptores y señal de transducción: Los receptores de IL-3 están presentes en progenitores hematopoyéticos y ciertas leucemias mieloides. El receptor es un dímero (cadena α y β) en células humanas, la cadena β participa con la cadena α de IL-3, y con la cadena α de los receptores para GM-CSF e IL-5. En células de ratón el receptor tiene sólo una cadena β la cual es similar con receptores de GM-CSF e IL-5 (44). La cadena α está definida como de baja afinidad, y la interacción de la cadena α y β como de alta afinidad (60). Con respecto a la densidad existen pocos datos en células normales, probablemente posean en promedio alrededor de 1000 receptores o menos (61). El peso molecular es de 110-130 (70 Kd solo la cadena β). El receptor para IL-3 posee 597 aa (en humano) y es regulado negativamente por su propia molécula (44). Estos receptores al igual que los de CSF's (menos el receptor para M-CSF) pertenecen a la familia de receptores hematopoyéticos o hematopoyetinas (62).

Con respecto a la señal de transducción de IL-3, no existe un consenso general en los eventos intracelulares que se desencadenan, existen algunas evidencias las cuales implican a "Tirosina Cinasa". Sin embargo, la ausencia de un dominio de "Tirosina Cinasa" en la secuencia de aminoácidos del receptor de IL-3 sugiere que dicha activación ocurre como un mecanismo de transducción alternativo (62).

Uso clínico: La utilización de IL-3 *in vivo* funciona como una proteína única entre el sistema inmune y hematopoyético estimulando la generación y la función de células sanguíneas (44). Los datos en humanos son limitados, únicamente se poseen en ratones y en primates no humanos, en ellos se ha observado que incrementa el número de células hematopoyéticas multipotenciales, células progenitoras, células más en piel, bazo, hígado; y basófilos, eosinófilos (45,63), y algunos estudios han revelado que incrementa monocitos y neutrófilos en sangre periférica (64). También estimula megacariocitos y sus precursores, y probablemente en combinación con otras citocinas pueda liberar plaquetas, indicando que la administración *in vivo* en combinación con factores de linaje específico (G-CSF, M-CSF y GM-CSF) puede ser necesario para un efecto estimulador máximo (65). No obstante que en células humanas ha dado poco resultado, la IL-3 puede tener potencial clínico en hematopoyesis, leucemias y en enfermedades infecciosas (44).

GM-CSF.

El Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF) fue uno de los primeros factores de crecimiento hematopoyético en ser descrito, purificado y molecularmente clonado (66-69). El GM-CSF forma parte de un grupo de glicoproteínas denominados Factores Estimuladores de Colonias (CSF); inicialmente definido en ensayos *in vitro* como un factor de crecimiento capaz de soportar el desarrollo clonal de progenitores hematopoyéticos de los linajes granulocito y macrófago. Por lo tanto actúa en regular la producción, maduración y actividad funcional de neutrófilos (granulocitos) y monocito-macrófago (70-73). En su aparente especificidad, el GM-CSF también posee la habilidad de estimular progenitores de eosinófilos y megacariocitos, así como la iniciación proliferativa de progenitores eritroides primitivos y algunas células progenitoras multipotenciales (74-76).

Propiedades: El GM-CSF es una molécula polipeptídica de una simple cadena, su masa molecular predicha a partir de la cadena de DNA es aproximadamente de 14 Kd, pero la molécula glicosilada para ratón y humano está alrededor de 23 Kd (77), aunque se han observado formas de mayor peso lo cual implica glicosilación o variantes de agregación. La presencia o ausencia de glicosilación no afecta la actividad biológica *in vitro* y probablemente decrece la afinidad de GM-CSF a sus receptores (78), pero la presencia de glicosilación está implicada en la estabilidad y solubilidad de la molécula (79). Esta molécula posee dos puentes disulfuro, encontrándose que la primera cisteína enlaza con la tercera y la segunda con la cuarta (80).

El GM-CSF de ratón y humano solo comparten alrededor de un 56 % de la secuencia de aminoácidos, y así el GM-CSF es uno de los factores de crecimiento mielóide menos conservados; debido a la baja identidad no existe actividad cruzada entre especies (humano a ratón y viceversa) (68,69,81).

Gen y ARNm: El gen que codifica esta glicoproteína está localizada en el cromosoma 5 (5 q21-31, es decir brazo largo del cromosoma 5q, de la región 2 a la 3 y de la banda 1 a la 2 de las respectivas regiones) para el sistema humano (82,83), y para el ratón en el cromosoma 11 (sub-banda B1) (84). Está compuesto por 4 exones y 3 intrones que en conjunto hacen que el gen tenga una longitud de 2500 pb (pares de bases). El ARNm tiene una longitud de aproximadamente 780 bases (85), y la proteína madura consta de 124 aa en ratón y 127 aa en el sistema humano (67,69).

Fuente: El GM-CSF es producido por múltiples tipos celulares, incluyendo endotelio, fibroblastos, células estromales de médula ósea, epitelio, macrófagos y linfocitos T y B (67,71,77,86,87). Normalmente la transcripción y síntesis de GM-CSF ocurre en bajas concentraciones y esta citocina no es detectable en el plasma u orina, pero los niveles pueden incrementarse en respuesta a endotóxicas, citocinas (IL-1), antígenos (en el caso de linfocitos T) o agentes inflamatorios (66,77,88). La vida media en el plasma humano es de 1 a 3 horas (89).

Se ha reportado que existen factores que regulan negativamente la producción de GM-CSF, entre ellos tenemos a citocinas, interferones en altas dosis, lactoferrina, transferrina, 1, 25-(OH)₂ vitamina D, prostaglandinas y etanol (90-94).

Funciones: Estudios *in vitro* indican que el GM-CSF estimula la proliferación de células precursoras de granulocitos y macrófagos, la concentración determina la proporción de células en ciclo, y su tiempo en número total y progenie producida (66,67,89). Cuando las concentraciones son incrementadas progresivamente el GM-CSF produce estímulo proliferador efectivo para eosinófilos, megacariocitos, eritrocitos y células progenitoras multipotenciales (72,74,75,95). Su estímulo funcional incluye fagocitosis, citotoxicidad y la síntesis de productos macrofágicos tales como PGE, IFN- γ , TNF, Activador Plasminógeno y otros CSF's (96-98).

El GM-CSF muestra una aditividad o sinergismo con otros factores de crecimiento hematopoyéticos para completar la diferenciación hacia células maduras (99,100). Además tiene un efecto aditivo con multi-CSF o IL-3 en estimular máximamente en número a eosinófilos, eritrocitos y megacariocitos (28,75,99,101,102).

Receptores y señal de transducción : El GM-CSF posee dos tipos de receptores membranales, uno denominado cadena alfa (de baja afinidad) y otro llamado cadena beta o de alta afinidad (62). Sin embargo, por sí mismo sólo existe la cadena alfa, y la unión de esta última con la cadena beta determina la alta afinidad. Estudios con células de médula ósea han demostrado que la cadena beta solo se presenta en ciertas poblaciones y en bajas cantidades; por ejemplo, los granulocitos neutrófilos poseen 2304 sitios por célula de los receptores llamados de alta afinidad, y los monocitos 10 000 sitios por célula de receptores de baja afinidad (103). Por otro lado, se ha reportado que existe competencia por la cadena que determina la alta afinidad (cadena beta), puesto que la IL-3 y la IL-5 poseen una cadena análoga a la cual unen, esto se ha observado principalmente en eosinófilos (104). Con respecto al peso molecular no se ha llegado a un acuerdo, algunos lo determinan alrededor de los 85 Kd (105), otros de 80,100 o 135 Kd (103). Los receptores de GM-CSF están ubicados dentro de la familia de las hematopoyetinas, la cual incluyen los receptores de otras interleucinas y factores de crecimiento hematopoyéticos (62).

Por otra parte, muy poco es conocido acerca de los eventos intracelulares involucrados después de la unión del GM-CSF a su receptor; cuando los progenitores mieloides (macrófagos o neutrófilos) se exponen a GM-CSF incrementan la utilización de glucosa, ATPasa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, liberación de prostaglandina E, ácido araquidónico, productos de lipoxigenasa, síntesis de ARN, síntesis de proteínas nucleares, y expresión de ARNm para *c-myc*, *c-fos* y *c-myb* (94). Recientes estudios de vías de transducción han sugerido que GM-CSF parece no activar calcio fosfolipídico dependiente de Proteína Cinasa C (PKC), flujo de calcio, liberación de inositol trifosfato, o cambio de pH intracelular. Sin embargo, existen otras evidencias en el cual la señal difiere entre poblaciones celulares, mientras que en neutrófilos aumenta la guanilato ciclasa y disminuye el adenilato ciclasa, en macrófagos aumenta esta última (94,105). Por lo tanto, es necesario conocer más acerca de los eventos intracelulares que se desencadenan.

Uso clínico: El aislamiento de ADN recombinante ha permitido por un aparte la biosíntesis de cantidades suficientes de proteína para uso en investigación y tratamiento clínico (89,106). Desde finales de 1985 se decidió iniciar la aplicación de factores de crecimiento hematopoyéticos en el tratamiento de ciertos trastornos hematológicos, entre ellos el que más se ha utilizado es el GM-CSF (106,107).

Actualmente el GM-CSF a tomado el primer lugar, por ser el factor que más se ha utilizado en trastornos hematológicos, como son: Anemia aplásica y congénita, tratamiento postradiación, síndromes mielodisplásicos, SIDA, sarcomas y trasplante de médula ósea (108-112). En un futuro no muy lejano se espera que este factor pueda ser utilizado en la mayoría de las enfermedades hematológicas y quimioterapia contra el cáncer (106,110).

G-CSF.

El Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (G-CSF) fue originalmente descrito en ratón como un factor capaz de generar predominantemente colonias de granulocitos en cultivos semisólidos de progenitores hematopoyéticos (66), y producir diferenciación en células leucémicas mielomonocíticas (WEHI-3B) (113). Durante su caracterización ha recibido varios nombres como CSF- β , pluripoyetina (pCSF) y actualmente G-CSF (114-115).

Propiedades: El G-CSF es una molécula polipeptídica de una simple cadena, su masa molecular es de 19.6 Kd por SDS-PAGE y 32 Kd por filtración en gel; la diferencia de peso es debida principalmente a variantes de glicosilación y métodos de identificación (116,117). Al igual que otros factores expresados en bacterias (recombinantes) el G-CSF no modifica su actividad biológica cuando no está glicosilado (118). Posee dos puentes disulfuro, y a través de ellos estas moléculas estabilizan su estructura y resistencia a varios agentes (algunas proteasas, alta temperatura, solventes desnaturizantes, pH extremo), cuando se rompen los puentes la molécula pierde toda actividad biológica (119).

El G-CSF de ratón y humano comparten alta homología a nivel de proteína, por lo que existe reactividad cruzada entre especies, es decir, la molécula humana tiene actividad biológica en ratón y viceversa, además el efecto no se ve modificado (114).

Gen y ARNm: El gen del G-CSF esta localizado en el cromosoma 17 (17 q21-22) en el sistema humano (120) y en el cromosoma 11 (en la parte media distal) en ratón (121). El gen posee 4 intrones y 5 exones, y en conjunto alrededor de 2500 pb, su ARNm tiene una longitud de 1600 b (116), y la proteína madura consta de 174 aa cuando se purifica del medio condicionado de la línea de células de carcinoma de vejiga 5637 (humana) (115), pero cuando se purifica del medio condicionado de la línea de células de carcinoma escamoso CHU-2 (humana) la proteína consta de 177aa (122). Esta diferencia en longitud probablemente se deba a un mecanismo de empalme alternativo (117).

Fuente: Se ha observado que casi todos los tejidos de ratón cuando se cultivan producen G-CSF, ésta se mantiene por varios días y la producción puede ser inhibida por inhibidores de síntesis proteica (123). Pero entre las células que secretan mayor cantidad de este factor están los monocitos-macrófagos (124), las células endoteliales (125) y fibroblastos (126), quienes pueden ser inducidas a expresar ARNm y/o proteína. Líneas celulares han mostrado que secretan G-CSF, ejemplos son: la línea de células de carcinoma de vejiga 5637 (115), la de células de carcinoma escamoso CHU-2 (122) y la WR19M.1 la cual ha sido recientemente reportada por nuestro grupo (127). Se ha reportado que endotoxinas, TNF e IL-1

han mostrado que ejercen liberación de G-CSF en células endoteliales, fibroblastos y células estromales de médula ósea (125,126,128). La producción de G-CSF puede ser suprimida por PGE₂ (116).

Funciones: La acción primaria de G-CSF es el de estimular la formación de colonias granulocíticas a partir de precursores de médula ósea (113,119,123). Por otra parte, el G-CSF ha demostrado que cuando se utiliza a concentraciones bajas exclusivamente forma colonias pequeñas de granulocitos, pero a medida que se incrementa la concentración puede formar un 10 % de colonias de macrófagos y un 20 % de colonias mixtas (granulocitos y macrófagos) (129). En condiciones libres de suero el G-CSF sólo estimula la formación de granulocitos a cualquier concentración (130). No es muy clara la acción del G-CSF sobre precursores de macrófagos o de otros linajes, lo más probable es que el G-CSF tenga efecto sobre células accesorias para producir otros factores, sin embargo la acción directa o indirecta es importante para considerar la evaluación de G-CSF en animales inyectados o tratamientos clínicos (129).

Receptores y señal de transducción: El receptor de G-CSF se expresa no sólo en células progenitoras sino en neutrófilos maduros (131), y en células no hematopoyéticas tales como células endoteliales, placenta, adenocarcinomas de colon y células pequeñas de carcinomas de pulmón (132-135). Un limitado número de estudios han demostrado que células del linaje neutrofilico tienen una simple clase de sitios de unión (300 a 2000 por célula) (133). Sin embargo, estudios de entrecruzamiento con G-CSF marcado han mostrado que se une a un receptor de 150 Kd, pero en ensayos similares en membranas placentarias se ha observado que esta molécula une a un receptor de 120 Kd sugiriendo una mayor complejidad en su composición (133,136). Los dos tipos de receptores han sido identificados y molecularmente clonados, observándose que ambos son similares en sus dominios extracelulares y transmembranales, pero difieren en longitud en su dominio citoplasmático (137,138). Se ha postulado, por analogía con el receptor de PRL (prolactina), que la forma pequeña funciona en el transporte del ligando y la más larga en la señal de transducción (139). Se ha descubierto un tercer tipo de receptor el cual es liberado, y se ha especulado que esta forma secretada puede jugar un papel importante en la regulación de los niveles de G-CSF en el suero (138).

Poco es conocido acerca del mecanismo de transducción del G-CSF en la señal de proliferación o diferenciación de neutrófilos. El hecho de haber encontrado que en algunas líneas el G-CSF induce proliferación y en otras diferenciación sugiere que este factor estimula la proliferación y la diferenciación bajo diferentes mecanismos de transducción, y tal vez cuando se forma el complejo ligando-receptor éste actúe con una subunidad diferente como sucede con IL-6, ya que ambos receptores son muy parecidos (140,141). Con lo reportado hasta ahora uno de los receptores de G-CSF ha presentado un sitio potencial de fosforilación "Proteína Cinasa C" (PKC) (137).

Uso clínico: La habilidad de G-CSF para modular la producción y estado funcional de neutrófilos es potencialmente muy importante para la medicina clínica en los siguientes aspectos (revisado en referencia 116):

- Aplicación en tratamientos del cáncer.

Principalmente para incrementar cuentas leucocitarias (neutrófilos) en terapias con agentes químicos o radiación a cáncer sólidos o leucemias mieloides.

- Papel en neutropenia severa crónica.

Síndrome de Kostmann's.

Neutropenia cíclica.

Neutropenia idiopática.

- Enfermedades infecciosas (aplicaciones para neutropenia).

En conjunto con otros agentes terapéuticos como antibióticos, antivirales y trasplante de médula ósea.

- Enfermedades infecciosas (aplicaciones no neutropénicas).

Neumonía.

Osteomielitis.

Profilaxis de pacientes con riesgo de infección.

M-CSF.

El Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos (M-CSF) o Factor Estimulador de Colonias de tipo 1 (CSF-1), selectivamente estimula la supervivencia, proliferación y diferenciación de fagocitos mononucleares desde células progenitoras comprometidas en varios estadios de diferenciación (monoblastos, promonocitos y monocitos), hasta el macrófago maduro (142).

Propiedades: El M-CSF es un homodímero, su masa molecular puede variar desde 45 hasta 90 Kd dependiendo de la fuente, del método de preparación y también a estados de glicosilación (143,144). La eliminación de las cadenas de carbohidratos no afecta la actividad biológica, unión a su receptor o el reconocimiento por su anticuerpo (143).

