

6  
29.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

LABORATORIO DE DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER

EFFECTO DE FACTORES ACTIVADORES Y DIFERENCIADORES SOBRE EL GRANULOCITO-NEUTROFILO EN BANDA: DIFERENCIACION, FRAGMENTACION DEL ADN Y PRODUCCION DE M-CSF.

## T E S I S

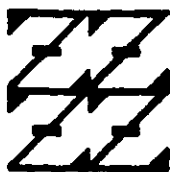
PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARCO ANTONIO BAUTISTA ACEVEDO

U N A M  
FES  
ZARAGOZA



LO HEMOS HECHO  
DE NUESTRA COLECCION

DIRECTOR: M. EN C. FABIAN FLORES BORJA.

ASESOR: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO.

MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

20955



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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 ACABO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACION EN DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER, DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA", UNAM., BAJO LA DIRECCION DE EL M. EN C. FABIAN FLORES BORJA Y EL ASESORAMIENTO DEL DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO.

## **DEDICATORIA**

**A mis padres**

**Jesús y Cirina quienes me han dado amor, cariño y su apoyo total**

**A mis hermanos**

**Gema, Omar, Araceli y Redames quienes siempre me han apoyado en la realización de mis metas, mismas que han sido las suyas.**

**A Carmen**

**por su cariño, comprensión y seguridad que siempre me ha brindado.**

**Al Sr. Domingo y a la Sra. Teresa**

**por su confianza y respeto.**

**A mis tíos**

**Joel, Felix, Gildardo, Hector y Andrés por su apoyo incondicional.**

**A....**

## AGRADECIMIENTOS

Especialmente a el Dr. Edelmiro Santiago Osorio por su apoyo en la realización de este trabajo y por sus consejos y sugerencias.

A el M. en C. Fabian Flores Borja por su apoyo incondicional y por sus comentarios y opiniones.

Al Dr. Benny Weiss Steider por haber creado el laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer y por sus sugerencias

A los miembros del jurado.

M. en C. Ma. de Lourdes Mora García.  
M. en C. Rosalva Rangel Corona  
M. en B. E. Enrique Mendieta Marquez.

Al Sr. Ranulfo Pedraza por su valiosa asistencia técnica

Así mismo a los compañeros y amigos del laboratorio por su gran apoyo incondicional .

A.....

## CONTENIDO

|  |           |
|--|-----------|
| RESUMEN .....  | 1         |
| MARCO TEORICO.....                                       | 2         |
| Hematopoyesis.....                                       | 2         |
| Factores que actúan sobre el granulocito-neutrófilo..... | 6         |
| Activación del linaje granulocítico.....                 | 9         |
| Necrosis y apoptosis. ....                               | 11        |
| <b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>                   | <b>16</b> |
| <b>HIPOTESIS.....</b>                                    | <b>17</b> |
| <b>OBJETIVOS.....</b>                                    | <b>17</b> |
| <b>MATERIALES Y METODOS.....</b>                         | <b>19</b> |
| MATERIAL BIOLÓGICO.....                                  | 19        |
| CONDICIONES DE CULTIVO.....                              | 19        |
| OBTENCION DE GRANULOCITOS.....                           | 19        |
| LISADO CELULAR Y OBTENCION DE MEDIOS CONDICIONADOS....   | 20        |
| CULTIVO CELULAR EN BICAPA DE AGAR.....                   | 21        |
| VIABILIDAD Y NUMERO CELULAR.....                         | 21        |
| FRAGMENTACION DEL ADN COMO ESTIMACION DE APOPTOSIS...    | 22        |
| <b>RESULTADOS.....</b>                                   | <b>23</b> |
| <b>DISCUSION.....</b>                                    | <b>33</b> |
| <b>CONCLUSION.....</b>                                   | <b>39</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>                                 | <b>40</b> |
| <b>APENDICE.....</b>                                     | <b>51</b> |
| <b>ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO .....</b>     | <b>56</b> |

## RESUMEN

Los granulocitos segmentados son las primeras células en migrar a los sitios de inflamación cuando existe una respuesta inmune, ante este fenómeno las células realizan diferentes funciones como la fagocitosis, producción de agentes citotóxicos, y moléculas como las interleucinas y factores estimuladores de colonias (CSF's).

Actualmente existen datos que indican que el granulocito segmentado produce moléculas como las interleucinas y los factores de crecimiento hematopoyético como el M-CSF, pero se ha visto que en estadios de banda el granulocito es incapaz de producir este último.

Debido a lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto del G-CSF, LPS, y Cas Na en la diferenciación y la producción de actividad formadora de colonias tipo CSF en granulocitos en banda provenientes de médula ósea de ratón.

Los resultados demostraron que los granulocitos en banda cuando son estimulados con los diferentes factores aceleran su diferenciación, y algo interesante fue haber observado que el Cas Na produce actividad diferenciadora similar al G-CSF. Por otro lado, el Cas Na induce la producción de actividad tipo M-CSF superior a cualquier otro agente utilizado y además acelera la apoptosis de estas células. En este trabajo se destaca al Cas Na como un agente que induce la diferenciación del granulocito en banda, la producción de factores que regulan la hematopoyesis como el M-CSF y la muerte celular programada.

Se discute finalmente la importancia del Cas Na como factor capaz de producir diferenciación y activación en el linaje granulocítico y la posibilidad de su uso como un factor terapéutico en enfermedades como la leucemia promielocítica, así como el papel que puede jugar en un posible modelo de regulación de diferentes tipos celulares como macrófagos y granulocitos durante un proceso de inflamación.

## MARCO TEORICO

### HEMATOPOYESIS.

La diferenciación celular es un fenómeno en el cual existen cambios fenotípicos y se adoptan nuevas características funcionales. La hematopoyesis (*haima*, sangre y *poyesis*, producción) es el proceso por el cual se da la formación de las células sanguíneas mieloides y linfoides funcionales. En el desarrollo embrionario se puede distinguir el fenómeno de formación de órganos u organogénesis en el cual se puede considerar la formación de la sangre como tejido y el de su regeneración fisiológica (William, 1991).

En el desarrollo embrionario la hematopoyesis tiene lugar en un inicio en el saco vitelino, donde un grupo de células origina a las precursoras totipotenciales o también denominadas madre, las cuales son transportadas a diferentes órganos como el hígado, bazo, timo y médula ósea para dar lugar enseguida a la proliferación y diferenciación de todos los linajes celulares que conforman la sangre (Eliseiv, 1988).

Las células hematopoyéticas en las primeras semanas de desarrollo en el saco vitelino, bazo e hígado fetal son principalmente eritroblastos y mielocitos. En el timo la porción epitelial comienza a poblarse de células totipotenciales que se diferencian posteriormente hasta linfocitos del timo donde proliferan en número dando lugar a los linfocitos T. A partir de la célula totipotencial en la médula ósea se comienzan a desarrollar todos los tipos celulares de la sangre al igual que tejido conjuntivo, de tal manera que el principal sitio de actividad hematopoyética de la vida posnatal donde se forman tanto las células del linaje mieloides y linfoides que circulan en la sangre periférica es la médula ósea, ya que los otros órganos o centros hematopoyéticos dejan de ser funcionales (McCullochh, 1978; Hughes, 1991).



El sistema hematopoyético se compone de tres compartimentos: el primitivo, conformado por las células más primitivas o totipotenciales; el progenitor, conformado por células comprometidas a un linaje maduro específico y, el maduro, compuesto de todas las células maduras de la sangre como son los macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, eritrocitos y linfocitos T y B (Klein, 1995; Ihle *et al.*, 1995). La proliferación y diferenciación de los distintos tipos celulares se denomina agregando el sufijo *citopoyesis*, por ejemplo: para eritrocitos eritropoyesis, para granulocitos granulocitopoyesis, para monocitos monocitopoyesis y para linfocitos linfocitopoyesis (Gordon & Barred, 1985).

Uno de los primeros investigadores en indagar sobre la célula totipotencial fue Maximov quien en 1923 formuló la noción sobre las células progenitoras de la sangre y consideró que por su morfología estas células se parecen a los linfocitos y por tal motivo estas células no pueden ser reconocidas fácilmente en la médula ósea (Eliseiv, 1988).

Los trabajos más contundentes en este aspecto fueron realizados por Till y Mc-Culloch, quienes al irradiar ratones normales y destruir sus focos hematopoyéticos observaron que éstos tenían una vida corta. Por otro lado, inyectando por vía intravenosa una suspensión de células de médula ósea de ratones sanos a ratones irradiados, encontraron que estos últimos no morían. Esto los llevo a realizar disecciones de los ratones a los 8 o 10 días después de ser inyectados, encontrando en el bazo colonias de células. Lo anterior les permitió concluir que el bazo es el sitio de residencia para las células totipotenciales inyectadas de ratones sanos y de aquí que las células progenitoras de estas colonias tengan el término de unidades formadoras de colonias del bazo (UFC-B) (Hess, 1978)

A partir de células totipotenciales pueden originarse todas las células que conforman la sangre. La célula totipotencial, da origen por un lado al linaje mielóide y por otro al linaje linfóide, esta primera es la conocida como UFC-B o unidad formadora de colonias de granulocitos, eritrocitos, macrófagos y megacariocitos (UFC-GEMM). En los distintos

niveles de maduración del linaje mielóide encontramos la participación de factores de crecimiento hematopoyético e interleucinas como la interleucina-3 (IL-3) y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) que actúan sobre las células primitivas o como el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) que actúan en las células progenitoras y maduras (Figura 1) (William *et al.*, 1977; Hogquist *et al.*, 1991).

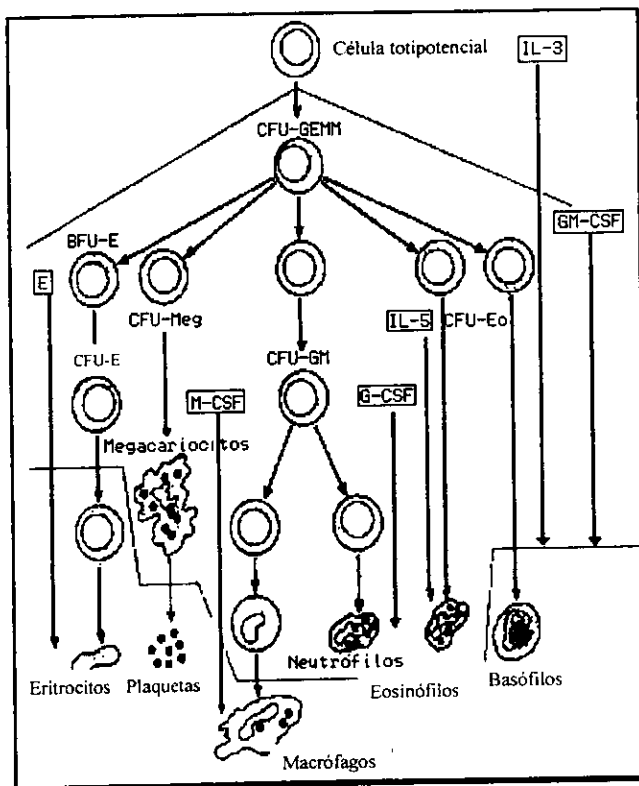


Figura 1. Diagrama de un modelo hematopoyético con interacción de las citocinas en los diferentes estadios de maduración. (tomado de Hamblin, 1993).

Los estudios en cuanto a los diferentes etapas o estadios por los cuales se forma el linaje granulocítico a partir de la célula totipotencial están muy bien establecidos y dentro de ellos tenemos a los precursores del neutrófilo capaces de proliferar como el mieloblasto, promielocito y mielócito los cuales permanecen siempre en la médula ósea. La forma en banda altamente comprometida y la segmentada son los últimos estadios de diferenciación y han perdido la capacidad de proliferar; ambos estadios están tanto en médula ósea como en sangre periférica, aunque la forma segmentada pasa poco tiempo en sangre y es predominantemente característica de tejidos (William, *et al.*, 1977 ; William, 1991) Figura 2.

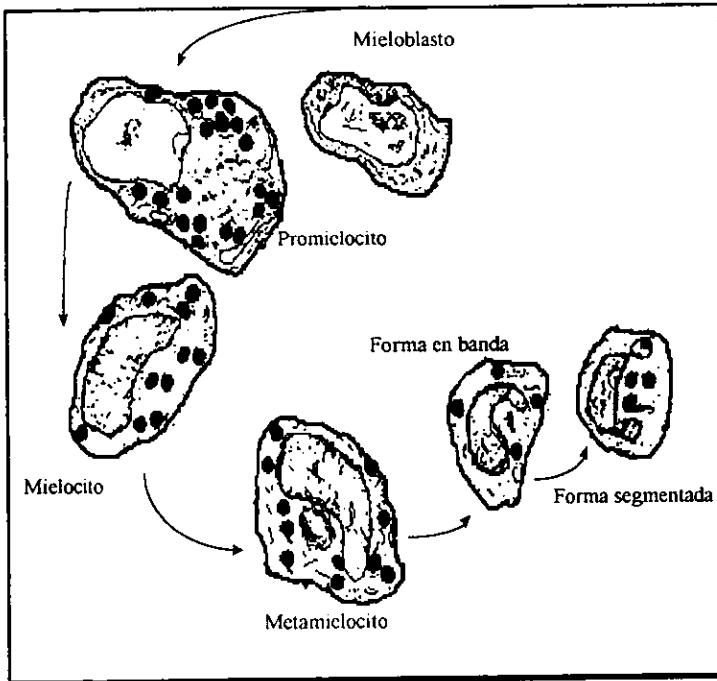


Figura 2. Estadios de diferenciación en la granulopoyesis a partir del mieloblasto o célula totipotencial (tomado de William *et al.*, 1977).