El gen de M-CSF parece no tener mucha divergencia evolutiva por lo que la molécula humana tiene efecto en células de ratón, y la molécula de ratón no tiene efecto en células humanas pero sí en células de rata (145); la homología entre la molécula humana y la de ratón es de 69.5 % a nivel de proteína (146). Se ha determinado que el M-CSF puede ser producido en varias formas algunas poseen 7 residuos de cisteína y otras 10 residuos. Sin embargo, la naturaleza de los puentes disulfuro de esta proteína dimerica no es conocida, y se ha observado que no todas las cisteínas son necesarias para su actividad biológica, solo aquellas que le confieren el estado de dímero (145,147).

Gen y ARNm: El gen de M-CSF está localizado en el cromosoma 5 (Sq 33.1) en el sistema humano (148), y tal vez en el cromosoma 11 en ratón (puesto que la IL-3 y el GM-CSF se ubican en los mismos cromosomas tanto en humano como en ratón) (50). El gen posee 10 exones y 9 intrones, y en conjunto hacen que tenga 21 000 pb (en humano) (147). El ARNm es variable y se han determinado varios tamaños de 4 000, 2 500, 2 200 y 1 600 b. La proteína madura por lo tanto es variable en su longitud de aminoácidos (aa), la mínima es de 150 aa (146).

Fuente: Normalmente los tipos celulares que producen M-CSF son los fibroblastos, células endoteliales, epitelio uterino durante la preñez, monocitos estimulados, células estromales de médula ósea, linfocitos T y B activados (147), así como la línea de tipo fibroblástica L-929 o L-Cell (149,150).

Funciones: El M-CSF humano a indicado que tiene un efecto mínimo en su propio sistema, por lo que la mayoría de los experimentos realizados se han llevado a cabo en células de ratón con la propia molécula humana en donde se ha observado un mayor efecto, y principalmente en células de médula ósea *in vivo* e *in vitro* (145).

El M-CSF es un factor altamente específico que estimula a toda la progenie macrofágica, regula su proliferación, sobrevivencia y diferenciación. En células maduras (macrófagos) es un factor solo de sobrevivencia no lleva a cabo proliferación (142,146). Además, estimula a macrófagos en la producción de citocinas (IL-1, IFN, TNF y CSF's), prostaglandinas, tromboplastina, metabolitos microbicidas derivados del oxígeno y activador plasminógeno (145,147,151).

Recientes estudios han demostrado que el M-CSF tiene un importante papel en el desarrollo placentario. En ratones hembras preñadas, la concentración de M-CSF en la circulación y en tejidos se incrementa hasta 2 veces y esto es asociado con una monocitosis (146). Este incremento es debido a la síntesis de M-CSF por parte del epitelio uterino, y posteriormente por trofoblastos placentarios; parece que los trofoblastos son estimulados a llevar a cabo síntesis de ADN ya que presentan receptores para M-CSF lo que podría representar un estímulo paracrino por parte del epitelio uterino y autocrino por parte de los trofoblastos, lo cual cuando desarrollan dan lugar a tejido extraembrionario como la placenta (144,146).

Receptores y señal de transducción: La interacción de M-CSF con sus células blanco ocurre vía receptores de una sola clase de afinidad (alta afinidad), receptores que selectivamente se expresan en células fagocíticas mononucleares precursoras y maduras, y en trofoblastos (152,153); su densidad varía desde 2 000 a 120 000 sitios por célula y es uno de los receptores que se presenta en mayor cantidad con respecto a otros receptores de CSF's (145). El receptor para M-CSF ha sido el mejor caracterizado de los receptores de factores de crecimiento hematopoyéticos (GM-CSF, IL-3, G-CSF), se sabe que es el producto del proto-oncogen *c-fms*, por lo cual está implicado en la regulación de la proliferación celular (154). Además, se sabe que el gen (proto-oncogen) que lo codifica se ubica en el cromosoma 5 (5 q33.3) en el sistema humano (155), y el receptor de superficie celular tiene una masa molecular de alrededor de 165 Kd (145), y una longitud de 973 aa incluyendo sus 3 dominios extracelular, transmembranal y citoplasmático (156).

El receptor de M-CSF pertenece a la familia de receptores denominados "Tirosina Kinasa" (subclase III), dentro de esta familia también se ubican los receptores para el PDGF y c-kit (157). Se dice que estos receptores tienen actividad de "Tirosina Kinasa" porque pueden auto-fosforilarse en el residuo de tirosina (citoplasmático) cuando se lleva a cabo la unión del ligando (158,159). Cuando el M-CSF se une a su receptor la unión desencadena varios cambios como patrones discretos de fosforilación proteica, vacuolización, alcalinización a través de intercambio Na^+/H^+ , incrementa transporte de hexosas, e induce la activación de una familia de genes de respuesta inmediata tales como el *c-fos*, síntesis proteica y expresión génica en la división celular (60,62).

Uso clínico: Debido a que el M-CSF tiene un efecto pobre en el sistema humano, se han realizado varias conjeturas acerca del posible potencial clínico basado en estudios *in vitro* y observaciones preliminares (revisado en referencia 145).

- Marcador antitumoral: el incremento de M-CSF es común en cáncer endometrial y ovario, y en enfermedades linfo-hematopoyéticas. En algunos momentos las células malignas coexpresan M-CSF y su receptor, y puede llevarse a cabo la posibilidad de control autocrino por M-CSF en el desarrollo de estas enfermedades.
- Adjunto a quimioterapia: acelera la recuperación hematopoyética después de quimioterapia contra ciertos tumores sólidos en compañía de otros CSF's, con ello los pacientes pueden recuperarse de una infección o de altas dosis de quimioterapia.
- Inflamación: Tiene un papel sobresaliente en la respuesta inflamatoria, ya que los niveles de M-CSF se incrementan en exudados inflamatorios, y la liberación de monocinas tales como IL-1, TNF, G-CSF, IFN, enzimas proteolíticas como activador plasminógeno. Por lo tanto, el suministro de M-CSF a estos pacientes puede llevar a cabo una mejor respuesta en cuando a tiempo y efectividad.
- Actividad antitumoral: el M-CSF tiene actividad anti tumoral y citotoxicidad dependiente de anticuerpo *in vitro*, y por lo tanto podría tener esta misma habilidad *in vivo*.

CELULAS FAGOCITICAS.

Nuestro ambiente contiene gran cantidad de agentes tales como: virus, bacterias, hongos y protozoarios que nos agreden de forma continua. Para luchar contra éstos, los organismos superiores como los mamíferos disponen de un sistema eficaz contra casi todo tipo de microorganismos con el fin de evitar su desarrollo y persistencia, para posteriormente facilitar su eliminación. A este sistema se le conoce con el nombre de sistema inmune (18).

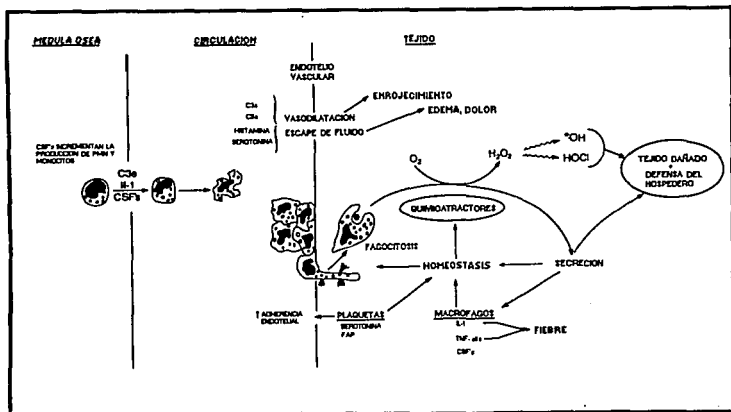
El sistema inmunológico es muy complejo, incluye la participación de una multitud de células sanguíneas leucocitarias y factores solubles, que en conjunto forman un sentido biológico defensivo (18, 160).

En general y de una forma simple, el sistema defensivo está compuesto de tres tipos de respuesta: la inflamatoria, la natural y la específica (adaptativa). Las dos primeras forman parte de una defensa innata o inespecífica; y la adaptativa por un reconocimiento específico del antígeno (agente extraño) y la posterior presencia de memoria contra ese agente (160). En este apartado nos ocuparemos sólo de la primera y más simple.

Es comúnmente aceptado que cuando un agente agresor penetra en un organismo, éste pone en marcha una respuesta de tipo inflamatorio, concatenada con una respuesta natural innata. En esta respuesta están implicadas células denominadas fagocíticas que tienen la capacidad de distinguir lo propio de lo extraño, éstas células son los fagocitos mononucleares (monocito-macrófago) y toda la serie granulocítica polimorfonuclear (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) (17,18,160).

La fagocitosis es un proceso general durante la respuesta inflamatoria, en donde las células fagocíticas engloban y eliminan a microorganismos patógenos (Figura 2). Los fagocitos mononucleares y polimorfonucleares se pueden encontrar en sangre o inactivados en tejidos (macrófagos), estas células tienen la capacidad de acumularse en un sitio inflamatorio atraídos por factores quimioatrayentes, por ejemplo por

Figura 2: Eventos de un proceso inflamatorio. Cuando se infiltra un agente extraño o antígeno, este puede desencadenar una respuesta celular iniciada principalmente por los neutrófilos y el sistema fagocítico mononuclear (macrófagos). Las células al salir de la médula ósea pueden ser atraídas a un sitio de afección, debido a factores secretados por células endoteliales (vasculares) y bacterias, cuando las células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) reconocen el sitio, transpan el endotelio vascular hacia el tejido infectado. En el tejido, las células defensivas reconocen, fagocitan y eliminan al antígeno. La respuesta defensiva puede ir acompañada de una irritación (enrojecimiento), edema, dolor y hasta fiebre (dependiendo de la magnitud de infección). En toda la fase del proceso inflamatorio están relacionados factores solubles que funcionan como agentes quimioatrayentes y factores inmunoreguladores (Interleucinas y CSF's; vease Cuadro 1). TNF-alfa, Factor de Necrosis Tumoral -alfa. PAF, Factor Activador de Plaquetas (Tomada de referencia 17).



proteínas del complemento, y más específicamente Interleucina 8 (IL-8) para neutrófilos polimorfonucleares (PMN) (161).

Los fagocitos mononucleares se originan en la médula ósea a partir de un precursor literalmente conocido como "Unidad Formadora de Colonia de Granulocitos y Macrófagos" o CFU-GM (del inglés, Colony Forming Unit-Granulocyte Macrophage) (véase Figura 1 y 3), posteriormente presenta 4 estadios hasta la forma terminal de macrófago (20,162). El primer estadio morfológicamente reconocible en la médula ósea es el de monoblasto, es una célula de gran tamaño con núcleo redondo a ovoide, citoplasma abundante sin gránulos y bastantes nucleolos. El promonocito, posee abundante citoplasma con gránulos finos y núcleo irregular. El monocito presenta varios gránulos en su citoplasma, el cual ha perdido volumen con respecto al estadio anterior, su núcleo es irregular pero frecuentemente en forma de riñón o frijol, y es el primer tipo de la serie el cual puede ser observado en sangre periférica (Figura 3) (162,163).

La forma final del fagocito mononuclear es el de macrófago, la transición de monocito a macrófago esta determinada por un agrandamiento citoplasmático, núcleo pequeño de redondo a oval normalmente en la periferia, incremento en retículo endoplásmico, lisosomas y mitocondrias (164). Además, el monocito presente en sangre al abandonar el sistema vascular y alojarse en tejido es para la mayoría la transición de monocito a macrófago, éstos pueden pasar durante mucho tiempo como células residentes inactivas hasta que reciban un estímulo. Por otro lado, el macrófago presenta características citoquímicas y morfológicas particulares dependiendo del tejido de residencia (165).

Los macrófagos son células multifuncionales, no sólo fagocitan a microorganismos, también llevan a cabo la eliminación de restos celulares, células senescentes, proteínas desnaturalizadas, complejos antígeno-anticuerpo, sustancias tóxicas y un gran número de partículas como factores coagulados (166). Además se sabe que tiene un gran potencial de secreción de citocinas (monocinas), las cuales están relacionadas en la sobrevivencia y funcionalidad de células fagocíticas implicadas en un sitio de inflamación frente a un agente extraño (167,168).

Por su parte, los granulocitos neutrófilos presentan 6 estadios morfológicamente reconocibles en médula ósea; en orden de maduración son los siguientes: mieloblasto, promielocito, mielocito, metamielocito, banda o cayado y segmentado o PMN (Figura 4) (162,164,169).

El mieloblasto, presenta un núcleo grande redondo a oval y ocupa la mayor parte de citoplasma, y no presenta gránulos primarios, además poseen de 2 o más nucleolos. El promielocito es reconocido por la presencia de gránulos primarios grandes llamados azurófilos. El estado de mielocito esta marcado por la acumulación de gránulos secundarios o específicos y condensación del núcleo. Por su parte el metamielocito, es morfológicamente reconocible por presentar una indentación en forma de frijol (en humano) o una perforación central (en ratón), esta célula es mucho más pequeña que el estado anterior. Por su parte, el estadio de banda presenta un cambio pronunciado en el núcleo, y normalmente es observado como un anillo (en ratones) o en forma de aro abierto (en humano), este tipo celular puede ser observado ya en sangre periférica. El último estadio llamado segmentado o polimorfonuclear (polimorfos), es fácilmente reconocible por su segmentación

Figura 3: Secuencia del desarrollo de células que corresponden al sistema fagocítico mononuclear. Además, se presentan nombres dados para el macrófago dependiendo del tejido de residencia. CFU-GM: Unidad Formadora de Colonia de Granulocitos y Macrófagos (del inglés, Colony Forming Unit - Granulocyte Macrophage) (Tomada de referencia 162).

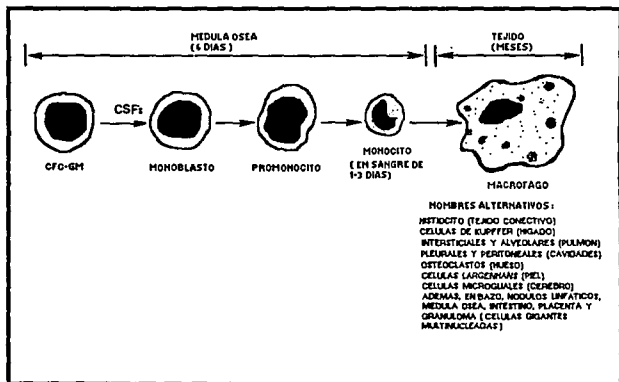
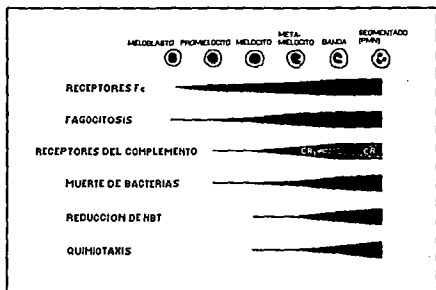


Figura 4: Representación esquemática de la expresión relativa de funciones del granulocito neutrófilo con respecto a sus estados de maduración. Expresión de receptores Fc (FcR) y del complemento (CR), para el reconocimiento más específico de antígenos. Quimiotaxis, capacidad de migración en respuesta a agentes atrayentes. NTB (azul de tetrazolium), como una medida de la actividad de estallido respiratorio en la defensa y destrucción de agentes patógenos (Tomada de referencia 169) .



nuclear presentando de 3 a 5 lóbulos, y es la forma madura funcionalmente (162,164).

Los PMN pueden vagar azarosamente a través del torrente sanguíneo y tejidos, es una célula con una vida muy corta (alrededor de 24 hrs) y su población esta continuamente recambiando, produciéndose normalmente 10^{11} , y hasta 10^{12} de neutrófilos diariamente en presencia de una infección (17,164).

El elemento celular inicial en una respuesta inflamatoria es el PMN, el cual es atraído a ciertas áreas específicas por componentes quimioatrayentes, tales como: LTB_4 (Leucotrienos de tipo B₄), FMLP (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina, el cual es secretado por bacterias) y proteínas del complemento como C5a (de las mejores proteínas atrayentes del complemento) (17,164,170); *in vitro* el GM-CSF (17), y la proteína activadora de acción atrayente de neutrófilos de tipo 1 (NAP-1) llamada actualmente IL-8 (161).

Cuando el PMN encuentra el sitio de afección, el primer paso es la migración hacia el tejido, para ello tiene que atravesar el endotelio vascular llevándose acabo el fenómeno llamado de diapedesis (marginación, adherencia y salida hacia el tejido) (164), este proceso de adherencia se inicia con la interacción de moléculas como: las del complejo de adhesión CD11/CD18 (integrinas β_2) en PMN, las de adhesión leucocitaria endotelial que incluye ICAM-1 e ICAM-2 (moléculas de adhesión intercelular de tipo 1 y 2), y selectina-E (ELAM-1) (172).

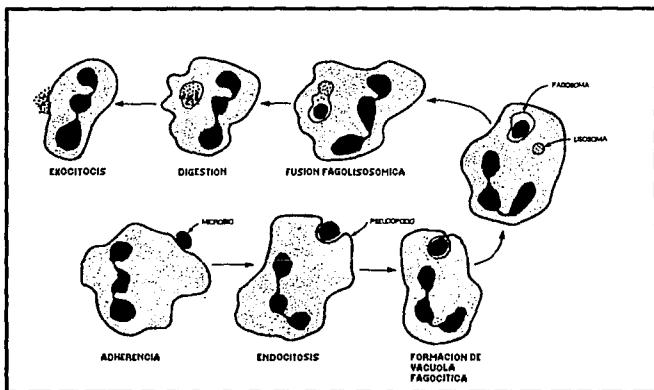
En el espacio extravascularmente el PMN se orienta por estímulos atractores como interleucinas (IL-8 principalmente) y productos bacterianos (FMLP) (161,170). Cuando llega al sitio de inflamación ingiere y fagocita, primeramente rodeando a la partícula extraña (por ejemplo bacterias) por pseudópodos emitidos por su membrana citoplasmática. Al tocarse los pseudópodos se forma el fagosoma, el cual se fusiona con gránulos lisosómicos secundarios (específicos) vertiendo su contenido enzimático (Figura 5)(173). La fusión es comúnmente llamada degranulación (17,18,164).

El reconocimiento de la partícula o agente patógeno se ve favorecido si estas son opsonizadas con anticuerpos como inmunoglobulinas G (IgG), proteínas del complemento C3b o C3b inactivada (C3bi). Los anticuerpos son reconocidos vía receptores Fc, y las proteínas del complemento por receptores específicos de tipo 1 y 3 por parte de los PMN (17,18,160,164).

Después de la gran migración de los neutrófilos PMN al sitio de inflamación, gradualmente se congregan en el mismo sitio los monocitos-macrófagos, cosinófilos, basófilos y linfocitos, y normalmente la población de los neutrófilos son desplazados, ya que mueren durante el ataque y posteriormente son fagocitados por los macrófagos (166).

Por lo tanto, hasta hace poco tiempo, el PMN había sido solo considerado como una célula implicada en una respuesta inflamatoria vía la fagocitosis. Recientes trabajos han evidenciado que esta célula tiene la capacidad de liberar enzimas y componentes citotóxicos preformados (174). Hoy en día, algunos investigadores son de la idea de que el PMN tiene la capacidad no tan sólo de liberar proteínas, sino de producirlas en el momento de inducción, de esta manera se ha llegado a pensar que el PMN puede contribuir en la respuesta inmune vía la síntesis y liberación de citocinas inmunoregulatoras (175).

Figura 5: Fases durante el proceso de fagocitosis. Cuando el neutrófilo polimorfonuclear (PMN) reconoce una partícula como extraña (por ejemplo bacterias), éste la engloba e internaliza (endocitosis) formando una vacuola digestiva (fagosoma), ésta última se fusiona en el citoplasma con lisosomas o gránulos secundarios (específicos) formándose una sola vacuola denominada fagolisosoma, entonces el microbio es digerido, degradado y los productos secundarios liberados (exocitosis) (Tomada de referencia 173).



Inicialmente se tenía la noción de que el PMN era incapaz de síntesis proteica, debido principalmente a la escasez de ribosomas y de retículo endoplásmico (liso o rugoso), además de que cuando ingiere y fagocita partículas se relaciona con una inhibición de la síntesis de ARN y proteína (176).

Sin embargo, ahora es claro que los PMN retienen la capacidad de sintetizar un restringido pero importante rango de ARN y proteínas. De los pocos trabajos realizados han evidenciado que tienen la capacidad de producir y liberar algunas proteínas relevantes, las cuales incluyen actina, receptores del complemento de tipo 1 y 3 (CR₁ y CR₃), receptores Fc (FcR) y activador plasminógeno (177).

Estudios inmunocitoquímicos han mostrado que aproximadamente 80% de los PMN sin estimular tienen la capacidad de transcribir CR₁ y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo 1 (MHC-1), mientras que el 95% de ésta población pueden expresar éstas proteínas en la membrana. Además, cuando los PMN son estimulados con GM-CSF se induce de 4 a 5 veces la síntesis de estas proteínas (178).

Por otro lado, se ha trabajado en los últimos años en el contexto de la posible producción de citocinas por el PMN, pero debido a la falta de metodología para obtener poblaciones puras algunos investigadores se han quedado solo a un nivel de sugerencias, teniéndose que el principal contaminante es el macrófago, y como se sabe este último tiene una amplia gama de producción de citocinas (167,175).

La evidencia más contundente en la producción de citocina se ha encontrado en IL-1 (α y β) y TNF- α , éstas son transcritas y liberadas cuando se estimula a PMN con LPS (lipopolisacárido), IL-1 α o GM-CSF (179,180).

Además, en un trabajo realizado con PMN de sangre periférica ha evidenciado que éstos pueden producir G-CSF y M-CSF cuando son estimulados con GM-CSF en ensayos *in vitro* (180). Estos CSF's potencian o incrementan la respuesta de las células maduras, principalmente de PMN y macrófagos en un sitio de infección e inflamación, haciendo que la respuesta sea más efectiva (168).

Debido a las anteriores evidencias, nosotros pensamos que por ser el PMN el primer tipo celular en responder a un agente extraño y migrar masivamente hacia un sitio de afección o inflamación, este fagocito podría contener alguna actividad estimuladora de colonia tipo CSF, la cual podría ser secretada en un momento dado frente a un reto inmunológico. Por lo tanto, en el presente trabajo evaluamos la posible presencia de una Actividad Formadora de Colonia (AFC) tipo CSF en PMN de cavidad peritoneal, inducidos con un agente endotóxico.

OBJETIVOS GENERALES:

- 1) Estudiar el efecto del Lisado de Granulocitos de cavidad peritoneal sobre células precursoras de médula ósea de ratón en la formación de colonias.**
- 2) Identificar el factor o los factores responsables de la actividad estimuladora de colonias proveniente del lisado de granulocitos.**

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.1) Obtener células granulocíticas (polimorfonucleares) de cavidad peritoneal de ratón.**
 - 1.2) Evaluar la Actividad Formadora de Colonia (AFC) del lisado de granulocitos sobre células de médula ósea.**
 - 1.3) Comparar la morfología celular de la Actividad Formadora de Colonia del Lisado de Granulocitos con respecto a otros factores de crecimiento hematopoyéticos (GM-CSF, G-CSF, M-CSF e IL-3) sobre células de médula ósea de ratón.**
-
- 2.1) Identificar la presencia de la Actividad Formadora de Colonia del Lisado de Granulocitos mediante ensayos de ELISA.**
 - 2.2) Determinar si la Actividad Formadora de Colonia presente en el Lisado de Granulocitos es el resultado del estímulo de un factor en particular o de la combinación de varios factores mediante la utilización de anticuerpos específicos.**

MATERIAL Y METODOS

Material biológico : Para este trabajo se utilizaron ratones de 6-8 semanas de edad, de ambos sexos, provenientes de la cepa CD-1 como donadores de células mieloides y células de cavidad peritoneal. Por otro lado, también se utilizó células de la línea de tipo fibroblástica de ratón (fibrosarcoma) L-929.

Condiciones de cultivo: Se trabajó en una campana de cultivo, previamente limpiada con Iodisan diluido (Elequim., Mex) o con etanol al 70 %, y se esterilizó durante 20 minutos con luz ultravioleta, así mismo el material de cristalería utilizado se esterilizó previamente en autoclave (181).

Para el cultivo *in vitro* de las células de cavidad peritoneal y de las células L-929 se utilizaron cajas Petri de vidrio (Pyrex, USA) y de plástico (Costar, USA) de 60 x 15 mm, y para el cultivo de células de médula ósea se utilizaron placas de plástico (Costar, USA) de 24 pocitos; las células sembradas se mantuvieron en una incubadora a una temperatura de 37 °C y una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y humedad saturante. Para el cultivo de células de cavidad peritoneal y de médula ósea se utilizó el Medio Esencial Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (MEMD, apéndice A) (Sigma, USA). Las células de médula ósea se cultivaron con MEMD suplementado con 20 % de suero caballo (SC) (Sigma, USA), y las células de cavidad peritoneal únicamente con MEMD. Para las células de la línea L-929 se utilizó el Medio RPMI-1640 (Gibco, USA) (apéndice B) suplementado con 10 % de Suero Fetal de Bovino (SFB) (Hyclon, USA); el SC y SFB se desactivaron previamente antes de su uso a 56 °C por 30 minutos, y se almacenaron a una temperatura de 4 °C hasta su uso.

Obtención de células de médula ósea : Se sacrificaron los ratones por descervicación, posteriormente se extrajeron los fémures, los cuales se colocaron en una caja Petri con MEMD. Al fémur se le perforó ambas epifisis y con la ayuda de una jeringa de 1 ml se hizo fluir MEMD de un extremo a otro para extraer todas las células de médula ósea, colocándose la suspensión en tubos cónicos para posteriormente centrifugar y lavar con MEMD a 500 gravedades por 5 minutos (181). Para obtener células blancas (leucocitos), se utilizó un gradiente de densidades como es el Ficoll Hystopaque (Sigma, USA), colocándose 1 ml de éste y enseguida 1.5 ml de MEMD conteniendo las células ya lavadas, y centrifugándose a 500 gravedades durante 20 minutos (182). La cantidad de células obtenidas se determinó por conteo con la ayuda de un hemocitómetro (American Optical, USA). Para cada experimento se utilizó un lote de células provenientes de un animal.

Obtención de granulocitos de cavidad peritoneal: Los animales se inyectaron intraperitonealmente 17 horas antes de ser sacrificados (por descervicación) con Caseinato de Sodio al 10 %. Para la obtención de células no adherentes (granulocitos neutrófilos o polimorfonucleares), primeramente se realizaron lavados peritoneales

con Solución Amortiguadora de Fosfatos (SAF o PBS, Apéndice C) con una jeringa de 10 ml, los lavados se vertieron en tubos cónicos de 50 ml y se centrifugaron a 500 gravedades por 5 minutos (183,184). Posteriormente se desechó el sobrenadante y se resuspendió en MEMD, se contaron las células obtenidas y se sembraron en cajas Petri de vidrio o de plástico de 60 x 15 mm sin suero durante 90 minutos a una densidad celular de 1 a 2 millones por ml. Después de este tiempo, las células en suspensión se colectaron y centrifugaron a 500 gravedades por 5 minutos; las células así obtenidas fueron colocadas en viales de criopreservación (Nalgene, USA) de 2 ml a una densidad de 20×10^6 de células por ml en MEMD suplementado con 10 % de SFB. Los viales fueron sumergidos en nitrógeno líquido a 2 tiempos durante 1 minuto para lisar las células, y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Obtención de macrófagos de cavidad peritoneal: La técnica es similar a la de los granulocitos, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con Caseinato de Sodio al 10 %, y los animales se sacrificaron 17 horas después. La población obtenida de cavidad peritoneal se incubó por un periodo de 6-8 horas dentro de cajas Petri de vidrio o de plástico en MEMD sin suero. Los macrófagos se obtuvieron despegando la capa adherente del sustrato de cultivo (plástico o vidrio) utilizando EDTA al 0.1 M en RPMI-1640 durante 3-5 minutos de incubación, se recogieron las células despegadas, se centrifugaron y se lavaron con MEMD, y se colocaron en viales de criopreservación a una densidad de 20×10^6 cel/ml suplementados con 10 % de SFB (184). Los viales se sumergieron 2 veces en nitrógeno líquido durante 1 minuto, las células así lisadas se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Obtención de linfocitos de nódulos linfáticos: Se revisó la cavidad peritoneal de los ratones tratados (Caseinato de Sodio) exactamente en la periferia, y se identificaron los nódulos como pequeños sacos de 2-5 mm (también encontramos nódulos en la región torácica) (3,16). Los nódulos se colocaron en cajas Petri de vidrio o plástico de 60 x 15 mm conteniendo MEMD. Con tijeras de disección puntiagudas se cortaron los nódulos en fragmentos más pequeños realizando sacudidas en el medio para favorecer la salida de los linfocitos almacenados, se colectó el medio y se centrifuga a 500 gravedades por 5 minutos, el botón celular se resuspendió en MEMD y las células fueron contadas; las células así obtenidas se colocan en viales de criopreservación de 2 ml a una densidad de 20×10^6 cel/ml suplementados con 10 % de SFB. Los viales se sumergieron 2 veces en nitrógeno líquido por un periodo de 1 minuto, y el lisado celular se almacenó a -70°C hasta su uso.

Medios condicionados de L-929 : Se obtuvieron colectando el medio de cultivo de células fibroblásticas confluentes de la línea L-929 (Fibrosarcoma) a los 4 o 5 días de cultivo, y guardándolos a una temperatura de 4°C hasta el momento de su uso.

Ensayos de CSF : Para la inducción a la formación de colonias se utilizó la técnica de doble capa en agar (36,37). Para la primera capa se preparó agar (Bactoagar, DIFCO USA) al 0.6 % en agua pentadestilada, esterilizándose antes de su uso en autoclave durante 20 minutos, y manteniéndose a una temperatura de 56°C momentos antes de su uso. El agar una vez preparado se mezcló con 20 % de

MEMD, 20 % de Suero de Caballo, 20 % del inductor de colonias, ya sea Medio Condicionado, Lisado de Granulocitos (10 % de Lisado más 10 % de MEMD) o la cantidad de CSF recombinante a probar (CSF en MEMD), y finalmente 20 % de MEMD doblemente concentrado, para posteriormente colocar el volumen final en placa de 24 pozos. Antes de agregar la segunda capa se esperó alrededor de 10-20 minutos para facilitar la gelificación. La segunda capa se preparó utilizando agar al 0.3 % en agua pentadestilada. Para colocar la segunda capa se mezclaron 10 % de Suero de Caballo, 50 % de MEMD (conteniendo aproximadamente 100,000 células mieloides), 20 % de MEMD doblemente concentrado y 20 % de agar. Después de colocar la segunda capa se esperó 10 minutos para que se gelificara; para posteriormente incubar por un periodo de 7 días. Se consideró una colonia cuando ésta presentaba más de 20 células y grupos cuando existía menor número (no fueron contabilizados), las cuales se evaluaron con la ayuda de microscopio invertido (American Optical, USA).

Identificación de tipos de colonias: Para evaluar las colonias obtenidas en la técnica de bicapa de agar se realizó mediante la técnica de Moezzi (185) con ciertas modificaciones. Con una navaja se cortó la capa superior por las paredes del recipiente, y con papel Watman del No. 2 (poro mediano) se cubrió para posteriormente mover cuidadosamente el papel en el momento que se humedeció completamente. Las colonias adheridas se transfirieron colocando el papel filtro sobre un portaobjetos por una hora o más a temperatura ambiente. Después el papel filtro se retiró cuidadosamente, antes de teñir las colonias.

Para evaluar las colonias obtenidas utilizamos una técnica de tinción específica, la cual identifica esterasas (enzimas hidrolíticas) del linaje monocito-macrófago. La técnica es llamada Esterasas Inespecíficas, utilizando Alfa-Naftil Acetato como sustrato enzimático (Apéndice D) (186,187). La identificación positiva de la tinción fue observada como gránulos color marrón en el citoplasma de monocitos-macrófagos. Para cada tinción se incluyó Hematoxilina de Meyer's, la cual fue utilizada para contrateñir, en este caso, los núcleos de cada tipo celular (granulocitos y monocitos).

Por otro lado, también se utilizó Hemocolorante rápido (Sigma, USA) en la identificación morfológica de las poblaciones de cavidad peritoneal (granulocitos y macrófagos), nódulos linfáticos (linfocitos), así como de las colonias obtenidas en la técnica de bicapa de agar. El reconocimiento pone en evidencia la forma del núcleo y la granulación citoplasmática.

La identificación morfológica producida tanto por la Hematoxilina como por el Hemocolorante, fue determinada bajo ciertos lineamientos, cuando las células presentaban núcleo en forma de anillo (banda) o alrededor de 3 a 4 segmentos (polimorfonucleares) se reportaron como granulocitos, y cuando las células presentaban un núcleo riniforme, citoplasma abundante y vacuolado como monocito-macrófago (dependiendo del estado de madurez) (3,162,187).