Las células sanguíneas se diferencian en glóbulos rojos (eritrocitos) y glóbulos blancos (granulocito-neutrófilos, monocito-macrófagos, megacariocitos, células asesinas o natural killer (NK), linfocitos T y B). Los glóbulos blancos circulan en la sangre y tienen la función principal de mantener al organismo libre de agentes patógenos tales como el polvo, virus, bacterias, protozoarios, hongos, células propias del organismo dañadas o muertas y células tumorales (Andrew & Lloyd, 1992). Así, en ausencia de estas células un individuo puede sólo vivir corto tiempo aún con la ayuda de antibióticos. En resumen, estos tipos celulares forman el sistema inmunológico de nuestro cuerpo (William, 1991; Flores *et al.*, 1992).

Las células sanguíneas por otro lado en su proceso de maduración, dependen de una gran variedad de moléculas, las cuales están involucradas en los procesos de proliferación y diferenciación, para dar como finalidad el fenómeno de hematopoyesis.

## **FACTORES QUE ACTUAN SOBRE LOS GRANULOCITOS-NEUTROFILOS.**

Sachs en Israel y Metcalf en Australia, de forma independiente dieron evidencias para suponer que la proliferación y la diferenciación hematopoyética estaba controlada por factores de naturaleza glicoproteica conocidos como factores estimuladores de colonias (CSF's) (Pluznik & Sachs, 1965; Bradley & Metcalf, 1966).

Actualmente, se sabe que los factores de crecimiento hematopoyético como el GM-CSF, M-CSF y el G-CSF son moléculas que actúan en las células multipotenciales y bipotenciales regulando la maduración de los diferentes linajes sanguíneos (Bennett *et al.*, 1996).

El diagrama de los factores que controlan la hematopoyesis se ha incrementado complejamente, y se ha encontrado que además de los factores estimuladores de colonias existen otras moléculas como interferón alfa (IFN- $\alpha$ ), interleucina 1 (IL-1) e Interleucina 6 (IL-6) que son capaces de actuar sobre los precursores hematopoyéticos (Brugger *et al.*, 1993). Se ha observado que IL-1 tiene un efecto sinérgico con los CSF's estimulando la proliferación y diferenciación de algunas células hematopoyéticas multipotenciales primitivas en la médula ósea (Stanley *et al.*, 1986; Warren & Moore, 1988). De igual forma se ha visto el mismo efecto para el factor inhibidor de la leucemia y el factor de células tallo (SCF del inglés stem cell factor), los cuales juegan un papel sinérgico en su proliferación (Imamura *et al.*, 1996). La combinación de factores de crecimiento con interleucina-4 (IL-4) ha demostrado que suprime la proliferación de células precursoras hematopoyéticas (Paschel *et al.*, 1987),

Recientemente se han encontrado otras moléculas que actúan de forma sinérgica en la proliferación de progenitores primitivos, como el ligando para el receptor FLT3/FLK2 (FL), el cual ha demostrado ser un potente estimulador del crecimiento de células de médula ósea comprometidas a granulocitos y macrófagos (Piacibello *et al.*, 1995).

Los CSF's son relativamente específicos en los estados finales de diferenciación de progenitores de las líneas celulares (Metcalf, 1986; Clark & Kamen, 1987), y se han propuesto dentro de un modelo determinístico en donde la diferenciación está gobernada por la presencia de estos factores de crecimiento hematopoyético (Valtieri *et al.*, 1987); aunque por otro lado, existen algunos datos que apoyan a un modelo estocástico en el cual las células mieloides presentan un programa establecido de su proceso de diferenciación que es independiente de los factores de crecimiento hematopoyético (Till *et al.*, 1964; Nakahata *et al.*, 1982; Farbairn *et al.*, 1993).

El G-CSF es miembro de la familia de los factores de crecimiento hematopoyético que controla de manera específica la sobrevivencia, proliferación y diferenciación de células

progenitoras y comprometidas al linaje granulocítico maduro (Cervantes *et al.*, 1991). También es capaz de inducir la diferenciación terminal en líneas de células leucémicas mieloides indiferenciadas (WEHI-3B D+ y 32Dc ) y causar una reducción en su potencial proliferativo (Burgess & Metcalf, 1980; Nicola *et al.*, 1983).

Por otro lado, el G-CSF se ha usado extensamente en el área de hematología oncológica, aunque numerosas cuestiones en cuanto su efecto en los procesos de la diferenciación son desconocidas (Yoshida, 1994). En el tratamiento de pacientes con leucemia mieloide aguda o en síndromes mielodisplásicos se ha usado el G-CSF para movilizar progenitores hematopoyéticos de la médula ósea a sangre periférica (Dombret, 1996) y la mayoría de los resultados en ensayos clínicos han demostrado la seguridad de este CSF's en la administración a pacientes, en los cuales no existe un riesgo sobre las células blasto. Además mismo muestra eficacia al acortar la duración de la neutropenia (agranulocitosis o falta de granulocitos) inducida por químicos como Metimazol y Propiltiouracil (Magner & Snyder, 1994). En pacientes con leucemia se ha visto que después que se someten a quimioterapia y se administra G-CSF el número de granulocitos en sangre periférica retorna a su concentración normal (Dombret, 1996; Bennett *et al.*, 1996).

A nivel del receptor para el G-CSF se ha visto que este juega un papel importante en la diferenciación y proliferación de células comprometidas hacia el linaje granulocítico (Kawaguchi *et al.*, 1985; Demetri & Griffin, 1991). En ratones con mutaciones en el gen del receptor para el G-CSF se presenta un decremento tanto en el número de neutrófilos en circulación como en el número de progenitores en la médula ósea, de manera que la expansión y diferenciación a partir de estos precursores hematopoyéticos es baja. Los granulocitos aislados de estos ratones muestran un incremento en la susceptibilidad a la muerte celular, sugiriendo que este receptor juega un papel importante en la transmisión de señales de diferenciación específica (Fukunaga *et al.*, 1993; Dong *et al.*, 1993). y asimismo para la sobrevivencia del granulocito. (Liu *et al.*, 1996).

Además del G-CSF se sabe que existen otras moléculas como el dimetil sulfóxido (Newburger *et al.*, 1979; Collins, 1987) y los retinoides que inducen la diferenciación hasta granulocitos de células de leucemia mieloblástica. con entrada subsecuente a una muerte celular programada como producto de esta diferenciación (Tosi *et al.*, 1994; Nagay *et al.*, 1995; Brackman *et al.*, 1995).

Por otro lado existen reportes que indican que P55Cdc y DR-nm23 son moléculas identificadas en células de mamífero, que se expresan durante la proliferación del linaje mielóide en etapas tempranas pero no en células maduras. La sobreexpresión de estas proteínas en células leucémicas dependientes de IL-3 como la 32Dcl13 inhiben la muerte celular programada en presencia de suero y factores de crecimiento hematopoyético como GM-CSF y G-CSF (Brach *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1993) inhibiendo la diferenciación hacia granulocitos con G-CSF, lo cual sugiere que estas moléculas están involucradas en la proliferación y diferenciación de células mieloides ( Kao *et al.*, 1996; Venturelli *et al.*, 1995).

## ACTIVACION DEL LINAJE GRANULOCITICO

Dentro de las células de nuestro sistema inmune, los granulocitos son las primeras células en migrar a tejido en respuesta a un agente patógeno invasor. Aunque son células altamente diferenciadas presentan escasos ribosomas y retículo endoplasmático. por lo cual se les consideró como células incapaces de sintetizar ARN y proteínas. Las actividades principales que realizan son la fagocitosis (Ivor & Maurer, 1990), producción de radicales libres (McCall *et al.*, 1991), agentes citotóxicos como mieloperoxidasa, catepsina G, lactoferrina (Rodel & Link, 1996), marcadores de superficie como vitronectina, fibronectina, CD36, lectinas (integrinas) (Williams *et al.*, 1991, Verfaillie *et al.*, 1991) y citocinas

(Cassatella, 1995). Así, la activación celular favorece algunas funciones importantes dentro de la actividad de los granulocito-neutrófilos.

Actualmente se ha encontrado que los granulocitos polimorfonucleares (PMN) bajo activadores *in vitro* con lipopolisacárido (LPS) ( Weersink *et al.*, 1994; Cassatella, 1995;) y GM-CSF (Lindeman *et al.*, 1987 ) e *in vivo* con LPS, caseinato de sodio (Cas Na) y tioglicolato (Lotem & Sachs, 1985) los PMN son capaces de producir ARN y proteínas (Granell-P *et al.*, 1979).

Otros productos que se han usado para la activación de diferentes tipos celulares son el aceite mineral, e infecciones por bacterias etc. *in vivo*, la activación celular generalmente se ha realizado por la administración de estos factores en la cavidad peritoneal de ratones para aumentar la migración de diferentes tipos celulares como granulocitos, monocito-macrófagos y linfocitos.

Dentro de las citocinas producidas por granulocitos PMN humanos de sangre periférica se encuentran el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), IL-1 (Herrman, 1988) IL-6 (Cicco *et al.*, 1990), interleucina 8 (IL-8), factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1), IFN- $\gamma$  (Cassatella, 1995). Más recientemente se han reportado las proteínas inflamatorias de macrófago 1 alfa y 1 beta (MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ ), las cuales son importantes quimiotácticas de macrófagos y subpoblaciones de células T (Cassatella, 1995; Yoshiaki *et al.*, 1995).

Por otra lado, se sabe que líneas celulares mieloides de estadio promielocítico como la HL-60, 32Dcl3 y NB4 y FDCP-Mix no producen citocinas en el estadio en el que se encuentran (Grande *et al.*, 1995) y que se diferencian a PMN con estímulos como ácido trans retinoico y G-CSF (y en terapias de pacientes con leucemia promielocítica) (Grande *et al.*, 1995; Suchard *et al.*, 1994; Katagiri *et al.*, 1996; Gianni *et al.*, 1995). Sin embargo en esta diferenciación a PMN se sintetizan moléculas como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y SCF (Gianni *et al.*, 1995; Grande *et al.*, 1995). Otros datos muestran que la línea celular de



leucemia crónica K562 en su diferenciación es capaz de producir una molécula de alrededor de 6-8 Kd, la cual presenta la propiedad de inhibir las funciones adherentes de PMN y actuar como un agente antiinflamatorio (Amar *et al.*, 1992).

La producción de citocinas es un fenómeno generalmente observado cuando los granulocitos presentan una forma madura y como producto de esta maduración la célula muere por un proceso de muerte celular programada.

## **NECROSIS Y APOPTOSIS EN GRANULOCITOS**

El control de la población celular de los sistemas vivos está regulada por un equilibrio de muerte y proliferación celular. Dentro de la muerte celular existen dos formas hasta ahora descritas en tejidos de vertebrados y en organismos pluricelulares, la muerte celular por necrosis o también llamada accidental y la muerte celular programada o apoptosis (Schulze *et al.*, 1994).

La muerte celular por necrosis es causada por cambios fuertes o repentinos como: la elevación de la temperatura (hipertermia), infecciones virales líticas, traumas físicos o químicos entre otros. En general, cuando las células mueren por necrosis sufren cambios morfológicos drásticos en la membrana, con lo cual las células son incapaces de realizar la homeostasis normal, y por lo tanto, pierden la capacidad para regular la presión osmótica y el flujo normal de iones, provocando de este modo un aumento de volumen en el cual la célula finalmente explota y consecuentemente muere. Cuando la membrana se rompe el contenido del citoplasma (núcleo y organelos) se vierte a los espacios extracelulares de los tejidos circundantes, provocando con esto una respuesta inflamatoria local (Ivor & Maurer, 1990).

La muerte celular por apoptosis es un importante mecanismo de regulación para mantener el tamaño de la población celular de manera natural, cuando se activa esta decrece la sobrevivencia celular. De hecho en ciertos tumores existe un decremento en la apoptosis, lo cual contribuye a casos de oncogénesis (Han *et al.*, 1995; Hicsonmez *et al.*, 1996). La apoptosis a diferencia de la necrosis puede ser producida o inducida por distintos factores bioquímicos e inhibida algunas veces vía fisiológica o bioquímica (John, 1993; Chitnis *et al.*, 1996).

Las características de la apoptosis han sido extensamente descritas. Así, Wyllie y Kerr fueron los primeros en proporcionar indicios de que la fragmentación del ADN es uno de los componentes de la apoptosis (Kaawabata *et al.*, 1994; Borthier & Nicklas, 1995) en el cual se activan endonucleasas (Schulze *et al.*, 1994). Durante el proceso de muerte celular programada la membrana citoplasmática se mantiene morfológicamente intacta, la cromatina se condensa progresivamente adoptando diferentes características morfológicas (Earnshaw, 1995; Cotteer *et al.*, 1994). Se sabe que los cuerpos apoptóticos son capaces de expresar marcadores de superficie, con lo cual la célula es reconocida por macrófagos o células endoteliales con la finalidad de ser eliminados, evitando de este modo una respuesta inflamatoria local (Kroemer *et al.*, 1995) (Figura 3).