Concentración de CSF's : para este trabajo se emplearon las formas recombinantes de GM-CSF de ratón, G-CSF de humano, M-CSF de humano e Interlucina 3 ó Multi-CSF de ratón; las actividades específicas fueron de 1×10^6 U/mg

(Genzyme, USA), 10×10^6 U/mg (Immunex, USA), 2×10^5 U/mg (Genzyme, USA) y 1×10^6 U/mg (Genzyme, USA), respectivamente. Las diluciones de los factores se realizaron con Albúmina bovina al 0.1 % en SAF o MEMD; las concentraciones utilizadas fueron de 10 ng/ml de M-CSF, 20 ng/ml de GM-CSF, 100 ng/ml de GM-CSF y 1000 ng/ml de IL-3 para cada ensayo

Ensayos de neutralización : para identificar la presencia de M-CSF en el lisado de gánulocitos se determinó a través de ensayos de ELISA (Apéndice E) (188), utilizando anticuerpos anti M-CSF producido en conejo contra la molécula humana (Genzyme, USA), y un anticuerpo conjugado o secundario anti molécula de conejo el cual está acoplado a una enzima para identificar a su vez el anti M-CSF y producir coloración. Esta última puede ser leída en espectrofotómetro o lector de ELISA a 490 nm. Para este ensayo se utilizó 100 ng de M-CSF y diluciones de 1:500 y 1:1000 de anti M-CSF.

Para abatir la Actividad Formadora de Colonias del Lisado de Granulocitos (LG), se realizaron bioensayos cultivando células de médula ósea a través de la técnica de bicapa de agar, introduciendo el LG en presencia o ausencia de anti M-CSF (policlonal) y anti GM-CSF (monoclonal) (Immunex, USA). Utilizamos 15 μ g de anti M-CSF para neutralizar 10 ng de M-CSF y 20 μ g de anti GM-CSF para neutralizar 20 ng de GM-CSF.

Varios : los ensayos realizados se hicieron por duplicado y como mínimo dos veces en experimentos independientes. Los resultados mostrados son el promedio de los experimentos en cada uno de su tipo. Para cada ensayo, siempre fue añadido un control negativo (sin inductor).

RESULTADOS

Es conocido que en la respuesta inmune numerosas citocinas son liberadas para estimular a los tipos celulares involucrados en la respuesta celular y humoral. Dentro de estas citocinas tenemos a los factores de crecimiento hematopoyéticos, comúnmente llamados Factores Estimuladores de Colonia (CSF's) (168). Los CSF's potencian o incrementan la respuesta de las células maduras, principalmente aquellas del linaje mielóide (neutrófilos y macrófagos) en el sitio de infección e inflamación, haciendo que la respuesta sea más efectiva. Debido a que es poco conocido que el neutrófilo polimorfonuclear produzca o secrete algún CSF, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar si el granulocito bajo un estímulo endotóxico produce Factores Estimuladores de Colonia.

OBTENCION DE GRANULOCITOS DE CAVIDAD PERITONEAL .

Para llevar a cabo el desarrollo del presente trabajo fue necesario obtener una población celular rica en granulocitos. Como es conocido que mediante un reto endotóxico se puede inducir una gran aglomeración de granulocitos en la cavidad peritoneal de ratón, se procedió a determinar el tiempo post-endotóxico en el cual se obtenía una población más rica en células de éste tipo. Para ello se extrajeron células de la cavidad peritoneal al inicio y después de 17, 24, 48, 72 y 96 hrs del reto endotóxico. Se evaluó además la presencia de otros tipos celulares que también son inducidos a la cavidad peritoneal por éste procedimiento, como son los macrófagos y los linfocitos. Se observó que después de 17 horas del reto endotóxico se obtuvo el mayor porcentaje de células granulocíticas respecto a los otros tipos celulares (72%). Es interesante mencionar que mientras la población de granulocitos fue la menor en la cavidad peritoneal de ratones no estimulados y la de macrófagos la mayor (Tabla 1), a las 17 hrs. post-endotoxina el porcentaje de estas poblaciones se revierte, y no es sino hasta las 96 hrs cuando nuevamente regresan a la normalidad. Aunque la población de linfocitos se mantiene baja durante las primeras 48 hrs, a las 72 ya supera a la de los granulocitos.

Con la finalidad de enriquecer aún más la población de granulocitos obtenida 17 hrs después de un reto endotóxico se procedió a separarlas de las células adherentes que por lo general son las de tipo macrófágico. En efecto, después de eliminar a las células adherentes al sustrato de cultivo nuestra población de granulocitos se vio fuertemente enriquecida (87%), mientras que la de macrófagos disminuyó importantemente (7%, Tabla 2). Sin embargo, es conveniente mencionar que al analizar el tipo de células existentes en la población adherente encontramos un porcentaje similar de granulocitos y de macrófagos, lo cual por un lado nos indica que los polimorfonucleados (forma madura del linaje granulocítico) que normalmente no son células adherentes en cultivo se encuentran fuertemente activados y por otro que la población de granulocitos no adherente carece de las células más activadas (Tabla 2).

TABLA 1: MORFOLOGIA DE LOS TIPOS CELULARES EXTRAIDOS DE CAVIDAD PERITONEAL Y NODULOS LINFATICOS DE RATONES TRATADOS CON CASEINATO DE SODIO A DIFERENTES TIEMPOS.

TIEMPO		TIPOS CELULARES (%)		
		PMN	MON-MO	LINF
0 Hr	Cav. Per.	05	85	10
17 Hr	Cav. Per.	72	25	03
24 Hr	Cav. Per.	56	37	07
48 Hr	Cav. Per.	35	53	12
72 Hr	Cav. Per.	19	48	23
96 Hr	Cav. Per.	10	86	04
24 Hr	Nód. Linf.	00	00	100
48 Hr	Nód. Linf.	00	00	100
72 Hr	Nód. Linf.	00	00	100
96 Hr	Nód. Linf.	00	01	99

Cav. Per. : Cavidad Peritoneal.

Nod. Linf.: Módulos Linfáticos.

PMN : Granulocitos Neutrófilos (Polimorfonucleares).

Mon-Mo : Monocito-Macrófago.

linf : Linfocitos.

Nota: no fueron purificados por adherencia.

TABLA 2 : MORFOLOGIA DE LAS CELULAS ADHERENTES Y NO ADHERENTES DE CAVIDAD PERITONEAL DE RATON.

PROCESO	TIPOS CELULARES (%)		
	PMN	MON-MO	LINF
Paquete celular total de cavidad peritoneal	72	25	3
Cel. adherentes	48	49	3
Cel. no adherentes	87	7	6

PMN : Polimorfonucleares.

MON-MO : Monocito-Macrófago.

LINF : Linfocitos

Aunque mediante este tipo de estrategia se pudo obtener una población rica en células polimorfonucleadas, intentamos por otra técnica de separación celular específica para granulocitos y así aumentar la pureza de nuestra muestra. Para ello se realizaron algunos ensayos usando un gradiente de densidad como es el Polimorphprep (Nycomed, Noruega), el cual se basa en un medio de densidad semejante a la del polimorfonuclear para separarlo en una interfase. Sin embargo, la población obtenida no se purificó aún más como se esperaba (88 % como máximo, dato no mostrado), y por el contrario se perdían gran cantidad de células. En consecuencia decidimos utilizar para nuestro trabajo la población de granulocitos desprovista de células adherentes.

EVIDENCIAS DE QUE EL GRANULOCITO ES CAPAZ DE PRODUCIR UNA ACTIVIDAD FORMADORA DE COLONIA.

Una vez obtenida una población celular rica en granulocitos procedimos a evaluar si ésta contenía la propiedad de inducir a la formación de colonias. Para ello se procedió a lisar paquetes celulares con diferentes cantidades, 10×10^6 , 20×10^6 y 40×10^6 de células por mililitro, y a utilizar los lisados en el ensayo de formación de colonias, además un inductor positivo en la generación de colonias (GM-CSF). Obtuvimos en efecto que el lisado tenía una mayor Actividad Formadora de Colonias (AFC) a una densidad celular de 20×10^6 cel/ml (64 colonias, Tabla 3). Sin embargo, cuando utilizamos lisados con mayor número de células observamos una disminución en la inducción de colonias (20 colonias), dicha disminución puede ser el resultado de productos tóxicos liberados por la lisis. Por lo tanto, utilizamos lisados con 20×10^6 cel/ml para los posteriores experimentos. Asimismo, con la finalidad de comparar esta actividad inductora con aquellas conocidas se cultivaron en las mismas condiciones células de médula ósea en presencia de los recombinantes GM-CSF, M-CSF y el Medio Condicionado de una línea celular (L-929) rico en M-CSF natural. Nuestros resultados indican que el tipo de colonias (macrófagos) que induce el lisado de células no adherentes de 17 hrs (granulocitos) es similar al obtenido en los experimentos con M-CSF y Medio Condicionado de L-929 (Tabla 4), mientras que el GM-CSF produjo colonias de granulocitos y macrófagos por separado.

Por otro lado, con la finalidad de evaluar si esta actividad inductora provenía de los granulocitos o de los demás tipos celulares presentes en la población del cual se obtuvo el lisado, se procedió a determinar la capacidad inductora de colonias de los lisados de las poblaciones celulares obtenidos a las 24, 48, 72 y 96 hrs post-endotoxina. Este experimento se basaba en la racionalidad de que si los macrófagos o los linfocitos presentes en las poblaciones celulares eran los responsables de la AFC obtenida a las 17 hrs post-endotoxina, entonces tendríamos una gran actividad inductora a las 96 hrs post-endotoxina en donde los macrófagos son las células mayoritarias, o a las 72 hrs en donde los linfocitos tienen una mayor presencia que los granulocitos (Tabla 1). Nuestros resultados no mostraron actividad alguna por estos dos últimos lisados (Tabla 4), lo cual nos indica (aunque indirectamente) que es muy probable que sean los granulocitos los causantes de la actividad inductora de macrófagos. Sin embargo, para complementar estos resultados ya que se conoce que

TABLA 3 : ACTIVIDAD FORMADORA DE COLONIA DEL LISADO DE GRANULOCITOS A DIFERENTES DENSIDADES CELULARES.

ESTIMULO	# COLONIAS
Sin inductor	00
GM-CSF α	240
Lisado de Gra. 10×10^6 cel/ml	00
Lisado de Gra. 20×10^6 cel/ml	64
Lisado de Gra. 40×10^6 cel/ml	20

GM-CSF α : Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos recombinante de ratón.

Lisado de Gra: Lisados de granulocitos

TABLA 4: ACTIVIDAD FORMADORA DE COLONIAS DE LOS LISADOS OBTENIDOS A DIFERENTES TIEMPOS.

INDUCTOR	# COLONIAS	TIPO DE COLONIA (X)	
		GRA	NON-HO
GM-CSF α	409	38	62
M-CSF β	429	00	100
MC L-929	433	12	88
Lis. 00 hr (Cav.)	000	00	00
Lis. 17 hr (Cav.)	200	06	94
Lis. 24 hr (Cav.)	034	00	100
Lis. 48 hr (Cav.)	000	00	00
Lis. 72 hr (Cav.)	000	00	00
Lis. 96 hr (Cav.)	000	00	00
Lis. 24 hr Nód. Lin.	000	00	00
Lis. 48 hr Nód. Lin.	000	00	00
Lis. 72 hr Nód. Lin.	000	00	00
Lis. 96 hr Nód. Lin.	000	00	00

GM-CSF α : Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos recombinante de ratón.

M-CSF β : Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos recombinante humano.

MC L-929: Medio Condicionado de L-929.

Lis 00 hr (Cav.): Lisado de células de cavidad peritoneal de ratones no tratados.

Lis 17 hr (Cav.): Lisado de células de cavidad peritoneal no adherentes.

Lis 24, 48, 72 y 96 hr (Cav.): Lisados de células de cavidad peritoneal de ratones tratados.

Lis 24, 48, 72 y 96 hr Nód. Lin.: Lisados de células de nódulos linfáticos de ratones tratados.

los linfocitos son capaces de generar IL-3 y GM-CSF los cuales son inductores de macrófagos, se obtuvieron poblaciones altamente enriquecidas de linfocitos de los nódulos linfáticos (Tabla 1), los cuales en nuestras condiciones de cultivo no mostraron tener actividad inductora (Tabla 4). Por último un dato más que no indica que los granulocitos son las células responsables de la actividad tipo M-CSF, al ensayar el lisado de 24 hrs post-endotoxina obtuvimos menor número de colonias de macrófagos inducidas que a las 17 hrs a pesar de que esta muestra provenía de una población en donde los macrófagos estaban aumentados; además, probamos por separado un lisado de macrófagos adherentes obtenido a las 17 hrs post-endotoxina el cual contenía una población bastante purificada (97 %, dato no mostrado), pero a pesar de ello no hubo generación de colonias.

Dado que el lisado de células no adherentes de cavidad peritoneal de 17 hrs fue el que mayor porcentaje de granulocitos polimorfonucleares presentó y que además mostró AFC importante, se decidió que para los siguientes experimentos se trabajaría con este lisado y se denominaría de granulocitos (LG).

Es interesante mencionar que aunque el lisado de granulocitos indujo principalmente la formación de colonias de macrófagos, también se produjo una pequeña inducción de granulocitos. Con la finalidad de determinar el grado de diferenciación que tenían estas colonias de granulocitos y comparar con las colonias inducidas por otros factores inductores de colonias de granulocitos, se procedió a ensayar nuevamente el LG además de la IL-3, el G-CSF y el GM-CSF. Como control de macrófagos se incluyó en el ensayo a M-CSF y el MC L-929, además de un control negativo sin inductores. Como era de esperarse el GM-CSF y la IL-3 indujeron un alto porcentaje de ambos tipos celulares, aunque la IL-3 produjo más colonias de granulocitos del tipo inmaduro (banda) que el GM-CSF (Tabla 5 y Gráfica 1). Asimismo el G-CSF y el M-CSF indujeron exclusivamente tanto granulocitos, como macrófagos respectivamente. El G-CSF produjo como era de esperarse una mayor cantidad de colonias de células maduras (PMN). Es interesante mencionar que tanto el LG como el MC L-929 produjeron una pequeña inducción de colonias granulocíticas, aunque el LG de células inmaduras. Estos resultados nos indican que muy probablemente el LG contenga M-CSF y que el pequeño porcentaje de colonias inmaduras de granulocitos inducidas se pueda deber a que estamos tratando al igual que con el MC L-929 de moléculas naturales y no recombinantes que tengan esta propiedad. Aunque no se descarta la posibilidad de que se tengan pequeñas cantidades de algún otro factor inductor de granulocitos en el LG o como se ha publicado en otro trabajo que los macrófagos inducidos tengan la propiedad de secretar moléculas inductoras de granulocitos (189).

EVIDENCIAS DE QUE LA ACTIVIDAD FORMADORA DE COLONIA DEL LISADO DE GRANULOCITOS ESTA DADA PRINCIPALMENTE POR M-CSF.

Una vez observado que la AFC de macrófagos del LG podría estar dada por M-CSF, se procedió a identificar la posible presencia del M-CSF en este lisado. Para ello se realizaron ensayos de ELISA con diferentes cantidades de LG (100, 50 y 25 μ l) y diferentes diluciones de anti M-CSF (1:500 y 1:100). Se utilizó como control positivo M-CSF recombinante. Como era de esperarse se detectó un gran

TABLA 5 : ACTIVIDAD COMPARATIVA DEL LISADO DE GRANULOCITOS Y FACTORES ESTIMULADORES DE COLONIAS (CSF'S) EN LA INDUCCION DEL TIPO Y ESTADO DE MADURACION DE LAS COLONIAS FORMADAS.

INDUCTOR	* COLONIAS	TIPO DE COLONIA (%)			
		GRANULOCITOS			NON-NO
		BANDA	PMN	TOTAL	
Sin inductor	000	00	00	00	00
GM-CSF _{rm}	210	10	27	37	63
IL-3 _{rm}	035	56	02	58	42
G-CSF _{rh}	124	10	90	100	00
M-CSF _{rh}	065	00	00	00	100
Lisado de Gra.	073	03	00	03	97
MC L-929	060	00	10	10	90

GM-CSF_{rm} : Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos recombinante de ratón.

IL-3_{rm} : Interleucina 3 recombinante de ratón.

G-CSF_{rh} : Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos recombinante humano.

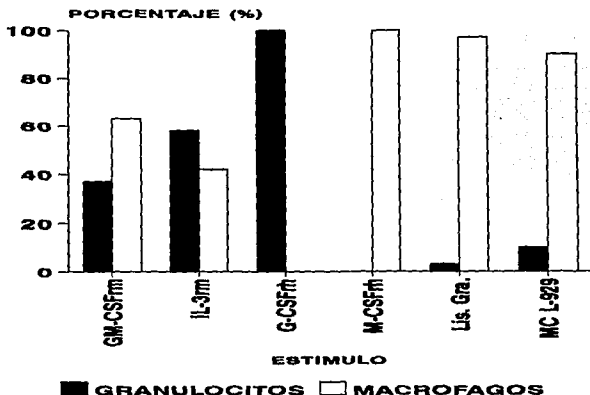
M-CSF_{rh} : Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos recombinante humano.

PMN : Polimorfonuclear ,

NON-NO : Monocito-Macrófago

GRAFICA 1

COMPARACION ENTRE LOS CSF'S Y EL LISADO DE GRANULOCITOS EN LA FORMACION DE TIPOS DE COLONIAS



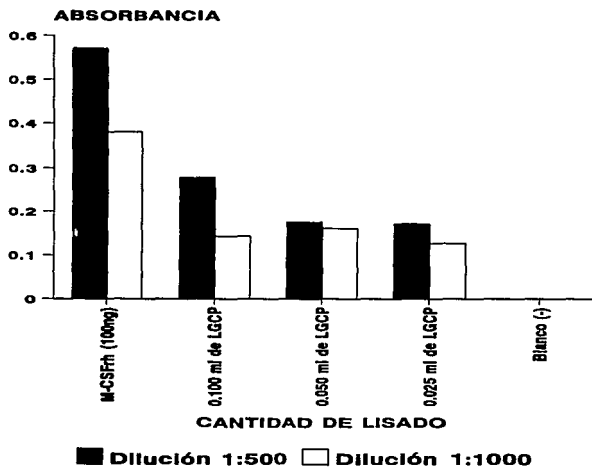
reconocimiento del M-CSF por el anti M-CSF. El hecho de que también se encontró reconocimiento en todas las muestras del LG nos indica que éstas contienen M-CSF (Gráfica 2). Además, el reconocimiento parece corresponder a la cantidad introducida de anticuerpo anti M-CSF.

Una vez que se ha demostrado que el M-CSF se encuentra presente en el LG, procedimos a evaluar si ésta en efecto era la molécula responsable de la inducción de macrófagos *in vitro*. Para ello realizamos ensayos de neutralización *in vitro* a través de anticuerpos específicos contra M-CSF. En nuestro laboratorio hemos observado que concentraciones bajas de GM-CSF producen cantidades considerables de colonias macrófagicas (190), por lo que en el mismo ensayo también introducimos un anticuerpo específico para neutralizar la actividad de GM-CSF. Por lo cual se introdujeron M-CSF y GM-CSF por separado y con sus respectivos anticuerpos. La cantidad de anticuerpo a utilizar fue el resultado de ensayos previos, encontrándose que 15 µg de anti GM-CSF eran necesarios para neutralizar 20 ng de GM-CSF, y 20 µg de anti M-CSF para neutralizar 10 ng de M-CSF. Los resultados muestran que el anti M-CSF inhibió completamente la AFC de macrófagos presente en el LG, mientras que el anti GM-CSF inhibió parcialmente dicha actividad (Tabla 6 y Gráfica 3). A pesar que no determinamos la presencia de GM-CSF en ensayos de ELISA, los resultados anteriores indican que el GM-CSF está promoviendo probablemente la AFC de macrófagos en forma proliferativa.

Por otra parte, para comprobar que no existía reactividad cruzada entre el GM-CSF y el anti M-CSF, se realizaron otros cultivos los cuales contenían las anteriores moléculas. Cabe mencionar que el anti M-CSF era para reconocer y neutralizar la molécula humana. Se usó en un sistema de ratón ya que no existe comercialmente anticuerpo contra M-CSF de ratón; aunque se sabe que la molécula humana de M-CSF tiene actividad sobre células de médula ósea de ratón, ya que ambos sistemas poseen una gran homología (69.5%) (146). Los resultados muestran que el anti M-CSF no tiene efecto de neutralización en el GM-CSF, ya que solos el GM-CSF o el GM-CSF más el anti M-CSF producen casi el mismo número y tipo de colonias (Tabla 7).

Si tomamos en consideración que nuestros resultados indican que el granulocito es capaz de secretar M-CSF, estaríamos enriqueciendo el entendimiento de los posibles mecanismos en el cual está involucrado este tipo celular en la regulación de células leucocíticas maduras (neutrófilos y macrófagos). Además de la posible existencia de un mecanismo de autorregulación entre granulocitos y macrófagos ya que se sabe que el macrófago a su vez es capaz de secretar G-CSF (191).

GRAFICA 2 RECONOCIMIENTO DE M-CSF EN EL LISADO DE GRANULOCITOS DE CAVIDAD PERITONEAL.



M-CSFh: Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos recombinante humano.

LGCP: Lisado de Granulocitos de Cavidad Peritoneal.

Diluciones de anticuerpo de anti M-CSF (1:500, 1:1000).

TABLA 6: NEUTRALIZACION DE LA ACTIVIDAD FORMADORA DE COLONIAS DEL LISADO DE GRANULOCITOS DE CAVIDAD PERITONEAL DE RATON Y DE FACTORES ESTIMULADORES DE COLONIAS (CSF's) RECOMBINANTES.

ESTIMULO	# COLONIAS	TIPO DE COLONIA (X)	
		GRA	MON-MO
GM-CSF	353	39	61
M-CSF	304	01	99
MC L-929	261	06	94
lisado de Gra.	170	12	88
GM-CSF + anti GM-CSF	126	33	67
M-CSF + anti M-CSF	000	00	00
Lisado de Gra. + anti GM-CSF	043	01	99
Lisado de Gra. + anti M-CSF	000	00	00

Lisado de Gra.: Lisado de granulocitos.

Anti GM-CSF: anticuerpo monoclonal contra el Factor Estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos recombinante de ratón (GM-CSF_r).

Anti M-CSF: anticuerpo policlonal contra el Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos recombinante humano (M-CSF_{rh}).

MC L-929: Medio Condicionado de la línea L-929 -

GRA: Granulocitos neutrófilos.

MON-MO: Monocito-Macrófago.

GRAFICA 3

NEUTRALIZACION DE LA ACTIVIDAD FORMADORA DE COLONIA DEL LISADO DE GRANULOCITOS Y CSF's.

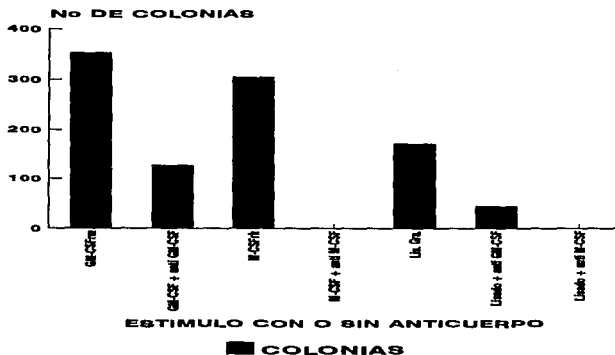


TABLA 7 : ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL ANTI M-CSF EN LA NEUTRALIZACION DE ACTIVIDAD FORMADORA DE COLONIA.

ESTIMULO	n	TIPO DE COLONIA (x)	
		COLONIAS	GRA
GM-CSF _{ra}	191	48	52
M-CSF _{rh}	212	01	99
MC L-929	197	17	83
Lisado de Gra.	200	07	93
GM-CSF + anti M-CSF	208	42	58
M-CSF + anti M-CSF	000	00	00

GM-CSF_{ra}: Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos recombinante de ratón.

M-CSF_{rh}: Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos recombinante humano.

MC L-929: Medio Condicionado de la línea L-929.

Anti M-CSF: Anticuerpo contra M-CSF.

GRA: Granulocitos neutrófilos.

NON-MO: Monocito-Macrófago.

DISCUSION

Hasta hace algunos años el granulocito polimorfonuclear (PMN) había sido considerado como una célula diferenciada terminalmente con un papel efector pasivo en la inflamación vía fagocitosis y la liberación de enzimas y componentes citotóxicos preformados. Ahora, algunos investigadores son de la idea de que el PMN contribuye significativamente en la respuesta inmune, modulando la inmunidad celular y humoral vía la síntesis y liberación de citocinas inmunoregulatoras (175). En los resultados presentados en este trabajo evidenciamos que los PMN's son células capaces de secretar una molécula reguladora de la proliferación de macrófagos, por lo tanto no únicamente coincidimos con los autores que asignan a este tipo celular propiedades moduladoras de la respuesta inmune, sino que también participan en la regulación del sistema hematopoyético a través de la secreción de un factor estimulador de la proliferación de macrófagos.

Una de las principales dificultades que se presentaron en el desarrollo de este trabajo fue el obtener PMN's altamente purificados, ya que en las células de cavidad peritoneal se encuentran otro tipo de células capaces de secretar Actividades Formadas de Colonias (AFC). Aunque en la literatura consultada se encuentran descritas técnicas especiales para obtener poblaciones altamente purificadas (98 a 99%) (180), nuestros resultados indican que solamente logramos tener una purificación moderada (88%, como máximo). Consideramos que lo anterior pudo deberse a que trabajamos con células producto de una reacción inflamatoria generada por la inoculación de un agente irritante en la cavidad peritoneal, lo cual produce células con diferentes grados de activación y por tanto diferentes propiedades de adherencia y densidad que son la base de las técnicas establecidas para su purificación.

Con la finalidad de dilucidar si la AFC encontrada en el lisado de las células enriquecidas con los PMN's provenían realmente de estas células, se procedió a ensayar lisados de otros paquetes celulares en donde la cantidad de PMN's estaba disminuida y las de macrófagos o linfocitos aumentadas. La obtención de este tipo de paquetes celulares se facilitó por el hecho de que habíamos demostrado que los macrófagos aumentaban conforme al tiempo de tratamiento con el irritante en la cavidad peritoneal, llegando a ser casi la mayoría después de 96 hrs, mientras que los linfocitos aumentaban considerablemente a las 72 hrs. Nuestros resultados indicaron que cuando estaban aumentados tanto los macrófagos como los linfocitos desaparecía la AFC. Por lo tanto, creemos que podemos estar razonablemente seguros que son los PMN's los responsables de esta actividad. Además cuando obtuvimos poblaciones purificadas de linfocitos de nódulos linfáticos no se encontró AFC por sus lisados.

Es interesante mencionar que a las 96 hrs el porcentaje de células era semejante al encontrado en ratones sin tratamiento en donde los macrófagos son las células mayoritarias. Sin embargo, hay que reconocer que no son poblaciones de macrófagos semejantes ya que antes de tratamiento son macrófagos residentes, mientras que a las 96 hrs son principalmente inducidos de tipo monocito.

Sería conveniente diseñar otro tipo de estrategias para purificar la población de PMN's ya sea mediante citometría de flujo, eliminación de células contaminantes mediante anticuerpos específicos, o utilizando líneas celulares de tipo granulocítico para reafirmar aún más nuestros resultados (192). Otro experimento interesante a realizar consistiría en utilizar no únicamente granulocitos no adherentes, como lo establece la técnica de purificación utilizada, sino aquellos adherentes con la finalidad de obtener información sobre si la capacidad de AFC es dependiente del grado de activación de los PMN's, ya que los adherentes se encuentran mucho más activados.

El hecho de haber encontrado que al lisar 10×10^6 PMN's no detectamos AFC, mientras que cuando se lisaron 4×10^7 ésta se vió fuertemente inhibida, lo asociamos a que cuando utilizamos un número menor de células éstas no producían suficiente factor inductor para ser detectada en nuestras condiciones de cultivo; mientras que cuando se utilizaron un número mayor de células la inhibición presentada puede ser atribuida tanto a efectos tóxicos asociados a la liberación de proteasas, u otros componentes citotóxicos naturales, como a posibles factores inhibidores de la AFC. Sería interesante obtener lisados con rangos mas pequeños de células lisadas para obtener las condiciones óptimas de AFC y aún más interesante el determinar si en realidad existen factores inhibidores de esta actividad, lo cual abriría un nuevo campo de investigación, ya que hasta la fecha se carece de información al respecto.

Cuando analizamos el tipo de colonias generadas por el LG, utilizamos los criterios morfológicos comunmente existentes para asignarles características de colonia de macrófago o de granulocito según el tamaño de las células (pequeñas para granulocitos y grandes para macrófagos), o del grado de compactación de las colonias (muy compacto para granulocitos y muy disperso para macrófagos). Sin embargo, para confirmar este tipo de observación era necesario otro tipo de indentificación, como lo sería la detección por técnicas citoquímicas de enzimas específicas, o mediante una tinción específica para células hematológicas. Para ello se evaluó la presencia de esterasas específicas de macrófagos (enzimas hidrolíticas) con el α -naftil acetato esterasa (186). Mediante este tipo de técnicas obtuvimos la confirmación de la naturaleza macrofágica de las colonias, ya que las células que las constituían demostraron tener la enzima y en sus tinciones una estructura típica de este tipo de fagocitos: amplio citoplasma con gran cantidad de vacuolas y núcleo arriñonado y excéntrico.

El hecho de haber obtenido un pequeño porcentaje de colonias de granulocitos nos indica que posiblemente pueda existir algún otro factor diferente al activador de macrófagos, por ello procedimos a comparar el tipo de granulocitos inducidos por el LG y otros CSF's. Nuestros resultados indican que se formaron colonias de granulocitos exclusivamente de tipo banda, diferente al generado por el G-CSF que es exclusivamente de polimorfonucleadas y diferente al de GM-CSF la cual genera células de ambos tipos. Encontramos que sólo la IL-3 tiene este tipo de inducción, por lo cual es posible que también este presente aparte del M-CSF responsable del tipo mayoritario de colonias en nuestros experimentos.

Aunque es probable la existencia de varios factores estimuladores en el lisado por ser éste una fuente no purificada, no hay que perder de vista que el probable M-CSF existente en el LG por ser de tipo natural y no recombinante, podría ser el

responsable de inducir la pequeña cantidad de colonias de granulocitos detectada. Por otro lado esta pequeña cantidad de colonias de granulocitos pudo ser debida a un fenómeno indirecto a través de la secreción de G-CSF por las células macrofágicas producidas. La última posibilidad puede ser factible puesto que nuestro grupo de trabajo ha reportado que los macrófagos inducidos con GM-CSF son capaces de producir una actividad tipo G-CSF (189).

Se ha reportado y también lo observamos en el presente trabajo que células de médula ósea estimuladas con M-CSF producen colonias de granulocitos en bajos porcentajes (193).

Por otro lado, tampoco se descarta que el GM-CSF o la IL-3 puedan ser los responsables de la AFC encontrada, puesto que en nuestros ensayos observamos que ambos factores producen porcentajes considerables de colonias de macrófagos, aunque también de granulocitos. Además, el GM-CSF tiene actividad dosis dependiente, es decir, este factor es capaz de producir colonias de granulocitos a concentraciones altas, y colonias de macrófagos en gran proporción cuando se utiliza a concentraciones bajas (70,72,190), lo cual no ha sido reportado para IL-3. Esta última posibilidad podría ser factible ya que el GM-CSF se produce en bajos niveles y sólo cuando se ha estimulado a las células que lo producen (linfocitos T, macrófagos, fibroblastos, epitelio y posiblemente ahora los PMN's) (67,77,88), por tal motivo no descartamos la posible influencia de GM-CSF.

Para identificar la posible existencia de M-CSF en los lisados de LG, realizamos los ensayos de identificación a través de la técnica de ELISA. Observamos que en efecto se encontraba M-CSF en el LG, hecho que fue confirmado al lograr neutralizar totalmente esta AFC cuando se utilizó anti M-CSF. Es de llamar la atención que esta actividad también fue neutralizada aunque parcialmente cuando se introdujo anti GM-CSF. Lo anterior nos hizo pensar que aunque la AFC estaba dada por una actividad proporcionada directamente por el M-CSF, el anti GM-CSF pudiera reconocer parcialmente a esta molécula por compartir algún grado de homología. Sería interesante el evaluar si el anti GM-CSF es capaz de inhibir parcialmente la actividad generada por el M-CSF lo cual explicaría nuestra parcial inhibición por este factor. El hecho de que encontramos en nuestros ensayos que el anti M-CSF no inhibe la actividad del GM-CSF nos indicaría que la posible homología existente entre GM y M-CSF sea tal que únicamente sea reconocida por el anti GM-CSF. Sin embargo, no descartamos la posible influencia de GM-CSF en la AFC.

Por último, es interesante mencionar que la actividad presente en el LG expresada como AFC de macrófagos esta dada principalmente por una actividad tipo M-CSF. Sin embargo, no descartamos la presencia de otros factores que por si mismos no tienen actividad proliferadora, pero que en compañía de otros factores tales como los CSF's éstos pueden incrementar la respuesta proliferativa (28).

Los resultados obtenidos en el presente estudio aportan evidencias de que el granulocito polimorfonuclear puede ser capaz de producir y tal vez sintetizar proteínas *de novo*.

Hace algunos años, se manejaba que el PMN cuando alcanzaba la madurez era incapaz de síntesis proteica, debido a la relativa escasez de ribosomas y retículo endoplásmico, además de que la habilidad de los PMN's en la ingestión y fagocitosis

de partículas va relacionada con la inhibición de la síntesis de ARN y proteínas (175,176). Poco es conocido sobre la síntesis y liberación de CSF's por los PMN's, de los escasos trabajos realizados sólo se han llevado a cabo de forma *in vitro* y bajo estímulo endotóxico (como LPS) o con citocinas (IL-1, IL-2, TNF y GM-CSF) (179,180).