En cuanto a la activación de las endonucleasas que llevan a cabo la fragmentación del ADN tenemos que en los granulocitos segmentados de sangre periférica la actividad de las endonucleasas es dependiente de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  y por otro lado en células multipotenciales o estadios menos diferenciados como células CD34<sup>+</sup> presentan únicamente dependencia de  $Mg^{2+}$ . Lo cual indica que existen cambios susceptibles por  $Ca^{2+}$  durante la diferenciación de precursores hematopoyéticos dependientes de  $Mg^{2+}$  (Anzai *et al.*, 1995).

En la hematopoyesis la célula totipotencial o pluripotencial prolifera y da origen a células precursoras comprometidas y estas células a su vez se dividen y maduran dando origen a todos los linajes sanguíneos conocidos. En este fenómeno, el balance entre la proliferación, diferenciación y apoptosis es el que mantiene la homeostasis en la hematopoyesis. (Squier *et al.*, 1995; Kozinets *et al.*, 1996). Además los granulocitos segmentados o PMN de sangre periférica y de los inducidos en cavidad peritoneal de ratón en condiciones *in vitro* presentan una vida media corta de alrededor de 22 y 24 h respectivamente (Colotta *et al.*, 1992) y posteriormente entran en un proceso de apoptosis (Han *et al.*, 1995; Delia *et al.*, 1992). Por el contrario, se ha visto que en algunos tipos celulares existe la proliferación desmedida que da inmortalidad a la célula y origina el desarrollo de neoplasias, de las cuales han aislado células para formar líneas celulares, como algunas líneas celulares leucémicas en donde existe la presencia de traslocaciones cromosómicas 8:21 que son la principal causa de esta proliferación. La administración de algunos compuestos como la dexametasona ha mostrado que disminuye la sobrevivencia de estas células, induciendo la apoptosis (Miyoshi *et al.*, 1997). Sin embargo la sobrevivencia del granulocito segmentado se ha extendido bajo la influencia de algunas citocinas como: IL-1, IL-6, TNF, GM-CSF, G-CSF, IFN- $\gamma$  y endotoxinas como LPS, las cuales incrementan la sobrevivencia y disminuyen el número de células apoptóticas (Colotta *et al.*, 1992; Brach *et al.*, 1992; Biffi, *et al.*, 1995; Hee *et al.*, 1995).

En la diferenciación de líneas celulares se sabe que a nivel genético existen algunos genes que regulan la sobrevivencia e inhiben la apoptosis como la familia de Bcl-2 (Delia *et al.*, 1992; Reed, 1994). El gen Bcl-2 es una molécula citoplasmática que prolonga la sobrevivencia celular por inhibición de la apoptosis (Boise *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1995; Sanz *et al.*, 1997), se expresa en estadios tempranos de diferenciación del linaje granulocítico e inhibe la apoptosis y permite la proliferación de células indiferenciadas, pero en células diferenciadas y en líneas inducidas a la diferenciación madura del linaje granulocítico y monocito-macrófago su expresión disminuye (Benito *et al.*, 1995), causando

con esto que las células reduzcan su capacidad de proliferación y entren subsecuente en apoptosis (Reed, 1994; Naumovski & Cleary, 1994; Sanz *et al.*, 1997). Así se ha observado que cuando se tratan líneas celulares como la promielocítica con ácido retinoico y vitamina D3 existen efectos sinérgicos en cuanto a la diferenciación, causando un decremento de la expresión de Bcl-2 y consecuentemente apoptosis (Elstner *et al.*, 1997).

La maduración del linaje mieloide parece requerir de la salida del ciclo celular, para desarrollar la diferenciación y la muerte celular. Bcl-2 está presente en las células indiferenciadas con la finalidad de mantener la sobrevivencia, por lo cual las funciones de Bcl-2 durante la diferenciación de mielocitos ha mostrado que la baja expresión del gen Bcl-2 en HL-60 no promueve la diferenciación (Vairo *et al.*, 1996). Así se ha corroborado que Bcl-2 está regulado independientemente de los procesos de diferenciación en el linaje mieloide (Naumovski & Cleary, 1994).

Otros genes como Notch disminuyen su expresión en los procesos de diferenciación del linaje granulocítico, pero este al ser sobreexpresado inhibe la diferenciación de estas y permite la proliferación de células indiferenciadas (Milner *et al.*, 1996).

Se han encontrado otros genes que inducen el fenómeno de apoptosis como Fas (Itoh *et al.*, 1991). Este gene expresa una molécula de superficie que puede inducir la apoptosis a diferencia del gen Bcl-2. En los procesos de diferenciación se ha visto que células progenitoras hematopoyéticas (CD34+) no expresan el antígeno Fas pero sí presentan expresión de Bcl-2. Sin embargo en células diferenciadas la expresión de Fas aumenta, lo cual indica que Fas puede ser expresado mediante fenómenos de diferenciación en células progenitoras hematopoyéticas mediante factores de crecimiento hematopoyético (Takenaka *et al.*, 1996). Así la inducción de Fas y la baja expresión de Bcl-2 mediante la diferenciación puede estar regulando la hematopoyesis. Por otro lado en casos de neoplasia hematológica se ha visto que existe una heterogeneidad en la expresión de Bcl-2 y Fas (DiGiuseppe *et al.*, 1996). En las células CD34+ aisladas de médula ósea cuando son

cultivadas con moléculas como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por 48 h se induce la expresión de Fas y estas mismas células al ser tratadas con el ligando Fas o anti Fas sufren apoptosis. puesto que se observa una disminución en la viabilidad celular, cambios morfológicos y fragmentación del ADN característicos de la apoptosis. Estos trabajos indican que TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  son reguladores hematopoyéticos negativos, que inducen la expresión de Fas en células progenitoras hematopoyéticas. Así, la supresión de la hematopoyesis mediada por factores reguladores negativos puede estar mediada en parte por Fas (Nagafuji *et al.*, 1995). Asi de forma general la diferenciación del linaje granulocítico tiene como punto final la entrada subsecuente a un fenómeno de apoptosis (Sakakura *et al.*, 1996) y la eliminación por células fagocíticas (Figura 3).

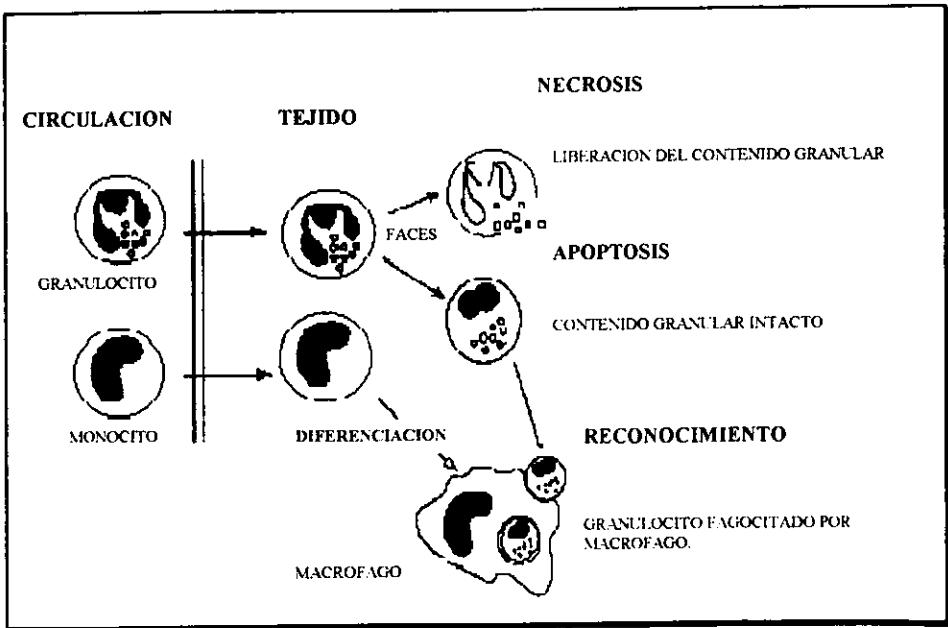


FIGURA 3. Eliminación de granulocitos polimorfonucleares senescentes por monócito-macrófagos (tomado de Lavin *et al.*, 1996 )

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Se ha visto en trabajos recientes que los granulocitos neutrófilos de sangre periférica cuando presentan una morfología segmentada producen una gran cantidad de citocinas como: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, TGF- $\beta$ 1, IL-6, IFN- $\alpha$  GM-CSF, M-CSF, G-CSF, IL-3, y más recientemente las proteínas MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ . Por otro lado, en el Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer de la FES Zaragoza se ha observado que los granulocitos de médula ósea en estadio promielocítico y en banda no producen actividad de M-CSF. Asimismo, se ha observado que los granulocitos de cavidad peritoneal de ratón cuando son estimulados con caseinato de sodio (agente inflamatorio) por 16 horas presentan una morfología segmentada y además una actividad de M-CSF (Ventura 1994). Considerando lo anterior, en este trabajo se estimularon a los granulocitos con morfología en banda con: Cas Na, G-CSF y LPS para evaluar a diferentes tiempos de cultivo la diferenciación hacia granulocitos-neutrófilos segmentados y la producción de actividad de M-CSF, así como su relación de este proceso con el fenómeno de apoptosis o muerte celular programada.

## **HIPOTESIS**

Los granulocitos neutrófilos después de su estadio de banda entran en su última etapa de diferenciación y presentan una morfología segmentada, y es aquí cuando tienen una actividad de M-CSF y una entrada a apoptosis . Además se sabe que cuando la cavidad peritoneal de ratón es inoculada con caseinato de sodio se acumulan en ella grandes cantidades de granulocitos segmentados que provienen de células en estadio de banda de la médula ósea . por lo que se espera que los granulocitos de estadio en banda provenientes de médula ósea cuando son estimulados con caseinato de sodio adquieran un estadio segmentado y en consecuencia serán capaces producir una actividad de tipo M-CSF y una entrada a un fenómeno de apoptosis .

## **OBJETIVOS**

### ***GENERAL.***

Establecer si los granulocitos neutrófilos al ser estimulados con caseinato de sodio se diferencian a un estadio segmentado y son capaces de secretar un factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), además de entrar en un proceso de apoptosis .

## ***PARTICULARES***

Evaluar la posible transición morfológica de granulocitos de un estadio de banda a segmentados con caseinato de sodio y compararlo con aquella inducida por G-CSF y LPS

Evaluar en función del tiempo de cultivo y en presencia de Cas Na, G-CSF y LPS la viabilidad y la transición morfológica de células de banda a segmentadas

Evaluar la presencia de M-CSF en lisados y medios condicionados de granulocitos en banda estimulados en presencia o ausencia de Cas Na, G-CSF y LPS en diferentes tiempos de cultivo.

Obtener células segmentadas a partir de células en banda estimuladas con Cas Na, G-CSF y LPS y evaluar la fragmentación del ADN como un indicador de la apoptosis.



## **MATERIAL Y METODO.**

### **MATERIAL BIOLÓGICO**

Se utilizaron ratones hembras de 2-3 meses de edad, de la cepa CD-1 como fuente de granulocitos a partir de médula ósea (estadio en banda) y cavidad peritoneal (estadio segmentado).

### **CONDICIONES DE CULTIVO.**

Se trabajó en una campana de cultivo, previamente limpiada con etanol al 70 %, y se esterilizó durante 20 minutos con luz ultravioleta; así mismo el material de cristalería utilizado se esterilizó en autoclave (Adams, 1980).

Para el cultivo de los granulocitos en banda de médula ósea y segmentados de cavidad peritoneal se utilizaron cajas petri de vidrio (Pyrex, USA) de 60 x 15mm y para las células progenitoras de médula ósea se utilizaron placas de plástico (Costar, USA) de 24 pozos. Las células sembradas se mantuvieron en incubadora a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire y humedad saturante. Para los cultivos celulares se utilizó el Medio RPMI-1640 (Gibco USA) (apéndice 1) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB. Hyclon, USA) (apéndice 3).

### **OBTENCION DE GRANULOCITOS**

Para obtener granulocitos en banda de médula ósea, se sacrificaron ratones por deservicación para extraer los fémures, y se colocaron enseguida en cajas petri con RPMI-

1640. El fémur se perforó en ambas epífisis y con una jeringa de 1 ml se hizo fluir RPMI suplementado al 10% con SFB para extraer las células totales de la médula ósea (leucocitos), la suspensión celular se centrifugó para obtener un botón celular, el cual se resuspendió en 2 ml de RPMI suplementado al 10% con SFB. Enseguida se paso por dos gradientes de densidad; el primero por Ficoll de 1.077 gr/ml por 30 min a 1500 rpm. del cual se obtuvo un botón y un anillo celular, el anillo que contenía células precursoras hematopoyéticas se eliminó y el botón se paso enseguida por Ficoll de 1.086 gr/ml por 20 min a 1500 rpm hasta obtener un botón y un anillo celular (Boyum, 1968). El botón que contenía macrófagos se eliminó y el anillo se lavó tres veces con RPMI para eliminar el exceso de Ficoll. Los granulocitos en banda se resuspendieron en un volumen conocido y se contaron en un hemocitómetro.