Nuestros resultados revisten de gran relevancia en dos aspectos: primero, en la contribución del conocimiento de la biología del PMN como célula capaz de producir CSF's; segundo, en el contexto del PMN como célula efectora. Lo anterior puede ser canalizado a comparar al PMN con el macrófago, ya que ambos tipos celulares poseen características similares como el tener un progenitor común, migración y potencial fagocítico, receptores y antígenos de superficie, y pueden jugar un papel similar en la defensa del hospedero en forma inespecífica (180).

Se conocen actualmente mayores fuentes de M-CSF, como son los macrófagos, fibroblastos y células endoteliales. A pesar que desconocemos la magnitud de síntesis y liberación de M-CSF por parte de los PMN's, podemos suponer que este tipo celular puede tener un papel importante en un sitio de inflamación o infección, puesto que son las primeras células en arribar es por ende pensar que la secreción local de M-CSF pueda activar aún más la invasión de monocitos, incrementando su supervivencia y actividad citotóxica, y puede inducir como es sabido a la secreción de otras moléculas tales como TNF, G-CSF, IL-1, IFN y el mismo M-CSF (145,147,180).

BIBLIOGRAFIA

- 1) Gulati LG, Ashton KJ, Hyun HB., 1988 , Structure and function of the bone marrow and hematopoiesis., *Hematology/Oncology Clinics of North America.*, 2: 495-511.
- 2) Haw WA., 1970 , *Tratado de hematología.*, Interamericana , México., pp. 279.
- 3) Beck W., 1991 , *Hematology* , fifth edition., The mit press, Cambridge, Massachusetts, USA., pp. 1-21.
- 4) Gordon MY, Barrett MJ., 1985 , *Bone marrow disorders, the biologics basis of clinical problems.*, Blackwell scientific publications, London, Englan., pp. 20-31.
- 5) Chanarin I., 1985 , *Structure and function of the bone marrow*, En: *Toxicology of the blood and bone marrow.*, Ed. by Richard D. Irons, Raven press, New York, USA., pp. 1-15.
- 6) Dexter TM., 1976 , *Differentiation and proliferation of hematopoietic cell in culture.*, *Methods Cell. Biol.*, 14: 387-405.
- 7) Weiss L., 1976 , *The hematopoietic microenvironment of the bone marrow: ultrastructural study of the stroma in rats.*, *Anat. Rec.*, 186: 161-184.
- 8) Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG., 1977 , *Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro.*, *J. Cell. Physiol.*, 91: 335-344.
- 9) Bentley SA., 1981 , *Close range cell:cell interaction required for stem cell maintenance in continuous bone marrow culture.* *Exp. Hematol.*, 9: 308-312.
- 10) Wolf NS, Trentin JJ., 1968 , *Hemopoietic colony studies V: Effect of hemopoietic organ stroma on differentiation of pluripotent sten cells.*, *J. Exp. Med.*, 127: 205-214.
- 11) Dexter TM, Spooncer E, Toksoz D, Lajtha LG., 1980 , *The role of cells and their products in the regulation of in vitro stem cell proliferation and granulocyte development.*, *J. Supramol. Struc.*, 13: 513-524.
- 12) Allen TD, Dexter TM., 1984 , *The essencial cells on the haemopoietic microenvironment.*, *Exp. Haematol.*, 12: 517-521.
- 13) Allen TD, Dexter TM, Simmons PJ., 1990 , *Marrow biology and stem cells.*, En: *Colony Stimulating Factors: Molecular and cellular biology.*, Eds. Dexter TM, Garland JM, Testa NG., Marcel Dekker., New York, USA. Cap. 1. pp. 1-38.
- 14) Murphy P., 1976 , *The Neutrophil.*, Plenum publishing, New York, USA., pp. 217.

- 15) Weiss L., 1977 , Leucocytes., En: Histology., Lippincott, New York, USA., cap. 10. pp. 260-288.
- 16) Roos MH, Reith EJ, Romrell LJ., 1992 , Histologia: texto y atlas color., 2a ed., Editorial Medica Panamericana, México D.F., pp. 749.
- 17) Paul WE., 1989 , Fundamental immunology., second edition., Raven Press, New York, USA., pp. 1123.
- 18) Roit IM., 1991 , Essential immunology., Seventh edition., Blackwell Scientific Publications, Oxford, CA. USA., pp. 356.
- 19) Arai KI, Lee F, Miyajima A., 1992 , Cytokines: coordinators of immune and inflammatory response. Annu. Rev. Biochem., 59: 783-836.
- 20) Canistra A, 1988, regulation of the production and function of granulocytes and monocytes., Seminars in Hematology., 25: 173-188.
- 21) Lauria E., 1979 , Hematopoietic and lymphoid tissue in culture., Bureaw, New York, SA., pp. 44-61.
- 22) Clark SC, Kamen R., 1987 , The human hematopoietic colony stimulating factors., Science., 236: 1229-1237.
- 23) Klingemann HG, Eaves CJ., 1988 , Colony stimulating factor., Bone marrow transplantation., 3: 177-184.
- 24) Morstin G, Burgess AW., 1988 , Hemopoietic growth factor: a review., Cancer Research., 48: 5624-5637.
- 25) Pierce JH., 1989 , Oncogenes, growth factor and hematopoietic cell transformation., Biochemica et Biophysica Acta., 989: 178-208.
- 26) Coulombel L, Drüeke T, Kreis H, Nissen-Druey C, Marty M., 1989 , Therapeutic use of recombinant hematopoietic growth factor., Nouv. Rev. Fr. Hematol., 31: 93-101.
- 27) Groopman JE, Molina JM, Scadden DT., 1989 , Hematopoietic growth factor: biology and clinical application., New Engl. J. Med., 321: 1449-1459.
- 28) Heyworth CM, Vallance SJ, Whetton AD, Dexter TM., 1990 , The biochemistry and biology of the myeloid haemopoietic cell growth factors., J. Cell. Sci. Suppl. , 13: 57-74.
- 29) Ogawa M, Porter PN, Nakahata T., 1983 , Renewal and commitment to differentiation of hemopoietic stem cells., Blood., 61: 828.

- 30) Till JE, McCulloch EA., 1961 , A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells., *Rad. Res.*, 14: 213.
- 31) Quesenberry P., 1990 , Hematopoietic Stem cell, and growth factors., *Hematology.*, 15: 223-228.
- 32) Prchal JT., Frieman H, Denis M, Nathan CF, Wang M, Zalman LS., 1978 , A common progenitor for human myeloid and lymphoid cells., *Nature.*, 274: 590-598.
- 33) Becker AJ, Weiden OL, Peetre C., 1980 , Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells., *Nature.*, 197: 452-460.
- 34) Metcalf D, Koyasu S, Nicola NA, Byrne PV, Morgan CJ., 1982 , Clonal analysis of progenitor cell commitment to granulocyte or macrophage production., *J. Cell. Physiol.*, 11: 275-283.
- 35) Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE., 1963 , The distribution of colony forming cells among spleen colonies., *J. Cell. Comp. Physiol.*, 62: 327.
- 36) Pluznik DH, Sachs L., 1965 , The cloning of normal "mast" cells in tissue culture., *J. Cell. Comp. Physiol.*, 16: 319.
- 37) Bradley TR, Metcalf D., 1966 , The growth of mouse bone marrow cells *in vitro.*, *Aus. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 44: 287.
- 38) Golde DW., 1992 , La célula madre ., *Investigación y Ciencia.*, Febrero, No.2.
- 39) Ogawa M., 1993 , Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells., *Blood.*, 81: 2844-2853.
- 40) Carnot P, DeFlandre C., 1906 , Sur l'activité hématopoïétique des différents organes au cours de la régénération du sang., *CR Hebd Acad. Sci.*, 1143: 384-386.
- 41) Mendoza JF, López R, Machuca C, Sánchez L, Hernández J, Weiss B., Los factores estimuladores de colonia (CSFs) y las interleucinas (ILs), *Sangre.*, 38: 309-322.
- 42) Hapel AJ, Fung MC, Young IG, Jhonson G, Metcalf D., 1985 , Biological properties of molecularly cloned and expressed murine interleukine-3., *Blood.*, 65: 1453-1459.
- 43) Stocking C, Ostertag W., 1990 , Interleukin 3: a multilineage hematopoietic growth factor., En: *Growth factor, differentiation factor and cytokines*, Habenicht A (ed), Espringer-Verlag, Berlin, Alemania, pp. 115-128.

- 44) Schrader JW, Lewis-Clark I, Leslie KB, Ziltener HJ., 1992 , Interleucina 3., En: Human Cytokines: handbook for basic and clinical research., Aggarwal BB, Gutterman JU (ed.), Blackwell Scientific Publications, Cambridge, Massachusetts, USA., Cap. 6 pp.97-112.
- 45) Klinder V, Thorens B, Dekossodo S, Allet B, Eliason JF, Thatcher D, Vassalli P., 1985 , Stimulation of hematopoiesis in vivo by recombinant bacterial murine interleukin 3., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83: 1001-1005.
- 46) Cohen DR, hapel AS, Young IG., 1986 , Cloning and expression of the rat interleukin 3 gene., Nucleic Acids Res., 14: 3641-3648.
- 47) Yang YC, Ciarletta AB, Temple PA, Chong MP, Kovacic S., 1986 , Human IL-3 (multi-CSF): Identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3., Cell., 47: 3-10.
- 48) Clark-Lewis IR, Aebersold H, Ziltener JN, Schrader LE, 1986 , Automated chemical synthesis of a protein growth factor for hemopoietic cells, interleukin 3., Science., 231: 134-139.
- 49) Le Beau MM, Epsteins ND, O'Brien SJ, Nienhuis AW, Yang YC, Clark SC, Rowley JD., 1987 , The interleukin 3 gene is located on human chromosome 5 and is deleted in myeloid leukemias with deletion of 5q., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84: 5913-5917.
- 50) Barlow DP, Bucon M, Lehrach H, Hogan BL, Googh NM., 1987 , Close genetic and physical linkage between the murine haemopoietic growth factor genes GM-CSF and multi-CSF (IL-3)., EMBO J., 6: 617-623.
- 51) Morris CF, Young IG, Hapel AJ., 1990 , Molecular and cellular biology of interleukin-3., En: Colony Stimulating Factors: Molecular and cellular biology., Eds. Dexter TM, Garland JM, Testa NG., Marcel Dekker., New York, USA. Cap. 6. pp. 177-214.
- 52) Schreier MH, Iscove NN., 1980 , Haemopoietic growth factors are released in cultures of H-2-restricted helper T cells, accessory cells and spcific antigen., Nature., 287: 228-231.
- 53) Williams N, Eger RR, Moore MAS, Medelsohn N., 1978 , Differentiation of mouse bone marrow cells into neutrophilic granulocytes by in activity separable from WEHI-3 cell conditioned medium., Differentiation., 11: 59-63.
- 54) Bazil GW, Haynes M, Garland J, Dexter TM., 1983 , Characterization and parcial purification of a haemopoietic cell growth factor in WEHI-3 cell conditioned medium., Biochem. J., 210: 747-759.

- 55) Fung MC, Hapel AJ, Imer S, Cohen DR, Johnson RM, Campbell HD, Young IG, 1984 , Molecular cloning cDNA for murine interleukin-3., *Nature.*, 307: 233-236.
- 56) Johnson GR, 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: 3897-3882.
- 57) Nakahata T, Ogawa M., 1982 , Identification in culture of a class of hemopoietic colony forming units with extensive capability to self-renew and generate multipotential colonies., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79: 3843-3847.
- 58) Suda T, Suda J, Ogawa M, Ihle J., 1985 , Permissive role of interleukin 3 (IL-3) in proliferation and differentiation of multipotential hemopoietic progenitors in culture., *J. Cell. Physiol.*, 124: 182-190.
- 59) Sonoda Y, Yang YC, Wong GC, Clark SC, Ogawa M., 1988 , Analysis in serum free culture of the targets of recombinant human hemopoietic growth factors: interleukin 3 and granulocyte macrophage colony stimulating factor are specific for early developmental stages., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85: 4360-4364.
- 60) Vairo G, Hamilton A., 1991 , Signalling through CSF receptors., *Immunology Today.*, 12: 362-369.
- 61) Mendoza JF, López R, Machuca C, Sánchez L, Hernández J, Weiss B., 1993 , Los factores estimuladores de colonias (CSFs) y las interleucinas (ILs), *Sangre.*, 38: 309-322.
- 62) Brizzi MF, Avanzi CG, Pegoraro L., 1991 , Hematopoietic growth factor receptors., *International Journal of Cell Cloning.*, 9: 274-300.
- 63) Metcalf D., Begley CG, Johnson GR, Nicola NA, Lopez AF, Williamson DJ., 1986 , Effects of purified bacterially synthesized murine multi-CSF (IL-3) on hematopoiesis in normal adult mice., *Blood.*, 68: 46-57.
- 64) Onge JS, Jacobson RJ., 1992 , The role of hematopoietic growth factors in the treatment of neoplastic diseases., *Seminars in Hematology.*, 29: 53-63.
- 65) Williams NH, Jackson H, Iscove NN, Dukes PP., 1984 , The role of erythropoietic, thrombopoietic stimulating factor, and myeloid colony stimulating factors on murine megakaryocyte colony formation., *Exp. hematol.*, 12: 734-740.
- 66) Burgess AW, Camakaris J, Metcalf D., 1977 , Purification and properties of Colony Stimulating Factor from mouse lung-medium., *J. Biol. Chem.*, 262: 1998-2003.
- 67) Burgess AW, Metcalf D., 1980 , The nature and action of Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating factors., *Blood*, 56: 947-957.

68) Gough NM, Gough J, Metcalf D, Kelso A, Graid D, Nicola NA, Burgess AW, Dunn AR., 1984 , Molecular cloning of cDNA encoding a murine haematopoietic growth regulator, Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor., *Nature*, 309: 763-767.

69) Wong GG, Witek JS, Temple PA., 1985 , Human GM-CSF: molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins., *Science*, 228: 810-815.

70) Metcalf D, Burgess AW, 1982 , Clonal analysis of progenitors cell commitment to granulocyte or macrophage production., *J. Cell. Physiol.*, 111: 283.

71) Metcalf D., 1985 , The Granulocyte Macrophage colony Stimulating Factors., *Science*, 229: 16-22.

72) Metcalf D, Burgess AW, Johnson GR, Nicola NA., 1986 , *In vitro* actions on hemopoietic cell of recombinant murine GM-CSF purified after production in *Escherichia coli*: comparison with purified nature GM-CSF., *J. Cell. Physiol.*, 128: 421-431.

73) Metcalf D, Begley CG, Johnson GR, Nicola NA., 1986 , Biologic propertis *in vitro* of a recombinant human Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor., *Blood*, 67: 37-45.

74) Strath M, Sanderson CJ., 1985 , The production and functional properties of eosinophils from bone marrow cultures., *J. Cell. Sci.*, 74: 207-217.

75) Robinson BE, McGrath HE., 1987 , Recombinant murine Granulocyte Macrophage colony Stimulating Factors has Megakariocyte Colony Stimulating Activity and augments megakariocyte colony stimulating by Interleukin 3., *J. Clin. Inv.*, 79: 1648.

76) Sieff CA, Emerson SG, Donahue RE, Nathan DG., 1985 , Human Granulocyte Macrophage colony Stimulating Factor: A multilineage hematopoietin., *Science*, 230: 1171-1173.

77) Nicola NA, Burgess AW, Metcalf D., 1979 , Similar molecular propertis of Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor produced by diferents mouse organ *in vitro* an *in vivo*., *J. Biol. Chem.*, 254: 5290-5299.

78) Delamarter JF, Mermod JJ, Liang CM, Eliason JF, et. al., 1985 , Recombinant murine GM-CSF from *E. coli* has high biological activity and is neutralized by un specific antiserum., *EMBO J.*, 4: 2575-2581.