Para obtener granulocitos segmentados se inyectaron por 16 h en la cavidad peritoneal del ratón 1.5 ml de Cas Na al 10 % (agente inflamatorio), Después de este tiempo se sacrificaron los ratones por dislocación cervical y se extrajeron las células de la cavidad peritoneal mediante dos lavados de 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (apéndice 2) con jeringa. La suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min, obteniéndose un botón celular, el cual se resuspendió en RPMI suplementado al 10% SFB, y se incubó a 37°C por 2 h con el fin de adherir y eliminar macrófagos que son el primer contaminante. La suspensión de células de granulocitos se centrifugó para obtener un botón celular el cual se llevó a un volumen conocido para ser contado en un hemocitómetro.

## LISADO CELULAR Y OBTENCION DE MEDIOS CONDICIONADOS

Los granulocitos obtenidos de médula ósea (banda) se cultivaron en RPMI suplementado al 10% con SFB a una densidad de  $6 \times 10^6$  cel/ml a 24, 48, 72, 96 y 120 h en presencia o ausencia de 10 mg/ml de Cas Na al 10 %, 20 ng/ml de factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) recombinante humano con actividad de  $12.5 \times 10^7$  u/ml

(R&D Systems, USA) y 2 ng/ml de LPS. Las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min para separar por un lado los medios condicionados y por el otro un botón celular (células segmentadas). Los medios condicionados se conservaron a -70°C y de las células obtenidas se tomó una parte para colocarlas en viales de criopreservación en una proporción de  $25 \times 10^6$  cel/ml para ser lisadas por congelación y descongelación en nitrógeno líquido y otra parte de  $7 \times 10^6$  células para obtener ADN.

#### CULTIVO CELULAR EN BICAPA DE AGAR.

La inducción la formación de colonias o ensayos de bicapa en agar se llevó a cabo en cajas de cultivo de 24 pozos, la primera capa de agar contiene 0.2 ml de lisado o medio condicionado de granulocitos o 10ng/ml de factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) recombinante humano con actividad de  $6.25 \times 10^7$  U/ml ( Genzyme, USA), 0.3 ml de RPMI 1X, 0.2 ml de suero fetal de caballo (SFC), 0.2 ml de agar al 0.6% y 0.2 ml de RPMI 2X. La segunda capa de agar contiene, 2.5 ml de RPMI con una densidad de  $1 \times 10^5$  cel/ml (precuroras hematopoyéticas), 0.05 ml de SFC, 0.1 ml de agar al 0.3% y 0.1 ml de RPMI 2X. Después de 7 días de cultivo se evaluó la actividad formadora de colonias producida por los medios utilizados.

#### VIABILIDAD Y NUMERO CELULAR

Después de cada tratamiento la viabilidad celular se evaluó por incorporación de azul de tripano (apéndice 4), para lo cual se agregó una proporción 1:1, y se incubó a temperatura ambiente por 5 min, para después ser contadas en un hemocitómetro.

## FRAGMENTACION DEL ADN COMO ESTIMACION DE APOPTOSIS

La apoptosis fue identificada bajo los criterios de fragmentación del ADN, para lo cual se tomaron  $7 \times 10^6$  células en tubos Ependorff de los diferentes tratamientos en los diferentes tiempos de cultivo, posteriormente se lisaron con 1 ml de Buffer de lisis NTE (10 mM Tris/NaCl, 25 mM EDTA, pH 7.4 y Nonidet P-40 0.1% v/v). Los lisados celulares fueron tratados con proteinasa K (500  $\mu\text{g/ml}$ ) por 3 h a  $55^\circ\text{C}$  y a continuación se adicionó 200  $\mu\text{l}$  de la enzima ARNasa por 1 h, posteriormente se separó el ADN mediante una solución de cloroformo-fenol-alcohol isoamílico (25:25:1), en esta separación se colectó la fase superior en otro Ependorff y se precipitó con alcohol al 96% toda la noche a  $-20^\circ\text{C}$ . Enseguida se centrifugó la muestra a 14000 rpm para obtener un botón, éste se resuspendió en TE (10 mM de tris Cl y 1 mM de EDTA pH 7.6) y se incubó a  $65^\circ\text{C}$  para separar las cadenas del ADN, enseguida se corrieron muestras a 3  $\text{volt/cm}^2$  en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio y se observaron las muestras en un transiluminador de UV.

## ANALISIS ESTADISTICO.

Los ensayos de extracción, diferenciación, viabilidad y número celular se realizaron por cuatruplicado, de los datos obtenidos se obtuvo la media y la desviación estándar para someterlos a una prueba de ANDEVA o análisis de varianza. Los datos mostrados de la fragmentación de ADN son el resultado de cuatro ensayos independientes, del cual se tomo uno como representativo.

## RESULTADOS.

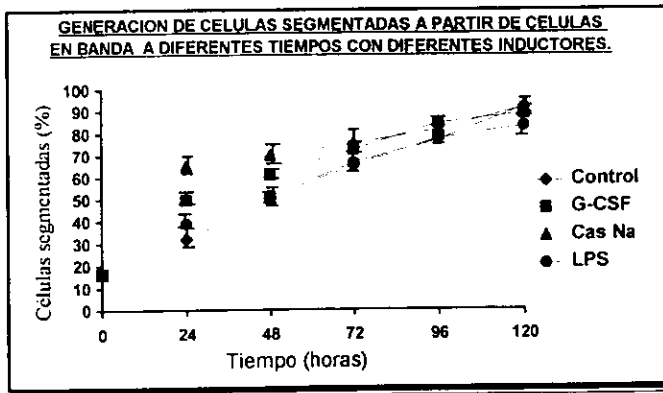
### MORFOLOGIA DE GRANULOCITOS DE MEDULA OSEA DESPUES DE SER CULTIVADOS A DIFERENTES TIEMPOS CON DIFERENTES INDUCTORES

Con la finalidad de obtener una población de células granulocíticas en estadio de banda con alto grado de pureza y homogeneidad las células totales de médula ósea, se separaron mediante dos diferentes densidades de Ficoll, el primero por 1.077g/ml y el segundo de 1.083 g/ml , obteniendo una población de granulocitos de un 94.8% de pureza. La mayoría de estas células eran de estadio en banda (78.9% de la población total). Los contaminantes principales (células no granulocíticas) encontrados fueron monocito-macrófagos (3.3%) y linfocitos (1.6%) (Tabla. 1) .

| ENSAYO | MACROFAGOS<br>%       | LINFOCITOS<br>%       | G. EN BANDA<br>%       | G.SEGMENTADOS.<br>%    | % PUREZA DE<br>GRANULOCITOS |
|--------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|
| 1      | 3.0                   | 1.0                   | 85.7                   | 10.3                   | 96.0                        |
| 2      | 3.9                   | 1.9                   | 78.5                   | 15.6                   | 94.1                        |
| 3      | 3.6                   | 0.9                   | 79.2                   | 16.2                   | 95.4                        |
| 4      | 2.9                   | 2.9                   | 72.3                   | 21.8                   | 94.1                        |
|        | $\bar{x}=3.3 \pm 0.4$ | $\bar{x}=1.6 \pm 0.9$ | $\bar{x}=78.9 \pm 5.4$ | $\bar{x}=15.9 \pm 4.7$ | $\bar{x}=94.8 \pm .95$      |

Tabla.1 .- Porcentajes de diferentes tipos celulares de cuatro purificaciones de leucocitos extraídos de médula ósea. G. ( granulocitos). % (porcentaje de células), x (media con desviación estandar). Para cada determinación se contaron 200 células por campo.

Una vez que se obtuvo una población altamente homogénea de granulocitos con morfología en banda, ésta se estimuló durante diferentes tiempos con inductores como LPS, Cas Na y G-CSF, con la finalidad de evaluar el efecto sobre el fenotipo celular. Observamos que en esta población, al ser cultivada sin inductores, aumentó la presencia de células segmentadas pasando de 16 % inicial a 32, 53, 70, 77 y 92% a las 24, 48, 72, 96 y 120 h respectivamente. Con LPS, en el mismo lapso de tiempo, se observan porcentajes de 39, 51, 66, 77 y 83 % de granulocitos segmentados y con el G-CSF de 49, 61, 72, 84 y 88%. El mayor efecto se obtuvo cuando se empleó Cas Na ya que se obtuvieron porcentajes de 64, 70, 75, 81 y 91 % (Gráfica 1).



Gráfica 1.- Porcentaje de células segmentadas a partir de células en banda. Control (sin inductor), G-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos), Cas Na (caseinato de sodio), LPS (lipopolisacárido).

El análisis fenotípico realizado mediante tinciones con colorante Giemsa muestra que las células sin estímulo y en presencia de LPS a las 48 h presentan una baja transición a células segmentadas (Figura 1A y 1D), sin embargo, cuando son estimuladas con G-CSF (Figura 1B) y Cas Na (Figura 1C) esta transición aumenta.

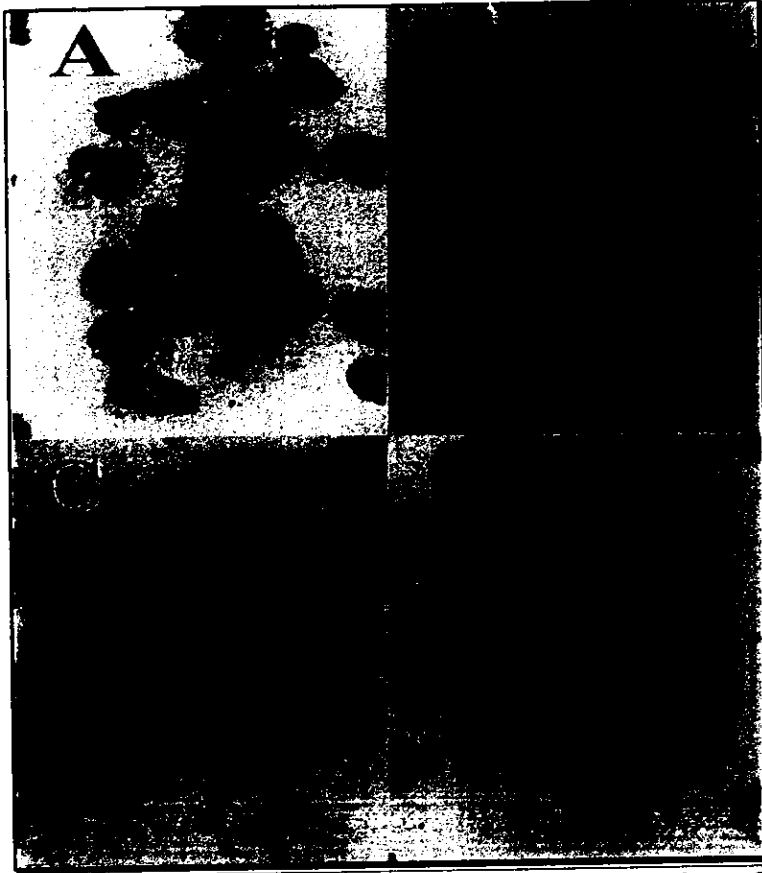
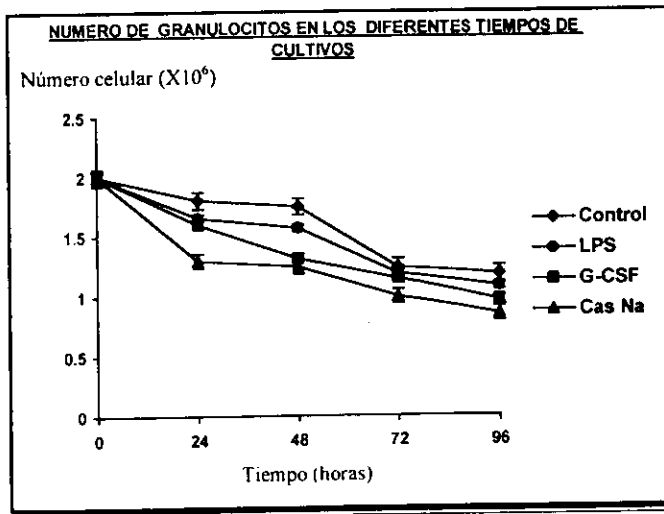


Figura 1.- Morfología de granulocitos a las 48 h. Sin inductores (A), con G-CSF (B), con Cas Na (C) y con LPS (D), aumento amplificación 400X .

## EFFECTO DE LOS INDUCTORES SOBRE EL NUMERO CELULAR Y VIABILIDAD DE GRANULOCITOS EN LOS DIFERENTES TIEMPOS DE CULTIVO.

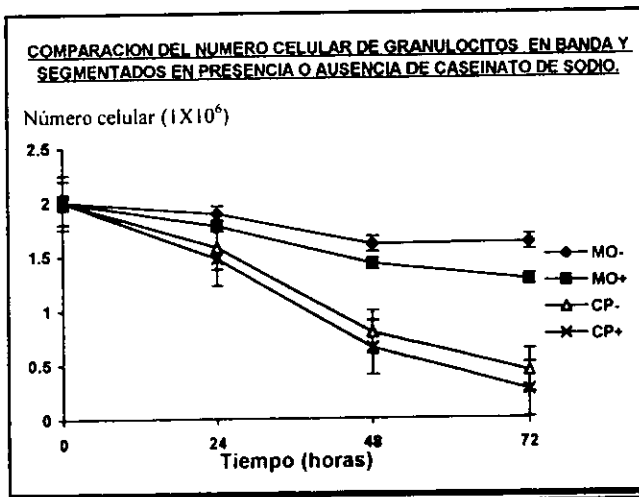
Una vez que observamos que las células segmentadas aumentan respecto a las células en banda y con la finalidad de determinar si éste es un proceso de diferenciación o de muerte celular selectiva, determinamos el número de cada tipo celular, así como su viabilidad a diferentes tiempos de cultivo. Se encontró que al sembrar  $2 \times 10^6$  cel/ml sin inductor se mantuvo un número celular semejante al inicial durante las primeras 48 h de cultivo disminuyendo posteriormente hasta las 96 h. En cambio con los diferentes inductores esta disminución se presentó desde las 24 h siendo mucho mayor para el Cas Na (Gráfica 2).



Gráfica 2 Número de células en los diferentes tiempos de cultivo. Control (sin inductor), G-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos), Cas Na (caseinato de sodio) y LPS (lipopolisacárido).

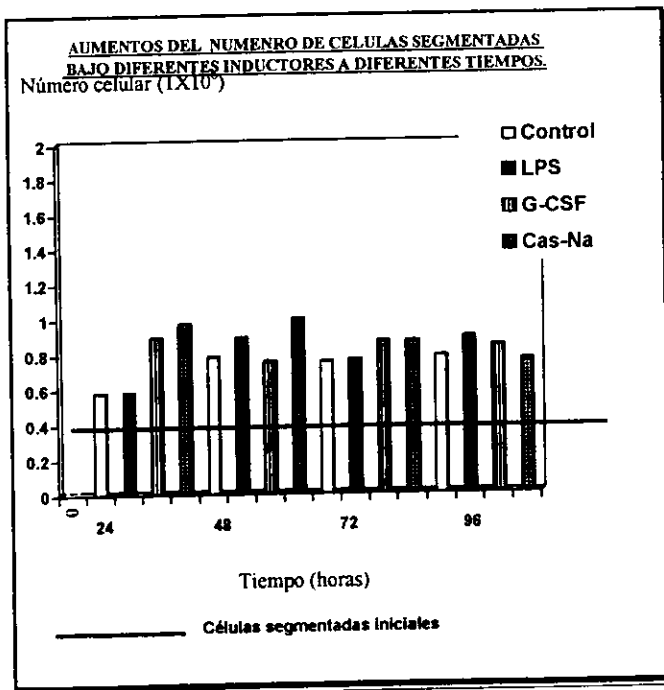


La disminución del número celular en un cultivo por lo general implica muerte celular, la pregunta que surge es cuál de los dos grupos celulares en nuestros cultivos en presencia de inductores está afectado o en que proporción las células en banda o segmentadas mueren. Para contestar esta pregunta, se realizó un ensayo para comparar la disminución de las células totalmente diferenciadas (segmentadas) y de menos diferenciadas (banda) con o sin estímulo de Cas Na *in vitro* en función del tiempo de cultivo. En este ensayo se encontró que al sembrar  $2 \times 10^6$  células, las segmentadas disminuyeron rápidamente con o sin estímulo hasta llegar a ser menos de  $4 \times 10^5$  a las 72 h, mientras que las células en banda mantienen un número semejante al inicial en ausencia de inductor y con poca disminución en presencia de éste (Gráfica 3). Este hecho corrobora lo esperado que las células que presentan una morfología madura o segmentada desaparecen más rápidamente de los cultivos por ser éstas las células terminales de la diferenciación, que las células en banda por ser éstas las más inmaduras.



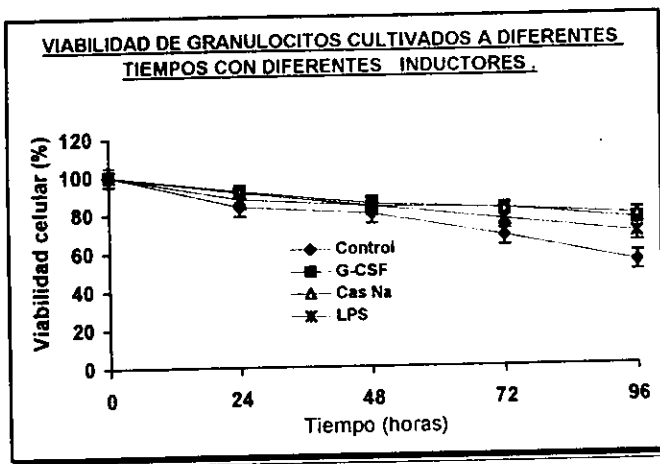
Gráfica. 3.- MO- (granulocitos en banda de médula ósea), MO+ (granulocitos en banda de médula ósea con caseinato de sodio), CP- (granulocitos segmentados de cavidad peritoneal), CP+ (granulocitos segmentados de cavidad peritoneal con caseinato de sodio).

Al relacionar los porcentajes de segmentación y el número celular, se puede conocer el número de células segmentadas presentes en los diferentes tiempos de cultivos en presencia o ausencia de los diferentes inductores. De esta forma se observa que al sembrar una densidad de  $2 \times 10^6$  cel/ml de médula ósea existe un número inicial de  $4 \times 10^5$  células segmentadas. Si ninguna célula en banda se diferencia, el valor de células segmentadas permanecería constante a lo largo del experimento, sin embargo, se observó un aumento en el número de células segmentadas principalmente con Cas Na. (Gráfica 4).



Gráfica 4.- Número de células segmentadas esperadas y observadas en relación con el número celular total.

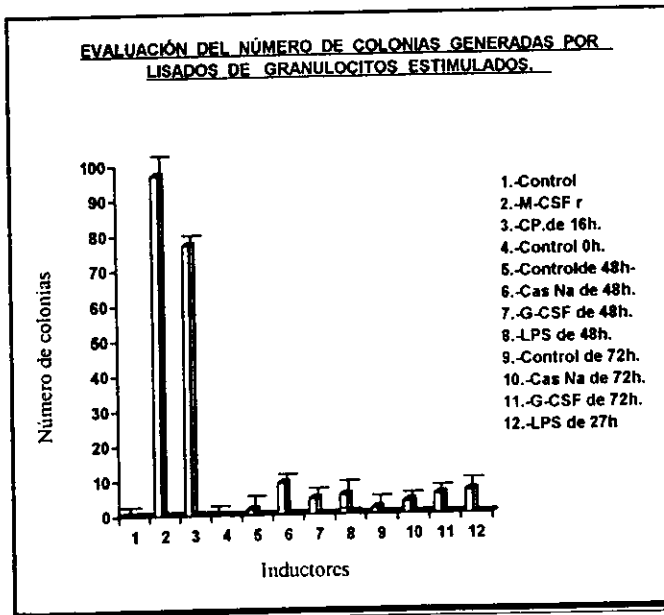
Además del fenotipo celular es importante evaluar la viabilidad de los granulocitos presentes en los diferentes tiempos de cultivo. Los resultados muestran que si consideramos la viabilidad de la población después haber sido purificada por Ficoll como de 100%, observamos que después de 96 h de cultivo sin inductores se reduce hasta un 61%. Por otro lado, encontramos que el G-CSF y el Cas Na estimulan en los granulocitos su viabilidad, más no el LPS ya que presenta a las 24, 48, 72 y 96 h porcentajes de viabilidad de 87, 86, 78 y 68% respectivamente; semejantes a los del control, mientras que Cas Na presenta porcentajes de 89, 89, 85, y 80% y G-CSF porcentajes de 90, 90, 85 y 78% respectivamente (Gráfica 5).



Gráfica 5.- Viabilidad de la población de granulocitos a diferentes tiempos con diferentes inductores. Control (sin inductor), G-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos), Cas Na (caseinato de sodio), y LPS (lipopolisacárido).

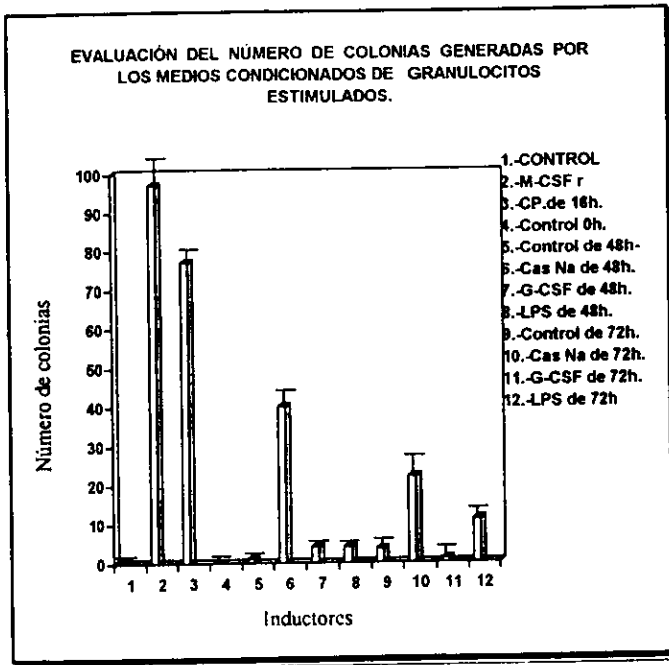
## ACTIVIDAD FORMADORA DE COLONIAS PROVENIENTES DE LOS LISADOS Y SOBRENADANTES DE LOS CULTIVOS DE GRANULOCITOS.

Una vez que se estableció que los granulocitos de morfología en banda se diferencian a segmentados con Cas Na y conociendo que las células segmentadas son capaces de producir M-CSF más no las en banda (Ventura, 1994), se procedió a evaluar si este proceso de diferenciación está acompañado de la producción de este tipo de factor. Con esta finalidad se tomaron tanto los medios condicionados como la fracción del citosol de granulocitos inducidos a la diferenciación con los diferentes factores hasta aquí empleados. Los datos observados muestran que a las 24 h de cultivo la fracción del citosol obtenida de los lisados de las células no estimuladas y tratadas con los diferentes inductores no tienen actividad formadora de colonias y los lisados a las 48 y 72 h presentan una baja actividad formadora de colonias de tipo macrófago (Gráfica 6).



Gráfica. 6.- Evaluación del número de colonias de macrófagos obtenidas por estimulación de lisado de células en cultivo. Control (sin inductor), M-CSFr (factor estimulador de colonias de macrófagos), CP. de 16 h (granulocitos de cavidad peritoneal estimulados por 16 h). Control 0h (granulocitos de médula ósea en tiempo inicial). Control 48 h (granulocitos sin estímulo por 48 h). Cas Na 48 h (granulocitos estimulados con caseinato de sodio por 48 h). G-CSF 48 h (granulocitos estimulados con factor estimulante de colonias de granulocitos por 48 h). LPS 48 h (granulocitos estimulados con lipopolisacárido por 48 h). Control 72 h (granulocitos sin estímulo por 72 h). Cas Na 72h (granulocitos estimulados con caseinato de sodio por 72 h). G-CSF 72h (granulocitos estimulados con factor estimulante de colonias de granulocitos por 72 h). LPS 72h (granulocitos estimulados con lipopolisacárido por 72 h)

Por otro lado, al evaluar la actividad de los medios condicionados de los cultivos de granulocitos tratados con los diferentes inductores por 24 h de cultivo, observamos que no existe actividad formadora de colonias, mientras que cuando se utilizó Cas Na tanto a las 48 como a las 72 h, se observa una fuerte actividad formadora de colonias. También se detecta un incremento aunque de menor magnitud a las 72 h para los medios condicionados de las células tratadas con LPS (Gráfica 7).



Gráfica. 7.- Evaluación del número de colonias de macrófagos obtenidas por estimulación con medios condicionados. Control (sin inductor), M-CSF (factor estimulador de colonias de macrófagos), CP de 16 h (granulocitos de cavidad peritoneal estimulados por 16 h) Control 0h (granulocitos de médula ósea en tiempo inicial), Control 48 h (granulocitos sin estímulo por 48 h), Cas Na 48 h (granulocitos estimulados con caseinato de sodio por 48 h), G-CSF 48 h (granulocitos estimulados con factor estimulante de colonias de granulocitos por 48 h), LPS 48 h (granulocitos estimulados con lipopolisacárido por 48 h), Control 72 h (granulocitos sin estímulo por 72 h), Cas Na 72 h (granulocitos estimulados con caseinato de sodio por 72 h), G-CSF 72h (granulocitos estimulados con factor estimulante de colonias de granulocitos por 72 h), LPS 72h (granulocitos estimulados con lipopolisacárido por 72 h).

## EVALUACION DE LA FRAGMENTACION DEL ADN COMO UN CRITERIO DE APOPTOSIS.

Es conocido que en el linaje granulocítico los procesos de diferenciación inducen la síntesis de nuevos factores hematopoyéticos como el M-CSF y promueven la entrada a un fenómeno de apoptosis. De acuerdo con lo anterior se consideró pertinente evaluar si los granulocitos segmentados que se producen bajo los diferentes inductores entran en un fenómeno de apoptosis. Tomando en cuenta la fragmentación del ADN como un criterio de apoptosis, en nuestros resultados encontramos que tanto las células en banda que se obtuvieron en un inicio de la purificación como las cultivadas sin estímulo durante 24h no presentan fragmentación del ADN (Figura 2 Carril 1 y 2 ). Por otro lado, las células en cultivo durante 48h sin estímulo presentan fragmentación del ADN (Carril 5). Los granulocitos en banda al ser estimulados con Cas Na o con G-CSF mostraron fragmentación del ADN en las primeras 24 h (Carril 3 y 4).