- 79) Kashanky K, O'Hara PJ, Hart CE, Farstrom JW, Hagen FS., 1987 , Role of carbohydrate in the function of human Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor., *J. Biochemistry*, 26: 4861-4867.
- 80) Shrimser JL, Rose K, Simon GM, Wingfield P., 1987 , Characterization of human and mouse GM-CSF derived from *E. coli*., *J. Biochemistry* , 247: 195-199.
- 81) Sparrow LG, Metcalf D, Honkapiller MW, Hror LE, Burgess AW., 1985 , Purification and partial amino acids sequence of asialo murine GM-CSF., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 292-296.
- 82) Huebner K, Isobe M, Cruce CM, Golde Dw Kaufman SE, Gasson JC., 1985 , The human gene encoding GM-CSF is at 5 q21-q32, the chromosoma region deleted in the 5q- anomaly., *Science*, 230: 1282-1285.
- 83) Le Beau MM, Wesbrok CA, Diaz MO, Larson RA, Rowley JD., 1986 , Evidence for the involvement of GM-CSF and FMS in the deletion (5q) in myeloid disorders., *Science*, 231: 984-987.
- 84) Migatake ST, Otsuka T, Yokuta FL, Arai K., 1985 , Structure of the chromosomal gene from Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor: comparison of the mouse and human genes., *EMBO J.*, 4: 2561-2568.
- 85) Gough NM, Metcalf D, Gough J, Grail D, Duhn AR., 1985 , Structure and expression of the mRNA for murine Granulocyte Macrophage Colony Stimulin Factor., *EMBO J.*, 4: 645-653.
- 86) Metcalf D., 1986 , The molecular biology and function of the Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor., *Blood* , 67: 257-267.
- 87) Mendoza RJ, Caceres CJ., 1986 , Evidencias de que al estimular a proliferar a fibroblastos y células epiteliales murinas producen el inductor de macrófagos y granulocitos (MGI) determinación del peso molecular de este factor, así como del producido por macrófagos y células mieloides estimuladas por el medio condicionado de fibroblastos., Tesis de licenciatura, ENEP Zaragoza, UNAM, México., pp. 1-5 y 13-17.
- 88) Goug NM., 1990 , The hematopoietic growth factor, Granulocyte Macrophage colony stimulating factor., En: Growth factor, differentiation factor and cytokines., Habenicht A (ed), Espringer-Verlag, Berlin, Alemania., pp. 177-187.
- 89) Scarfte JH, Metcalf D., 1990 , GM-CSF: The role of biologics in cancer and AIDS., Adelphi Communications LTP, Cheshire, UK., pp. 5-9.
- 90) Broxmeyer HE, Smithyman A, Eger RR, Meyers PA, De Sousa M., 1978 , Identification of lactoferrin as the granulocyte - derived inhibitor of colony stimulating activity production., *J. Exp. Med.*, 148: 1052-1067.

- 91) Broxmeyer HE, Bognacki J, Ralph P, Dorner MH, Lu L, Castro MH., 1982 , Monocyte-macrophage derived acidic isoferritins: normal feed back regulators of granulocyte macrophage progenitors cell *in vitro.*, Blood, 60: 595-607.
- 92) Tobler A, Miller CW, Norman AW, Koeffler HP., 1988 , 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ modulates the expression of a lymphokine (GM-CSF) posttranscriptionally., J. Clin. Inv., 81: 1819-1823.
- 93) Imperia PS, Chikkappa G, Phillips PG, 1984 , Mechanism of inhibition granulopoiesis by ethanol., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 175: 219-225.
- 94) Ruef C, Coleman DL., 1990 , Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor: Pleiotropic cytokine with potencial clinical usefulness., Reviews of Infections Diseases, 12: 41-61.
- 95) Mazur EM, Cohne JL, Wond GG, Clark SC, Wang EA., 1987 , Modest stimulating effect of recombinant human GM-CSF on colony growth from peripheral blood human megakaryocyte progenitor cells., Exp. Hematol., 15: 1128-1144.
- 96) Hamilton TA, Adams DO., 1987 , Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages., Immunol. Today., 8: 151-158.
- 97) Morrissey DJ, Bressler L, Chairier K, Alpert A., 1988 , Response of resident murine peritoneal macrophages to *in vivo* administration of Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor., J. Immunol., 140: 1910-1915.
- 98) Sisson SD, Dinarello CH., 1988 , Production of Interleukin 1 α , Interleukin 1 β , and Tumor Necrosis Factor by human mononuclear cells stimulated with Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor., Blood, 72: 1368-1374.
- 99) Paquette RL, Zhou JY, Yang YC., 1988 , Recombinant gibbon Interleukin-3 act synergistically with recombinant human G-CSF and GM-CSF *in vitro.*, Blood, 71: 1596-1600.
- 100) Chen BP, Clark CR, Chou TH., 1988 , Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor stimulates monocyte ant tissue macrophage proliferation and enhances their responsiveness to Macrophage Colony Stimulating Factor., Blood, 71: 997-1002.
- 101) Mayani VH., 1990 , Factores de crecimiento hamatopoyéticos, Ciencia y Desarrollo, XVI: 29-38.
- 102) Metcalf D., 1991 , Control of granulocyte and macrophage molecular, cellular and clinical aspects., Science, 254: 529-

- 103)** Crosier PS, Garnick MB, Clark SC., 1992 , Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor., En: Human Cytokines: handbook for basic and clinical research., Aggarwal BB, Gutterman JU (ed.), Blackwell Scientific Publications, Cambridge, Massachusetts, USA., Cap. 14, pp.238-252.
- 104)** Lopez AF, Elliot MJ, Woodcock J, Vadas MA., 1992 , GM-CSF, IL-3 and IL-5: Cross-competition on human haemopoietic cells., Immunology Today, 13: 495-500.
- 105)** Coffey RG, Davis JS, Djeu JY., 1988 , Stimulation of guanylate cyclase activity and reduction of adenylate cyclase activity by Granulocyte Colony Stimulating Factor in human blood neutrophils., J. Immunol., 140: 2695-2701.
- 106)** Bonnem EM., 1988 , Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) current status and future development., Seminars in Oncology, 15: 46-51.
- 107)** Agleitta M, Bussolino F, Piacibello W, Aprà F, Sanavio F., 1990 , Human GM-CSF *in vivo*: Identification of the target cells and of their kinetics of response., Int. J. Cell. Clon., 8: 283-292.
- 108)** Carrella AM, Gaozza E, Piatti G, Giordano D., 1990 , Clinical use of GM-CSF in autologous bone marrow transplantation., Int. J. Cell. Clon. 8: 279-282.
- 109)** Ozer H, Quesenberry P, Antman KH, Appelbaum FR., 1990 , **Current perspectives on GM-CSF**, The University of Washington School of Medicine and Fred Hutchinson Cancer Research Center., Boston, Massachusetts, USA. pp. 10.
- 110)** Scarffe JH., 1991 , Emerging clinical uses for GM-CSF., Eur. J. Cancer., 27: 1493-1504.
- 111)** Lieschke GJ, Burgess AW., 1992 , Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor., New England J. Med., 327: 99-106.
- 112)** Tapp H, Vowels M., 1992 , Prophylactic use of GM-CSF in pediatric marrow transplantation., Transplantation Proceedings., 24: 2267-2268.
- 113)** Burgess AW, Metcalf D., 1980 , Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemia cells., Int. J. Cancer., 39: 647-654.
- 114)** Nicola NA, Begley CG, Metcalf D., 1985 , Identification of the human analogue of a regulator that induces differentiation in murine leukemic cells., Nature., 314: 625-228.
- 115)** Welte K, Platzer E, Lu L, Gabilove JL, Ilevi E., 1985 , Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony stimulating factor., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82: 1526-1530.

- 116) Souza LM., 1992 , Granulocyte Colony Stimulating Factor., En: Human Cytokines: handbook for basic and clinical research., Aggarwal BB, Gutterman JU (ed.), Blackwell Scientific Publications, Cambridge, Massachusetts, USA., Cap. 13, pp.221-237.
- 117) Welte K, Platzer E., 1990 , Granulocyte colony stimulating factor., En: Growth factor, differentiation factor and cytokines., Habenicht A (ed), Espringer-Verlag, Berlin, Alemania., pp. 201-214.
- 118) Tsuchiya M, Asano S, Kaziro Y, Nagata S., 1986 , Isolation and characterization of the cDNA for murine granulocyte stimulating factor., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83: 7633-7637.
- 119) Nicola NA., 1987 , Granulocyte colony stimulating factor., Methods Enzymol., 116: 600-619.
- 120) Kanda N, Fukushige SI, Murotsu T, Yoshida MC, Tsuchiya M, Asano S, Kaziro Y, Nagata S., 1987 , Human gene coding for granulocyte colony stimulating factor is assigned to the q21-q22 region of chromosome 17., Somat. Cell. Mol. Genet., 13: 679-684.
- 121) Tsuchiya M, Kaziro Y, Nagata S., 1987 , The chromosomal gene structure for murine granulocyte colony stimulating factor., Eur. J. Biochem., 165: 7-12.
- 122) Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Kaziro Y, Yamazaki T, Yahamoto O, Hirata Y, Kobuta N, Oheda M, Nomura H, Ono M., 1986 , Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony stimulating factor., Nature., 319: 415-418.
- 123) Nicola NA, Metcalf D., 1981 , Biochemical properties of differentiation factors for murine myelomonocytic leukemia cells in organ conditioned media, separation from colony stimulating factor., J. Cell. Physiol., 112: 257-264.
- 124) Herman F, Cannistra SA, Griffin JD., 1986 , T cell monocytes interactions in the production of humoral factors regulating human granulopoiesis *in vitro.*, J. Immunol., 136: 2856-2861.
- 125) Zsebo KM, Yuschenkoff VN, Shiffer S, Chang D., 1988 , Vascular endothelial cells and granulopoiesis: Interleukin-1 stimulates releasing of G-CSF and GM-CSF., Blood; 71: 99-103.
- 126) Kaushansky K, Lin N, Adamson JW., 1988 , Interleukin-1 stimulates fibroblasts two synthesize granulocyte-macrophage and granulocyte colony stimulating factors., J. Clin. Invest., 81: 92-97.
- 127) Mendoza JF, Cáceres JR, Santiago E., 1990 , Evidence that G-CSF is a fibroblast growth factor that induces granulocytes to increase phagocytosis and to present a mature

morphology, and that macrophages secrete 45-kd molecules with these activities as well as with G-CSF like activity., *Experimental Hematology*, 18: 903-910.

128) Seelentay NK, Mermod JJ, Montesano R, Vassalli P., 1987 , Additive effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor α on the accumulation of the three granulocyte and macrophage colony stimulating factor mRNAs in human endothelial cells., *EMBO J.*, 6: 2261-2265.

129) Nicola NA., 1990 , Granulocyte colony stimulating factor., En: *Colony Stimulating Factors: Molecular and cellular biology.*, Eds. Dexter TM, Garland JM, Testa NG., Marcel Dekker., New York, USA. Cap. 3. pp. 77-110.

130) Metcalf D, Nicola NA., 1983 , Proliferative effects of purified granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) on normal mouse hemopoietic cells., *J. Cell. Physiol.*, 116: 198-206.

131) Uzumaki H, Okabe T, Sasaki N, Hagiwara K, Takaku F, Itoh S., 1988 , Characterization of receptor for granulocyte colony stimulating factor on human circulating neutrophils., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 156: 1026-1032.

132) Bussolino F, Wang JM, Defilipp P., 1989 , Granulocyte and granulocyte-macrophage colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate., *Nature*, 337: 471-473.

133) Uzumaki H, Okabe T, Sasaki N., 1989 , Identification and characterization of receptors for granulocyte colony stimulating factor on human placental and trophoblastic cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86: 9323-9326.

134) Berdel WE, Danhauser-Riedel S, Steinhauser G, Winton EF., 1989 , Various human haematopoietic growth factors (interleukin-3, GM-CSF, G-CSF) stimulate clonal growth of non hematopoietic tumor cells., *Blood*, 73: 80-83.

135) Avalos BR, Gasson JC, Hedvat C., 1990 , Human granulocyte colony stimulating factor: biological activities and receptor characterization on hematopoietic cells and small cell lung cancer cell lines., *Blood*, 75: 851-857.

136) Nicola NA, Peterson L., 1986 , Identification of distinct receptors for two hematopoietic growth factors (granulocyte colony stimulating factor and multipotential colony stimulating factor) by chemical crosslinking., *J. Biol. Chem.*, 261: 12384-12389.

137) Larsen A, Davis T, Curtis BM., 1990 , Expression cloning of a human granulocyte colony stimulating factor receptor: a structural mosaic of hematopoietin receptor, immunoglobulin and fibronectin domains, *J. Exp. Med.*, 172: 1559-1570.

- 138) Fugunaga R, Seto Y, Mizushima S, Nagata S., 1990 , Three different mRNAs encodin human granulocyte colony stimulating factor receptor., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87: 8702-8706.
- 139) Edery M, Jolicoeur C, Levi Meyruesis C., 1989 , Identification and secuence analysis of a second form of prolactin receptor by molecular cloning of complementary DNA from rabbit mammary gland., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 86: 2112-2116.
- 140) Fugunaga R, Ishizaka-Ikeda E, Seto Y, Nagata S., 1990 , Expression cloning of a receptor for murine granulocyte colony stimulating factor., Cell ., 61: 341-350.
- 141) Taga T, Hibi M, Hirata Y., 1989 , Interleukin 6 triggers the associations of its receptor with a posible signal transducer gp 130., Cell ., 58: 573-581.
- 142) Stanley ER, Guilbert LJ, Tushinski RJ, Baltelmez SH., 1983 , CSF-1 a mononuclear phagocyte lineage specific hemopoietic growth factor., J. Cell. Biochem., 21: 151-159.
- 143) Das SK, Stanley ER., 1982 , Structure function studies of a colony stimulating factor (CSF-1)., J. Biol. Chem., 257: 3679-13684.
- 144) Wong GG, Temple PA, Leary AC, Witek-Giannotti JS, Yang YG, Ciarletta AB, Chong M., 1987 , Human CSF-1: molecular cloning and expression of 4 Kb cDNA encoding the human urinary protein., Science., 235: 1504-1508.
- 145) Stanley ER., 1992 , Macrophage Colony Stimulating Factor., En: Human Cytokines: handbook for basic and clinical research., Aggarwal BB, Gutterman JU (ed)., Blackwell Scientific Publications, cambridge, Massachussets, USA., Cap. 12, pp. 196-220.
- 146) Baccarini M, Stanley ER., 1990 , Colony stimulating factor-1., En: Growth factor, differentiation factor and cytokines., Habenicht A (ed)., Espringer-Verlag, Berlin, Alemania., pp. 188-200.
- 147) Kawasaki ES, Ladner MB., 1990 , Moleccular biology of macrophage colony stimulating factor., En: Colony Stimulating Factors: Molecular and cellular biology., Eds. Dexter TM, Garland JM, Testa NG., Marcel Dekker., New York, USA. Cap. 5. pp. 155-176.
- 148) Pettenati MJ, LeBeau MM, Lemons RS, Shima EA, Kawasaki ES., 1987 , Assignment of CSF-1 to 5q 33.1 : Evidence for clustering of genes regulating haematopoiesis and for their involvement in the deletion of the long arm of a chromosome 5 in myeloid disorders., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84: 2970-2974.
- 149) Stanley ER, Hear PM., 1977 , Factors regulating macrophage production and growth: purification and some properties of colony stimulating factor from medium conditioned by L-Cells., J. Biol. Chem., 252: 4305-4312.

150) Ladner MB, Martin GA, Noble JA, Wittman VP, Warren MK, Mcgrogan M, Stanley ER., 1988 , cDNA cloning and expression of murine CSF-1 from L-929 cells., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85: 6706-6710.

151) Ralf P, Ladner MB, Wang AM, Kawasaki ES, McConlogue L, Weaver JF., 1987 , The molecular and biological properties of the human and murine members of the CSF-1 family., En: Webb DR, Pierce CW, Cohen S (eds), Molecular basis of lymphokine action., Human, Clifton, New Jersey, pp. 295-311.

152) Polland JW, Bartocci A, Arceci R, Orlofsky A, Ladner MB, Stanley ER., 1987 , Aparent role of the macrophage growth factor, CSF-1, in placental development., Nature., 330: 484-486.

153) Byrne PV, Guilbert LJ, Stanley ER., 1981 , Distribution of cells bearing receptor for a colony stimulating factor (CSF-1) in murine tissue., J. Cell. Biol., 91: 848-853.

154) Sherr CJ, Rettenmier CW, Sacca R, Rousel MF, Look AT, Stanley ER., 1985 , The *c-fms* proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1., Cell., 41: 665-676.

155) Rousel MF, Sherr CJ, Barker PE, Ruddle FH., 1983 , Molecular cloning of the *c-fms* locus and its assignment to human chromosome 5., J. Virol., 48: 770-773.

156) Coussens L, Van Beve C, Smith D., 1986 , Structural alteration of viral homologue of receptor proto-oncogen *fms* at carboxyl terminus., Nature., 320: 277-280.

157) Yarden Y, Vilrich A, 1988 , Growth factor receptor tyrosine kinases., Ann. Rev. Biochem., 57: 443-478.

158) Sherr CJ., 1988 , The *fms* oncogene., Biochem. Biophys. Acta., 948: 225-243.

159) Sherr CJ., 1990 , Colony stimulating factor-1 receptor., Blood., 75: 1-12.

160) Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS., 1991 , Cellular and molecular immunology., WB Saunders Company, USA., pp.417.

161) Rot A., 1992 , Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil amigration., Immunology Today., 13: 291-294.

162) Zucker-Franklin, Greaves MF, Grossi CE, Marmont AM., 1988 , Atlas of blood cells: function and pathology., Second edition., Vol. 1., Edi. Ermes. Milan, Italy., pp. 377.