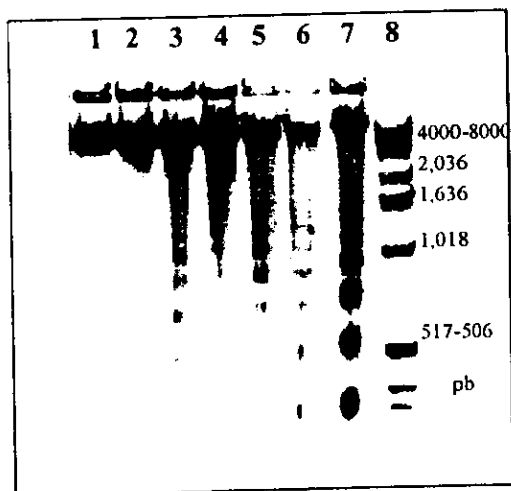


Figura 2.- Carril 1 células en banda de médula ósea; Carril 2 y 5 células en banda en ausencia de inductores a las 24 y 48 ; carril 3 y 6 células en banda estimuladas con Cas Na a 24 y 48h; carril 4 y 7 células en banda estimuladas con G-CSF a las 24 y 48 h; carril 8 marcadores de peso molecular (Ladder de 1Kb).

## **DISCUSION.**

Se sabe que la médula ósea tiene como finalidad la generación de células sanguíneas funcionales a partir de las células totipotenciales (Eliseiv, 1988; William, 1991). Los granulocitos se forman a partir de células mieloides totipotenciales hasta granulocitos segmentados de reserva para cuando son necesitados en algún sitio del organismo (William, 1991). Nuestros resultados muestran que el tipo celular mayoritario de la médula ósea es principalmente granulocitos de estadio en banda y en menor número granulocitos maduros segmentados. Tomando en consideración nuestro trabajo, encontramos que existen factores exógenos como el Cas Na y LPS que pueden diferenciar a células granulocíticas en banda hasta segmentadas. Nuestros resultados sugieren que el proceso de diferenciación puede llevarse a cabo fuera de la médula ósea. Para corroborar esto sugerimos un experimento en donde se marquen radioactivamente las células en banda de médula ósea de ratón y se evalúe mediante la inducción de Cas Na la diferenciación de estas células en banda dentro y fuera de la médula ósea.

Tomando en cuenta estos antecedentes y considerando que los granulocitos en banda no producen factores de crecimiento hematopoyético y que los granulocitos segmentados que llegan a la cavidad peritoneal por estímulo de Cas Na producen M-CSF, en este trabajo se demostró el efecto de factores activadores en la maduración y activación funcional de los granulocitos en banda de ratón.

Después de obtener poblaciones purificadas de células granulocíticas en banda de médula ósea, se evaluaron los efectos de G-CSF, LPS y Cas Na en los cambios morfológicos asociados con la diferenciación de estas células. De acuerdo con esto, encontramos que el granulocito en banda adquiere la forma típica madura segmentada en

condiciones normales de cultivo, lo que se correlaciona con un modelo hematopoyético instructivo, en donde no se necesita de factores activadores y diferenciadores para inducir la diferenciación, sino del programa intrínseco de las células para diferenciarse (Andrea, 1994; Rodel & Link, 1996); y además, este comportamiento sería de esperarse pues los granulocitos en banda son células altamente comprometidas que han perdido la capacidad de proliferar (William, 1991).

Se tiene bien definido que el estímulo con G-CSF induce la proliferación y diferenciación de granulocitos neutrófilos. En este trabajo se corroboró que el G-CSF lleva al granulocito en banda a adquirir una forma típica madura o segmentada en 24 h. Los datos anteriores se correlacionan con lo observado en líneas celulares como la 32Dc en donde la administración de G-CSF activa su diferenciación (Hamblin, 1993; Dombret, 1996); y con lo observado en pacientes con neutropenia (falta de neutrófilos) o pacientes sometidos a quimioterapia en los que la administración directa del G-CSF es capaz de restablecer el número normal de neutrófilos en circulación (Mangan *et al.*, 1991; Tosi *et al.*, 1994), lo cual reafirma el papel de este factor en la diferenciación. Sin embargo, en este trabajo encontramos que factores activadores son también capaces de inducir la diferenciación de células granulocíticas tal como Cas Na y LPS. Estos agentes estimulan a los granulocitos de morfología en banda a adquirir el fenotipo segmentado de manera acelerada, pero no con la misma intensidad, ya que el Cas Na hace que los granulocitos en banda adquieran una morfología segmentada en las primeras 24 h aún por arriba del G-CSF. Los datos anteriores muestran la existencia de nuevas moléculas que inducen la diferenciación como el caso del Cas Na, ya que irritantes como el LPS no tiene la misma actividad. Estos datos parecen indicar un programa de diferenciación intrínseca. Recomendamos por lo tanto que en próximos trabajos se evalúe la vía de señalización en la cual actúa el Cas Na en el proceso de diferenciación del granulocito.

Considerando que los porcentajes de células segmentadas que observamos en nuestros cultivos pudiera deberse a que las células segmentadas de un inicio del cultivo



sobrevivan y las de estadio en banda mueran, relacionamos los porcentajes de segmentación y número celular para descartar esta posibilidad y afirmar que existe un fenómeno de diferenciación. De acuerdo con esto, encontramos que efectivamente ocurre una diferenciación celular en los cultivos ya que existe un aumento de células segmentadas en los diferentes cultivos; y por otro lado, al comparar la viabilidad de las poblaciones de células segmentadas y de estadio en banda, encontramos que las células segmentadas tienen una menor viabilidad, lo cual nos indica que las células en banda son más viables y pueden diferenciarse hasta adoptar la característica segmentada. Los datos de viabilidad muestran un comportamiento similar a otros reportados e indican que tanto factores activadores como diferenciadores mantienen la viabilidad del linaje granulocítico (Colotta *et al.*, 1992, Brach *et al.*, 1992). Aunque es factible recomendar otras técnicas de evaluación de la viabilidad, ya que las reportadas son técnicas que toman en cuenta la integridad de la membrana celular, y existe la posibilidad de que la célula aunque mantenga la membrana intacta está este en un proceso de muerte celular programada, el cual tiene como característica mantener integra la membrana y expresar marcadores de superficie que sirven para el reconocimiento de células fagocíticas. Por otro lado, encontramos que en los tratamientos con los diferentes factores estimuladores se disminuye el número celular de la población inicial, aunque las células que permanecen en los cultivos son viables. Esto nos lleva a suponer que los diferentes factores inducen el cambio morfológico de las células de banda a segmentadas (más rápido con G-CSF y Cas Na) y a su vez este cambio induce la muerte celular, muy probablemente por un proceso apoptótico (Han *et al.*, 1995). A través de esto, se daría la oportunidad de que las células menos diferenciadas adquieran la forma segmentada y consecuentemente exista una disminución en el número celular.

Con la finalidad de determinar si la muerte de las células granulocíticas estimuladas con los diferentes inductores es debida a un proceso de apoptosis, evaluamos la degradación del ADN como un criterio de la ocurrencia de apoptosis. Nuestros resultados muestran que existe fragmentación del ADN para las células cultivadas sin inductor, pero este fenómeno se acelera con estímulos con G-CSF y Cas Na desde las 24 h de cultivo. Estos datos

indican que los factores utilizados promueven la diferenciación de granulocitos y muy posiblemente activan moléculas involucradas en el fenómeno de apoptosis, que a su vez aceleran la inducción de una muerte celular programada (Schulze *et al.*, 1994). Así también, los granulocitos maduros que llegan a la cavidad peritoneal de ratón por inducción de inflamación, entran en apoptosis (Brach *et al.*, 1992; Coxon *et al.*, 1996).

Los procesos de diferenciación de los granulocitos implican, además de cambios morfológicos, la adquisición de nuevas características funcionales entre las que se encuentran la fagocitosis, producción de radicales libres (McCall 1991) y citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, TGF- $\beta$ 1, IL-6, IFN- $\alpha$ ) (Lindeman *et al.*, 1981; Cassatella, 1995). En este trabajo se encontró que los granulocitos segmentados al ser estimulados con factores activadores como el G-CSF y LPS producen M-CSF, lo cual se correlaciona con datos previos que indican que el granulocito segmentado que llega a la cavidad peritoneal de ratón por inducción de un agente inflamatorio, produce principalmente actividad de tipo M-CSF (Ventura, 1994). Nuestros resultados muestran que Cas Na y no G-CSF activa fuertemente al granulocito a producir una actividad tipo M-CSF. Lo anterior indica que algunos factores activadores son capaces de estimular al granulocito en banda a diferenciarse y producir M-CSF y así también diferentes mecanismos de diferenciación que puede tomar el granulocito dependiendo del estímulo al cual es sometido. Estas observaciones se apoyan en algunos trabajos donde líneas celulares que se diferencian hacia el linaje granulocítico producen citocinas, pero ésta producción aumenta si se estimulan con factores activadores como el LPS (Grande *et al.*, 1995). Los datos anteriores nos indican que moléculas estimuladoras como el Cas Na activan mecanismos que aceleran la adquisición del fenotipo segmentado a partir del granulocito en banda y la fragmentación del ADN como una característica de la muerte celular programada, además de la producción de una actividad formadora de colonias tipo M-CSF.

Los datos obtenidos en este trabajo son interesantes y novedosos, ya que no existen reportes que indiquen que Cas Na pueda causar diferenciación en este tipo de células. Los

datos más comunes encontrados sobre el uso del Cas Na ha sido en relación a su utilización como agente inflamatorio en ratones con la finalidad de aumentar la migración de células que regulan la respuesta inmune como granulocitos, monocitos y linfocitos (Brummer *et al.*, 1986; Ventura, 1994). En este trabajo se demostró que Cas Na comparado con LPS y G-CSF es un fuerte activador del granulocito en banda. Estos datos nos hacen suponer que el Cas Na puede actuar sobre células más indiferenciadas que el propio granulocito en banda, por ejemplo, células leucémicas como la promielocítica mieloide que además, presenta una proliferación desmedida. Es probable que Cas Na induzca la diferenciación de éstas y a su vez cause la muerte celular programada y por lo tanto regule la población de granulocitos. Sorpresivamente, en este trabajo se encontró que un factor como Cas Na tiene la capacidad de diferenciar y producir factores de crecimiento hematopoyético, lo cual abre el campo de una posible aplicación de esta molécula en pacientes con deficiencia de M-CSF, sin necesidad de utilizar recombinantes de precio elevado. En este sentido recomendamos evaluar el efecto del Cas Na en la diferenciación o inhibición de la proliferación celular en líneas celulares leucémicas y además recomendamos realizar experimentos en ratones con problemas por deficiencia de M-CSF donde se pueda evaluar el papel del Cas Na en la producción de M-CSF, así como evaluar la dosis a la cual se presenten datos interesantes ya que el Cas Na es un fuerte agente tóxico.

Los datos obtenidos en este trabajo nos permiten proponer un modelo, en donde el Cas Na al igual que factores diferenciadores como G-CSF (Hogquist *et al.*, 1991) producen diferenciación hacia granulocitos maduros. En este caso, Cas Na actúa sobre el granulocito con morfología en banda acelerando la adquisición de la morfología segmentada, estadio en el cual se producen citocinas como M-CSF (Ventura, 1994). Se sabe que este M-CSF participa, por un lado, como quimiotáctico de monocito-macrófagos, amplificando la respuesta inmune al actuar en los sitios de inflamación; por otro lado, también participaría en la hematopoyesis estimulando a la célula totipotencial de médula ósea para dar origen a más células del linaje monocito-macrófago (Hogquist *et al.*, 1991). De este modo, el M-CSF regularía la producción de macrófagos que son el segundo tipo celular en llegar al sitio

inflamatorio. El granulocito estimulado con Cas Na entraría a su vez en un proceso de muerte celular programada, la cual tiene como función mantener a la célula intacta y no causar una reacción inflamatoria. En este proceso se ha visto que los granulocitos neutrófilos expresan moléculas de superficie como las integrinas, a través de las cuales son reconocidos y fagocitados por células como monocito-macrófagos (Savill *et al.*, 1989; Savill *et al.*, 1993). Con la eliminación de estas células se completaría o cerraría un circuito que tendría como finalidad eliminar a estas células senescentes y regular el estado inflamatorio provocado por éstas (Coxon *et al.*, 1996). Mediante este reconocimiento los macrófagos regulan la población de granulocitos apoptóticos (Figura 1).

Es conocido que los macrófagos producen G-CSF, ahora con nuestros resultados encontramos el hecho novedoso de que el granulocito produce M-CSF, lo cual nos permite hacer estudios sobre los mecanismos de regulación de estas células y sobre su utilización en situaciones donde G-CSF o M-CSF se encuentran disminuidos.

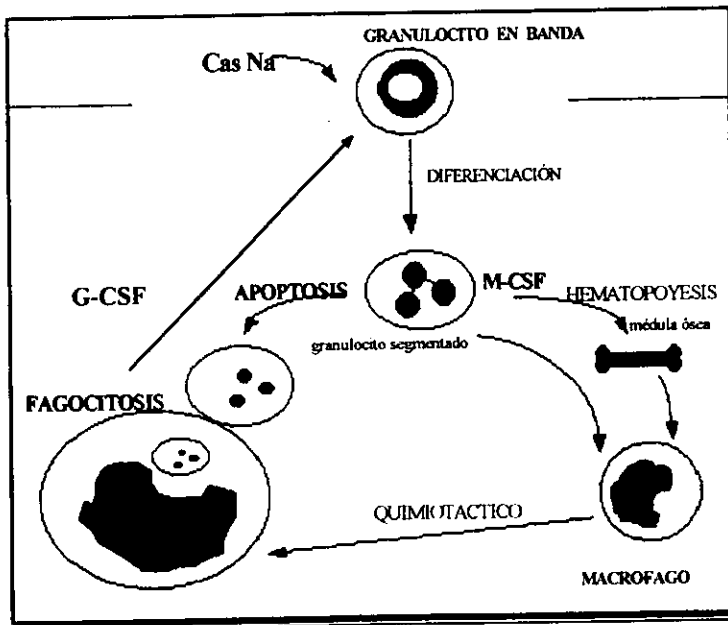


Figura 1.- Modelo de producción de M-CSF por activación del Granulocito en banda con caseinato de sodio y eliminación por apoptosis.

## CONCLUSION

Podemos concluir que los granulocitos con morfología en banda cuando son estimulados con los diferentes inductores aceleran la diferenciación hasta la forma segmentada o madura del granulocito, así también podemos decir que el Cas Na resultó ser un buen agente diferenciador similar al G-CSF. Como producto de esta diferenciación los granulocitos segmentados presentan un fenómeno de muerte celular programada o apoptosis el cual es característico de células senescentes y los granulocitos en banda al ser tratados con Cas Na producen una fuerte actividad de M-CSF, la cual no es observada con los tratamientos de G-CSF.

## **BIBLIOGRAFIA**

Adams R. (1980). Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Netherlands. 51-56

Amar M; Amit N; Scoazec J; Pasquier C; Babin-C; Huu T; Hakim J. (1992). K562 cells produce an anti-inflammatory factor that inhibits neutrophil functions in vivo. *Blood*. 80:1546.

Andrea A. (1994). Hematopoietic growth factors and the regulation of differentiative decisions. *Curr Opin Cell Biol*. 6: 804.

Andrew R; Lloyd J. (1992). Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol Today*. 13:169.

Anzai N; Kawabata H; Hiramata T; Masutani H; Ueda Y; Yoshida Y; Okuma M. (1995). Types of nuclear endonuclease activity capable of inducing internucleosomal DNA fragmentation are completely different between human CD34+ cells and their granulocytic descendants. *Blood*. 86:917.

Benito A; Grillot D; Nuñez G; Fernandez L. (1995) Regulation and function of Bcl-2 during differentiation-induced cell death in HL-60 promyelocytic cell. *Am J Pathol*. 146:481.

Bennett D; Smith T; Weeks J; Bredt A; Feinglass J; Fetting J; Hillner B; Somerfield M; Winn R. (1996). Use of hematopoietic colony-stimulating factors: the American Society of Clinical Oncology survey, The Health Services Research Committee of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 14: 2511.

Biffi W; Moore E; Moore F; Barnett C. (1995). Interleukin-6 suppression of neutrophil apoptosis is neutrophil concentration dependent. *J Leuk Biol*. 58:582.

- Boise L; Gonzalez G; Postema C; Ding L; Lindsten T; Turka L; Mao X; Nunes G; Thompson C. (1993). Bcl-x, a Bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*. 74: 597.
- Borther C; Nicklas B. (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol*. 5:21.
- Boyum A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood . *J Clin Lab Invest*. 21:77
- Brackman D. Lund F; Aarskog D. (1995). Expression of leukocytes differentiation antigens during the differentiation of HL-60 cells induced by 1,25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: comparison with the maturation of normal monocytic and granulocytic bone marrow cells. *J Leuk Biol*. 58: 547.
- Brach M; Vos S; Gruss H; Herrman F. (1992). Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood*. 11: 2920.
- Bradley T and Metcalf D. (1966). The growth of mouse bone-marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* 44:553.
- Brugger W; Mocklin W; Heimfeld S; Berenson R; Mertelsmann R; Kantz L. (1993). Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34 progenitor cells by stem cell factor , interleukin 1-β, IL-6, and IL-3, interferon-α and eritropoietin. *Blood*. 81: 2579.
- Brummer E; McEwen J; Stevens D. (1986). Fungicidal activity of murine inflammatory polymorphonuclear neutrophils: comparison with murine peripheral blood PMN. *Clin Exp Immunol*. 66:681
- Burgess A; Metcalf D: (1980). Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemic cell. *Int. J. Cancer*. 39:647.
- Cassatella M. (1995). The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunology Today*. 16:21.

- Cervantes S; Juárez S; Gerson C; Lira P; Díaz-M; Rivera L; Cárdenas S. (1991) Un nuevo modificador de la respuesta biológica. Efectividad como recuperador de la mielosupresión en pacientes de alto grado de riesgo que reciben esquemas agresivos de quimioterapia. *Cancerología*. 37:1415.
- Cicco N; Lindemann A; Content J; Vandenbussche P; Lubbert M; Gauss J; Mertelsmann J; Herrman F. (1990). Inducible production of interleukin-6 by human polymorphonuclear neutrophils: role of granulocyte/macrophage colony stimulating factor and tumor necrosis factor-alpha. *Blood*. 75:2049.
- Clark S. and Kamen R. (1987). The human hematopoietic colony-stimulating factor. *Science* 236:1229.
- Colotta F; Re F; Polentarusti N; Sozzani S; Montovani A. (1992). Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*. 80:2012
- Collins S. (1987). The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: Proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood*. 5: 1233.
- Cotter T.; Fernandes R; Verhaegen S; McCarthy J. (1994). Cell Death in the Myeloid Lineage. *Rev Immunol*. 142:93.
- Coxon A; Rieu P; Barkalow F; Asskari S; Mayadas T. (1996). A novel role for the B2 CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: A homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity*. 5:653.
- Chitnis D; Dickerson C; Munster A; Winchurch R. (1996). Inhibition of apoptosis in polymorphonuclear neutrophils from burn patients. *J Leuk Biol*. 59:835.
- Delia D; Arello A; Soligo D; Fontanella E; Melani C; Pezzella F; Pierotti D; Porota G. (1992). Bcl-2 proto oncogene expression in normal and neoplastic human myeloid cell. *Blood*. 79:1291.
- Demetri G; Griffin J; (1991). Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*. 78:2791.



- DiGiuseppe J; LeBeau P; Augenbraun J; Borowitz M. (1996). Multiparameter flow-cytometric analysis of bcl-2 and Fas expression in normal and neoplastic hematopoiesis. *Am J Clin Pathol.* 106:345.
- Dombret H. (1996). Granulocytic Colony-stimulating factors in the management of patients with acute myeloid leukemia. *Hematol Cell Ther* 38:231.
- Dong F; Brynes R; Tidow N; Welte K; Lowenbwrq B; Touw I. (1995). Mutation in the gene for the granulocyte colony-stimulating-factor receptor in patients with acute myeloid leukemia preceded by severe congenital neutropenia. *N Engl J Med.* 333:487.
- Earnshaw W. (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Cell Biol.* 7:337.
- Eliseiv V. (1988) *Histology.* Editorial Mir. Moscú. 584 pp.
- Elstner E; Linker M; Le J; Umiel T; Michl P; Said J; Binderup L; Reed J; Koeffler H. (1997). Synergistic decrease of clonal proliferation, induction of differentiation, and apoptosis of acute promyelocytic leukemia cells after combined treatment with novel 20-epi vitamin D3 analogs and 9-cis retinoic acid. *J Clin Invest.* 99:349.
- Fairbairn L; Cowling G; Reipert B; Dexterr T. (1993). Suppression of apoptosis allows differentiation and development of a multipotent hemopoietic cell line in the absence of added growth factors. *Cell.* 74:823.
- Flores F; Weiss B; Corona T; Velazquez M; Santiago E. (1992) El papel de la interleucina - 1 en la maduración de los glóbulos blancos. *T I P.* 2:19.
- Fukenaga R; Ishizaka I; Nagata S. (1993). Growth and differentiation signals by different regions in the cytoplasmic domain of granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Cell.* 74: 1079.
- Funakoshi S; Taub D; Anver M; Raziuddin A; Asai O; Reddy V; Rager H; Fanslow W; Longo D; Murphy W. (1997). Immunologic and hematopoietic effects of CD40 stimulation after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *J Clin Invest.* 99:484
- Gianni M; Norio P; Terao M; Falanga A; Marchetti M; Rambaldi A; Garattini E. (1995). Effects of dexamethasone on pro-inflammatory cytokine expression, cell growth and

- maturation during granulocytic differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. *Eur Cytokine Netw.* 6:157
- Gordon M; Barret M. (1885). *Bone marrow disorders. the biological basics the clinical problems.* London. England. Blackwell Scientific Publications. 20 pp.
- Grande A; Manfredini R; Tagliafrico E; Balestri R; Pizanelli M; Papa S; Zucchini P; Bonzi L; Bagnara G; Toreli U; Ferrari S. (1995). All-trans-retinoic acid induces simultaneously granulocytic differentiation and expression of inflammatory cytokines in HL-60 cells. *Exp Hematol.* 23:117.
- Granell-P.; Vassalli J.; Retch E. (1979). RNA and protein synthesis in human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med.* 149:284.
- Hamblin A. (1993). *Cytokines and cytokine receptors.* Oxford University Press. 90 pp.
- Hee J; Gileardi C; Rajapaska R; Kosek J; Peter L. (1995) Modulation of apoptosis in human myeloid leukemic cells by GM-CSF. *Exp Hematol.* 23: 265.
- Herrman F. (1988). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces interleukin-1 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol.* 140:837.
- Hess Ch. (1978).- *Hematología clinica.* Editorial Interamericana NY. 291 pp.
- Hicsonmez G; Erdemli E; Tekelioglu M; Tuncer A; Ozbek N; Cetin M; Cotter T. (1996). Morphologic evidence of apoptosis in childhood acute myeloblastic leukemia treated with high-dose methylprednisolone. *Leuk & Lymphoma.* 22:91.
- Hogquist K.A., Nett, M.A., Unanue, E.R. and David D.C. (1991). Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* vol. 88. pp. 8485-8489.
- Hughes N. (1991). *Lecture notes on hematology.* Fifth edition. Blackwell Scientific Publications. USA. 14 pp.
- Ihle J; Bruce A; Frederick W; Koh Y and Olli S. (1995). Signalling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 13:369.

- Imamura M; Zhu X; Han M; Kobayashi M; Hoshino S; Tanaka J; Kobayashi S; Asai M; Asaka M. (1996). In vitro expansion of murine hematopoietic progenitor cells by leukemia inhibitory factor, stem cell factor, and interleukin-1 beta. *Exp Hematol.* 24:1280
- Itoh N; Yonehara A; Ishii M; Yonehara S; Mizushima M; Sameshima A; Hase Y. 1991. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell.* 66: 233.
- Ivor D; Maurer S. 1990. Programmed cell death in tumors and tissues. Edit. Chapman and Hall. USA. 15 pp.
- John C. J. (1993). Mechanisms of apoptosis. *Immunol Today.* 106:110
- Kao C; Lin M; O'Shea-Greenfield A; Weinstein J; Sakamoto K. (1996). Over-expression of p53Cdc inhibits granulocyte differentiation and accelerates apoptosis in myeloid cells. *Oncogene.* 13: 1221.
- Katagiri K; Yokoyama K; Yamamoto; Omura S; Irie S; Katagiri T. (1996). Lyn and Fgr protein tyrosine kinase prevent apoptosis during retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL-60 cell. *J Biol Chem.* 271:11557.
- Kawabata H. Anzari N; Yoshida Y; Okuma M. (1994). A new method for quantitative estimation of the degree of DNA fragmentation utilizing agarose gel electrophoresis. *J Hematol.* 59: 311.
- Kawaguchi Y; Kobayashi M; Tanabe A. (1985). Granulopoiesis in patients with congenital neutropenia. *Am J Hematol.* 20:223.
- Klein, G. (1995). The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia.* 51:914.
- Kozinets G; Pogorelov V; Khazem G; Novoderzhkina I; Diagileva O. (1996). Physiological (programmed) cell death in hemopoiesis. *Klin Lab Diagn.* 1:35.
- Kroemer G; Petit P; Zamzami N; Vayssière J; and Bernard M. (1995). The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* 9:1277.