163) Cline MJ., 1975 , The white cell ., Harvar University Press., Cambridge, Massachusetts, USA., pp.564.

- 164) Jandl JH., 1991 , Blood: pathophysiology., Blackwell Scientific Publications, Boston Massachusetts, USA., pp. 524.
- 165) Dougherty GJ, McBride WH., 1984 , Macrophage heterogeneity., J. Clin. Lab. Immunol., 14: 1-11.
- 166) Gordon S, Fraser I, Nath D Hughes D, Clark S., 1992 , Macrophages in tissues and in vitro., Current Opinion in Immunology., 4: 25-32.
- 167) Nathan CF., 1989 , Secretary products of macrophages., J. Clin. Invest., 79: 319-326.
- 168) Vadas MA, Lopez AF, Gamble JR, Elliot MJ., 1991 , Role of colony stimulating factors in leucocyte responses to inflammation and infection., Curren Opinion in Immunology., 3: 97-104.
- 169) Glasser L, Fiederlein R., 1987 , Functional differentiation of normal human neutrophils., Blood., 69: 937-944.
- 170) Lew PD., 1990 , Receptors and intracellelar signaling in human neutrophils., Am. Rev. Respir. Dis., 141: S127-S131.
- 171) Weisbart RH, Golde DW, Gasson JC., 1986 , Biosynthetic human GM-CSF modulates the number and affinity of neutrophil f-Met-Leu-Phe receptors., J. immunol., 137: 3584-3587.
- 172) Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM., 1992 , Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules., Immunology Today., 13: 93-100.
- 173) McKenzie SB., 1988 , Texbook of hematology., Lea & Febiger, Philadelphia, USA., pp. 507.
- 174) Bainton DF, Ulylot JL, Farquhar MG., 1971 , The development of neutrophilic polimorphonuclear leukocytes in human bone marrow., J. Exp. Med., 134: 907.
- 175) Lloyd AR, Oppenheim JJ., 1992 , Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response., Immunology Today., 13: 169-172.
- 176) Cline MJ., 1966 , Phagocytosis and synthesis of ribonucleic acid in human granulocytes., Nature., 212: 1431.
- 177) Jack RM, Fearon DT., 1988 , Selective synthesis of mRNA and proteins by human peripheral blood neutrophils., J. Immunol., 140: 4286-4293.

- 178)** Neuman E, Huleatt JW, Jack RM., 1990 , Granulocyte Macrophage colony stimulating factor increases synthesis and expression of CR1 and CR2 by human peripheral blood neutrophils, *J. Immunol.*, 145: 3325-3332.
- 179)** Lindemann A, Riedel D, Oster W, Meuer SC., 1988 , Granulocyte macrophage colony stimulating factor induces interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils, *J. Immunol.*, 140: 837-839.
- 180)** Lindemann A, Ridel D, Oster W, Loems HW., 1989 , Granulocyte macrophage colony stimulating factor induces cytokine secretion by human polymorphonuclear leukocytes, *J. Clin. Invest.*, 83: 1308-1312.
- 181)** Adams RP., 1980 , *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Netherlands., pp.51-56, 60, 70.
- 182)** Bol S., 1977 , Physical characterization cells by equilibrium density centrifugation., En: *Cell separation methods*, Elsevier/North Holland Biomedical Press., Amsterdam, Netherlands., pp. 41-52.
- 183)** Dewar C., 1978 , An improved method for isolation of granulocyte from peripheral blood., *J. Immunol. Methods.*, 20: 301-310.
- 184)** Schon-Hegrad MA, Holt PG., 1981 , Improved method for the isolation of purified mouse peritoneal macrophages., *J. Immunol. Methods.*, 43: 169-173.
- 185)** Moezzi J, Ali-Osman F, Murphy MJ., 1986 , Rapid method for permanent slide preparation of colonies in soft agar cultures., *Int. J. Cell. Clon.*, 4: 368-372.
- 186)** Yam LT, Li CY, Crosby HW., 1971 ; Cytochemical identification of monocytes and granulocytes., *Am.J. Cell. Pathol.*, 55: 283-290.
- 187)** Woessner S, Lafuente R, Florensa L., 1984 , La citología óptica en el diagnóstico hematológico., Ediciones Medici, Barcelona, España., pp. 455.
- 188)** Maggio ET., 1980 , *Enzyme-Immunoassay*, CRC Press, Florida, USA., pp. 295.
- 189)** Mora ML, Santiago E, Montesinos JJ, Weiss-Steider B., 1992 , Hypothesis: The target cell of GM-CSF is a macrophage precursor capable to produce cells with the property to secrete a G-CSF like activity., *Eur. Cytokine Netw.*, 3: 337-341.
- 190)** Ventura JG., 1992 , Efecto proliferador y diferenciador del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), a diversas concentraciones en la generación de colonias mixtas (granulocito-macrófago) a partir de células de médula ósea de ratón., Servicio Social, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza, UNAM, México., pp. 44.

191) Zambrano IR, Mendoza JF, Caceres JR, 1989 , Evidence that the macrophage-granulocyte inducer (MGI) is produced during cell proliferation, stored in G0, released en G1, cell specific, and induces the secretion of other colony-stimulating activities (CSA). *Exp. Hematol.*, 17: 267.

192) Viser JW, Van Bekkum DW., 1990 , Purification of pluripotent hemopoietic stem cells: past and present., *Exp. Hematol.*, 18: 248-256.

193) Metcalf D, Nicola NA., 1992 , The clonal proliferation of normal mouse hematopoietic cells: Enhancement and suppression by colony stimulating factor combinations., *Blood.*, 79: 2861-2866.

APENDICE A

Medio Mínimo Esencial de Eagle modificado por Dulbecco.

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

AMINOACIDOS	mg/l
L-Arginina	4.00
L-Cistina	62.57
L-Glutamina	584.00
Glicina	30.00
L-Histidina HCl H ₂ O	42.00
L-Isoleucina	05.00
L-Leucina	05.00
L-Lisina HCl	46.00
L-Metionina	30.00
L-Fenilalanina	66.00
L-Serina	42.00
L-Treonina	95.00
L-Triptófano	16.00
L-Tirosina (sal disódica)	104.20
L-Valina	94.00

VITAMINAS	mg/l
D-Ca pantotenato	4.00
Cloruro de Colina	4.00
Acido Fólico	4.00
Inositol	7.20
Nicotinamina	4.00
Piridoxal HCl	4.00
Rivoflavina	0.40
Tiamina	4.00

SALES INORGANICAS	mg/l
Cloruro de Calcio anhidro	200.00
Nitrato Férrico nonahidratado	0.10
Cloruro de Potasio	400.00
Sulfato de Magnesio anhidro	97.67
Cloruro de Sodio	6400.00
Fosfato monosódico monohidratado	125.00

OTROS COMPUESTOS	mg/l
L-Glucosa	4500.00
Rojo Fenol	15.00

Forma de prepararse: en 950 ml de agua pentadestilada se diluyen 13.4 g/l del MEMD en polvo (Sigma,USA), se adicionan 3.4 g/l de bicarbonato de sodio, además los antibióticos penicilina G 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml. Posteriormente se afora a un volumen de 1,000 ml, agitándose hasta disolverse sin sobre agitar . El medio se ajusta a un pH de 7.2 a 7.4; posteriormente se esteriliza con filtro de membrana de 0.22 µm en presencia de CO₂. Finalmente el MEMD se almacena a 4 °C hasta el momento de su uso.

APENDICE B

RPMI-1640

El medio se utilizó para mantener en condiciones fisiológicas estables a las células de la línea L-929 durante su cultivo. El siguiente listado proporciona los componentes del medio.

AMINOACIDOS	mg/l
L-Arginina (libre de base)	200.00
L-Asparagina (anhídrica)	50.00
L-Aspartico	20.00
L-Cistina 2 HCl	65.20
L-Acido glutámico	20.00
L-Glutamina	300.00
Glicina	10.00
L-Histidina (libre de base)	15.00
L-Hidroxiprolina	20.00
L-Isoleucina	50.00
L-Leucina	50.00
L-Lisina HCl	40.00
L-Metionina	15.00
L-Fenilalanina	15.00
L-Prolina	20.00
L-Serina	30.00
L-Treonina	20.00
L-Triptófano	05.00
L-Tirosina 2 Na	28.83
L-Valina	20.00
VITAMINAS	mg/l
Biotina	00.20
D-Pantotenato de calcio	00.25
Cloruro de colina	03.00
Acido fólico	01.00
Mio-Inositol	35.00
Niacinamida	01.00
PABA	01.00
Piridoxina HCl	01.00
Riboflavina	00.20
Tiamina HCl	01.00
Vitamina B ₁₂	00.005

SALES INORGANICAS	mg/l
Nitrato de calcio 4 H ₂ O	100.00
Cloruro de potasio	400.00
Cloruro de sodio	6000.00
Sulfato de magnesio	48.84
Fosfato de sodio dibasico (anhidro)	800.00
OTROS COMPUESTOS	mg/l
D-Glucosa	2000.00
Glutati3n reducido	01.00
Rojo fenol, Na	05.30
HEPES	5958.00

Forma de prepararse: en 950 ml de agua pentadestilada se diluyen 10.39 g de RPMI-1640 (Sigma,USA), se adicionan 2.0 g de bicarbonato de sodio, adem3s los antibi3ticos penicilina G 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml. Posteriormente se afora a un volumen de 1000 ml, agit3ndose hasta disolver sin sobre agitar. El medio se ajusta a un pH de 7.2 a 7.4 , y se esteriliz3 con filtro de membrana de 0.22 µm. en presencia de CO₂, finalmente el RPMI se almacena a 4°C hasta el momento de su uso.

APENDICE C

Solución Amortiguadora de Fosfatos.

Esta solución se usó para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos de tiempo. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes químicos se diluyen en un volumen final de 1000 ml de agua pentadestilada.

COMPONENTE	Grs
Cloruro de Magnesio	0.1
Cloruro de Calcio	0.1
Cloruro de Sodio	8.0
Cloruro de potasio	0.2
Fosfato monoácido de Sodio	2.16
Fosfato diácido de Potasio	0.2

En la mayoría de ocasiones se prescindió del cloruro de calcio y magnesio, estas sales no son indispensables para la finalidad en este trabajo. Las restantes sales se diluyen en 800 ml de agua bidestilada por agitación. Posteriormente se afora a un volumen final de 1,000 ml y esta solución se ajusta a un pH de 7.2 a 7.4. La solución amortiguadora se esterilizó usando filtros de membrana (millipore, USA) con un poro de 0.22 μm , finalmente la solución se almacena a una temperatura de 4 °C hasta el momento de su uso.

APENDICE D

TECNICA DE TINCION DE ALFA-NAFTIL ACETATO ESTERASA.

La técnica de identificación de esterases con alfa naftil acetato, se utilizó para identificar a células del linaje monocito-macrófago. Se basa en la actividad de ciertas enzimas hidrolíticas llamadas esterases presentes en estos tipos celulares, identificadas en base a una coloración marrón en el citoplasma (gránulos).

REACTIVOS.

1) Alfa-Naftil Acetato.

2) Solución fijadora

- | | |
|------------------------------|---------|
| a) Disolver acetato de sodio | 60 mg |
| b) en acetona | 60 ml |
| c) agregar agua destilada | 40 ml |
| d) agregar ácido acético | 0.07 ml |

Refrigérese (4-6 °C), estable por más de 2 meses.

3) Solución de pararosanilina:

- | | |
|----------------------------|-------|
| a) Disolver pararosanilina | 1 g |
| b) en solución de HCl 2N | 25 ml |

Disolver en caliente, filtrar cuando esté a temperatura ambiente, estable por 2 meses o más.

4) Solución de nitrito de sodio:

- | | |
|------------------------------|-------|
| a) Disolver nitrito de sodio | 1 g |
| b) en agua destilada | 25 ml |

Refrigérese (4-6 °C) durante 7 días, preparar nueva al término de este periodo.

5) Buffer de fosfatos 0.2 M con pH: 7.0 a 7.1:

a) Sol. A: 11.9 g de NaH_2PO_4 monohidratado (fosfato de sodio ácido) en 500 ml de agua destilada.

b) Sol. B: 14.1965 g de Na_2HPO_4 (fosfato de sodio dibásico) en 500 ml de agua destilada.

Mezclar 250 ml de Sol. B con 130 ml de Sol. A. Adecuar el pH entre 7.0 a 7.1 estable por varios meses (4-6 °C).

6) Hematoxilina de Meyer's:

Solución preparada (Sigma, USA).

6) Acetona (pura).

7) Suero fisiológico (NaCl al 0.9 %).

PROCEDIMIENTO.

- 1) Fijación de los extendidos en solución fijadora durante 1 min.
- 2) Lavar con suero fisiológico (dejar secar).
- 3) Se incuba durante 60 min en la siguiente solución:
 - a) 1 gota de sol. de nitrito de sodio (0.05 ml) y 1 gota de Sol. de pararosanilina (0.05 ml). Las dos soluciones se mezclan durante 1 min.
Se agrega 5 ml de buffer de fosfatos 0.2 M pH 7.0 a 7.1.
 - b) Diluir 10 mg de Alfa-naftil acetato en 0.2 a 0.3 ml de acetona, después agregar agitando 20 ml de buffer de fosfatos pH 7.0 a 7.1.
 - c) Mezclar las soluciones a y b, y filtrar.
- 4) Lavar con agua destilada.
- 5) Teñir 10-30 min. con Hematoxilina de Meyer's, lavar abundantemente con agua destilada.

APENDICE E

TECNICA DE ELISA (Enzime-Linked Immunoabsorbent Assay).

El ensayo depende de la unión del "antígeno" a la superficie de poliestireno de la inmunoplaaca (placa de 96 pozos tratada; Costar, USA), seguido por la incubación secuencial de soluciones conteniendo:

- 1) El anticuerpo específico.
- 2) El Segundo anticuerpo acoplado con enzima.
- 3) El sustrato de la enzima que produce una reacción de coloración, la cual es medida en espectrofotómetro como densidad óptica.

REACTIVOS

Solución amortiguadora de carbonatos (SAC) 1 M pH: 9.5.

Na ₂ CO ₃	7.0 g
NaHCO ₃	2.8 g
Agua destilada	1,000 ml

Solución amortiguadora de fosfatos (SAF) pH: 7.4 (NaCl 0.15 M, Fosfatos 0.01 M).

NaCl	8.77 g
Na ₂ HPO ₄ - 12 H ₂ O	2.70 g (1.4 g anhidro)
NaH ₂ PO ₄ - 2 H ₂ O	0.4 g
Agua destilada	1,000 ml

Tween al 0.1 % en SAF.

Tween 20	1 ml
SAF	999 ml

Solución de bloqueo (albúmina al 2 %).

Albúmina	2.0 g
SAF	100 ml

Solución amortiguadora de citratos (SACr), pH: 5.6.

Citrato de sodio	29.0 g
Acido cítrico	4.1 g
Agua destilada	1,000 ml

Sustrato para peroxidasa (prepararse al momento y mantener en obscuridad).

Orto-fenilendiamina (OPD)	0.006 g
Peróxido de hidrógeno al 3 %	100 µl
SACr	10 ml

Acido sulfúrico 2.5 N.

PROCEDIMIENTO

- 1) Introducir el antígeno a la inmunoplaaca diluido en SAC (100 µl). Incubar a 37 °C durante 1 h y toda la noche a 4 °C.
- 2) Lavar con solución Tween-SAF 4 veces.
- 3) Bloquear con SAF-albúmina incubando 1 h a 37 °C.
- 4) Lavar con solución Tween-SAF 4 veces.

- 5) Adicionar el primer anticuerpo diluido en SAF-albúmina (100 μ l/pozo); incubar 1.5 h a 37 °C.
- 6) Lavar con solución Tween-SAF 4 veces.
- 7) Adicionar el conjugado o secundario (anticuerpo-enzima) en la dilución adecuada, incubar 1.5 h a 37 °C.
- 8) Lavar con solución Tween-SAF 4 veces.
- 9) Adicionar el sustrato OPD (100 ml/pozo), y parar la reacción a los 10 min con H_2SO_4 (25 μ l).
- 10) Leer a 490 nm en espectro o lector de ELISA (Dynatech, USA).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la M. en C. Ma. de Lourdes Mora García y al Dr. Benny Weiss Steider por su asesoría y apoyo en la culminación de este trabajo.

De la misma forma agradezco al M. en IBSH Alberto Monroy García y al M. en C. Carlos Bautista Reyes por su revisión crítica del manuscrito.

Asimismo agradezco al M. en C. Edelmiro Santiago Osorio a quien respeto por su sencillez, consejos y calidad humana.

Además, expreso un profundo agradecimiento a todos los compañeros del Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer, quienes colaboraron en la realización de mi trabajo de Tesis.

También quiero darles las gracias a los Srs. Ranulfo Pedraza y José Chavarría por su colaboración técnica.