- Lavin M; Watters D; Song, Q. (1996). The role of protein activity in apoptosis. *Experientia*. 52: 979.
- Lindeman A; Rie D; Oster W; Meuer S; Blohm D; Mertelsman R; Herrmann F. (1987) Granulocyte- Macrophage colony-stimulation factor induces interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol*. 140: 837.
- Liu F; Wu H; Wesselschmidt R; Kornaga T; Link D. (1996). Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity*. 5:491.
- Lotem J; Sachs L. (1985). Independent regulation of myeloid cell growth and differentiation inducing proteins: *in vivo* regulation by compounds that induce inflammation. *Int J Cancer*. 35:93.
- Magner J; Snyder D. (1994). Methilmeazole-induced agranulocytosis treated with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) *Thyroid* 4:296.
- Mangan D; Welch G; Wahl S. (1991) Tumor necrosis Factor- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. *J.Immunol*. 146:1541
- McCall T; Palmer R; Moncad S. (1991). Induction of nitric oxide synthesis in human peripheral neutrophils and its inhibition by dexametasone. *Eur J Immunol*. 21:2523.
- McCullochh E. (1978). Stem cell functions and the clonal haemopathies of man. In stem cells and tissue homeostasis, *Brit. Soc. Cell Biol Symposium*. 2:139.
- Metcalf D. (1986). The molecular biology and functions of granulocyte-macrophage colony stimulationg factors. *Blood*. 67:257.
- Milner L; Bigas A; Kopan R; Breshem S; Bernstein Y; Martin D. (1996). Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1. *Proc Natl Acad Sci*. 93: 13014.
- Miyoshi H; Ohki M; Nakagawa T; Honma Y. (1997). Glucocorticoids induce apoptosis in acute myeloid leukemia cell lines with A t(8;21) chromosome translocation. *Leuk Res*. 21:45.

- Nagafuji K; Shibuya T; Harada M; Mizuno S; Takenaka K; Miyamoto T. (1995). Functional expression of Fas antigen (CD95) on hematopoietic progenitor cells. *Blood* 86:883.
- Nagy L; Thomazy V; Shipley G; Fesus L; Lamph W; Heyman R; Chandraratna R; Davies P. (1995). Activation of retinoid X receptors induces apoptosis in HL-60 cell lines. *Mol Cell Biol.* 15:3540
- Nakahata T; Gros A; Ogawa M. (1982). A stochastic model self renewal and commitment to differentiation of the primitive hemopoietic stem cell in culture. *J Cell Physiol.* 113:455.
- Naumovski L. and Cleary M. (1994). Bcl-2inhibits apoptosis asociated with terminal differentiation of HL-60 myeloid leukemia. *Blood Cells.* 83:2261.
- Newburger P; Chovaniec J; Greenberger J. (1979). Funtional changes in human leukemic cell line HL-60: A model for myeloid differentiation. *J Cell Biol.* 82: 315.
- Nicola N; Metcalf D; Matsumoto M; Jhonson R. (1983). Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells: identification as granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *J Biol Chem.* 258:9017.
- Park J; Berstein J; Hockenbery D. (1995). Primitive human hematopoietic precursors express Bcl-x but not Bcl-2. *Blood.* 86: 868.
- Paschel C; Paul W; Ohara J; Green Y. (1987). Effects of B cells stimulation factor-1/interleukin-4 on hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 70:254.
- Patel G; Tantravahi R; Oh I; Reddy E. (1996). Transcriptional activation potential of normal and tumor-associated myb isoforms does not correlate with their ability to block G-CSF-induced terminal differentiation of murine myeloid precursor cells. *Oncogene.* 13:1197.
- Piacibello W; Fubini L; Sanavio F; Brizzi M. (1995). Effects of human FLT3 ligand on myeloid leukemia cell growth: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. *Blood.* 86: 4105.

- Pluznik D and Sachs L. (1965). The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J Cell Comp Physiol* 63:319.
- Reed J. (1994). Bcl-2 and regulation of programmed cell death. *J Cell Biol.* 124:1.
- Roche H. (1994). Colony stimulating factors in blood formation. *Insfusionsther Transfusionsmed.* 21:51.
- Rodel J and Link D. (1996). Suppression of apoptosis during deprivation of 32D cells is not sufficient to induce complete granulocytic differentiation. *Blood.* 87:858.
- Rubin H. (1985). Protective effect of casein toward *Salmonella typhimurium* in acid-milk. *J Appl Bacteriol.* 58:251.
- Sakakura C; Sweeny E; Shirahama T; Hakomon S; Igarashi Y. (1996). Suppression of Bcl-2 gene expression by sphingosine in the apoptosis of leukemia HL-60 cell during phorbol ester -induced terminal differentiation. *FEBS letters.* 378:177.
- Sanz C; Benito A; Silvia M; Albella B; Richard C; Segovia J; Insunza A; Bueren A; Fernandez J. (1997). The expression of Bcl-x is downregulated during differentiation of human hematopoietic progenitor cells along the granulocyte but not the monocyte/macrophage lineage. *Blood.* 89:3199.
- Savill J; Fadok V; Henson P; Haslett C. (1993). Phagocyte recognition of cell undergoing apoptosis. *Immunol Today.* 14: 131.
- Savill J; Henson P; Haslett C. (1989). Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge sensitive" recognition mechanism. *J Clin Invest* 84: 1518.
- Schulze O; Walczak H; Dröge W; Krammer P. (1994). Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol.* 127:15.
- Sharp AK; Banerjee DK. (1986). Effect of gamma interferon on hydrogen peroxide production by cultured mouse peritoneal macrophages. *Infect Immunol.* 54:597

- Shinagawa T; Nunoi H; Nonoyama S; Kanegasaki S. (1995). Induction of CD40 in promyelocytic HL60 cells cultured with retinoic acid and/or various cytokines. *J. Biochem.* 118:534.
- Squier M; Sehnert A; Cohen J. (1995). Apoptosis in leukocytes. *J Leuk Biol.* 57:2.
- Stanley E; Bartocci D; Patinkin M; Rosendahl and Bradley T. (1986). Regulation of variety primitive, multipotent hemopoietic cell by hemopoietic-1. *Cell.* 45:667.
- Suchard S; Monsfeld P; Dixit V. (1994). Modulation of thrombospondin receptor expression during HL-60 cell differentiation. *J Immunol.* 22:877.
- Takenaka K; Nagafuji K; Harada M; Mizuno S; Miyamoto T; Makino S; Gondo H; Okamura T; Niho Y. (1996). In vitro expansion of hematopoietic progenitor cells induces functional expression of Fas antigen (CD95). *Blood.* 88:2871.
- Till J; McCulloch E; Siminovitch L. (1964). A stochastic model of stem cell proliferation based on the growth of spleen colony-stimulating factors. *Science.* 236:1229
- Tosi P; Visani G; Gibellini D; Zauli G; Ottavian E; Cenacchi A. (1994). All-trans retinoic acid and induction of apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. *Leuk & Lymphoma.* 14:503.
- Vairo G; Innes K; Adams J. (1996). Bcl-2 has a cell cycle inhibitory function separable from its enhancement of cell survival. *Oncogene.* 13:1511.
- Valtieri M; Tweardy D; Caracciolo D; Jhonson K; Mavilio F; Altmann S; Santoli D; Rovera G. (1987). Cytokine-dependent granulocytic differentiation: Regulation of proliferative and differentiative responses in a murine progenitor cell line. *J Immunol.* 138:3829
- Ventura J. (1994). Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) inducidos en cavidad peritoneal de ratón son capaces de producir una actividad formadora de macrófagos. FES ZARAGOZA. UNAM México, Tesis para alcanzar el título de biólogo. 74 pp.
- Venturelli D; Martínez R; Melotti P; Casella I; Peschle C; Cucco C; Spampinato G; Darzynkiewicz Z; Calabretta B. (1995). Overexpression of DR-nm23, a protein encoded by

a member of the nm23 gene family, inhibits granulocyte differentiation and induces apoptosis in 32Dc13 myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:7435

Verfaillie C; McCarthy; McGlave. (1991). Differentiation of primitive human multipotent hematopoietic progenitors into single lineage colonogenic progenitors is accompanied by alterations in their interactions with fibronectin. *J. Exp Med.* 174: 693.

Warren D. and Moore M. (1988). Synergism among interleukin-1, interleukin-3 and interleukin 5 in the production of eosinophils from primitive hemopoietic stem cells. *J Immunol.* 140:94.

Weersink A; Kessel K; Tol M. (1994). Modulation of lipopolysaccharide binding to human granulocytes. *Immunol.* 83:17.

William J.; Ernes B et al. (1977) . *Hematology.* Mc-Gaw-Hill. New York. 495 pp.

William S. (1991). *Hematology . Fifth edition.* The MIT Press Cambridge. London England. 474 pp.

Williams D; Rios M; Stephens; Patel V. (1991). Fibronectin and VLA-4 in haematopoietic stem cell-microenvironment interactions. *Nature.* 352: 438.

Williams G; Smith Ch; Spooncer E; Dexter T; Taylor D. (1990). Haematopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature.* 334: 76.

Yamamoto C; Yoshida S; Taniguchi H; Quin M; Miyamoto H; Mizuguchi Y. (1993). Lipopolisaccharide and granulocyte colony stimulating factor delay neutrophil apoptosis and ingestion by macrophages. *Infect Immunol.* 61:1972.

Yoshiaki H; Kiyohiko H; Tadashi K; Tuichi T; Masayuki Y; Hisohi T; Tetsuya O; Masaya U; Naufumi M; Kouji M; Yasusada M. (1995). Monocyte chemoattractant protein-1 stimulates tumor necrosis and recruitment of macrophages in tumor-bearing nude mice: increased granulocyte and macrophage progenitors in murine bone marrow. *Exp Hematol.* 23: 1035.

Yoshida Y. (1994). Overview of the hematopoietic growth factors and cytokines-past, present and future. *Int J Hematol.* 60:117.



## APENDICE 1

Medio RMPI- 1640.

El medio se utilizó para mantener en condiciones fisiológicas estables a los granulocitos de cavidad peritoneal y de médula ósea. El siguiente listado proporciona los componentes del medio.

| Aminoácidos                 | mg/l   |
|-----------------------------|--------|
| L-Arginina (libre de base)  | 200.00 |
| L-Asparagina (anhidra)      | 50.00  |
| L-Aspártico                 | 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-Trirosina 2Na | 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 <sub>12</sub> | 00.005 |

|                   |      |
|-------------------|------|
| SALES INORGANICAS | mg/l |
|-------------------|------|

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| Nitrato de calcio 4H <sub>2</sub> O | 100.00  |
| Cloruro de potasio                  | 400.00  |
| Cloruro de sodio                    | 6000.00 |
| Sulfato de magnesio                 | 48.84   |
| Fosfato de sodio dibásico (anhidro) | 800.00  |

|                  |      |
|------------------|------|
| OTROS COMPUESTOS | mg/l |
|------------------|------|

|           |         |
|-----------|---------|
| D-Glucosa | 2000.00 |
|-----------|---------|

|                    |         |
|--------------------|---------|
| Glutation 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, además los antibióticos penicilina G 100 u/ml y estreptomycin 100 µg/ml. Posteriormente se afora a un volumen de 1000 ml. agitándose hasta disolver sin sobre agitar. El medio se ajusta a un pH de 7.2 a 7.4, y se esterilizó con filtro de membrana de 0.22 µm en presencia de CO<sub>2</sub>, finalmente el RPMI se almacena a 4°C hasta el momento de su uso.

## APENDICE 2

### SOLUCION 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 fosfatos. Los componentes químicos se diluyen en un volumen final de 1000 ml de agua pentadestilada.

| COMPONENTE          | g   |
|---------------------|-----|
| 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 1000 ml y esta solución se ajusta a un pH de 7.2 a 7.4. La solución amortiguadora se esterilizó utilizando filtros de membrana ( millipore, USA) con un poro de 0.22  $\mu\text{m}$ , finalmente la solución se almacena a una temperatura de 4°C hasta el momento de uso.

### APENDICE 3

#### DESACTIVACION DE SUERO.

Se tomo una botella de Suero Fetal de Bovino y de Caballo (Hyclone, USA) y se colocó en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se pasó a un baño maría a 57°C durante 30 min. Posteriormente es transvasado en alícuotas de 50 ml para su mejor uso.

## APENDICE 4

### PREPARACION DEL COLORANTE AZUL DE TRIPANO.

Para pruebas de viabilidad, generalmente se empleó una dilución de colorante azul de tripano (Sigma, México), al 0.3% en PBS, antes de usarlo el colorante fue filtrado mediante el uso de un filtro (Whatman, England) del número 2.

## ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| CSF's                          | factores estimuladores de colonias .   |
| UFC-B                          | unidades formadoras de colonias del bazo   |
| UFC-GEMM                       | unidad formadora de colonias de granulocitos, eritrocitos, macrófagos y megacariocitos |
| Cas Na                         | caseinato de sodio   |
| FL                             | ligando para el receptor FLT3/FLK2   |
| G-CSF                          | factor estimulador de colonias de granulocitos   |
| GM-CSF                         | factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos                            |
| IFN- $\alpha$                  | interferón alfa  |
| IL-1                           | interleucina 1   |
| IL-3                           | interleucina-3   |
| IL-4                           | interleucina-4   |
| IL-6                           | interleucina 6   |
| IL-8                           | interleucina 8   |
| LPS                            | lipopolisacárido   |
| M-CSF                          | factor estimulador de colonias de macrófagos   |
| MIP-1 $\alpha$ y MIP-1 $\beta$ | proteína inflamatoria de macrófagos.   |
| NK                             | células asesinas o natural killer  |
| PMN                            | granulocitos polimorfonucleares  |
| SCF                            | factor de células tallo  |
| SFB                            | suero fetal de bovino  |
| TGF- $\beta$ 1                 | factor de crecimiento transformante beta 1   |
| TNF- $\alpha$                  | factor de necrosis tumoral   |
| PBS                            | solución amortiguadora de fosfatos   |
| SFC                            | suero fetal de caballo   |