

RESUMEN

Los macrófagos son células altamente especializadas y entre sus funciones más importantes destacan la defensa del organismo contra cuerpos extraños y la secreción de factores que regulan muy diversas funciones. Existe controversia respecto al origen de estas células, por un lado la mayoría de los investigadores consideran que todos los macrófagos, independientemente del sitio en el que se localicen, provienen del monocito formado en la médula ósea; por el otro, se han aportado evidencias de la existencia de un precursor local en cada uno de los lugares en donde se encuentran.

Se ha demostrado que existe un factor de tipo proteínico llamado MGI, el cual tiene la propiedad de inducir la proliferación y diferenciación de las células precursoras de la serie monocito-macrófago. Esta molécula ha sido encontrada en medios condicionados tanto por monocitos, como por macrófagos murinos, lo cual evidencia un mecanismo de autorregulación. Recientemente se han encontrado otros factores diferenciadores en medios condicionados por macrófagos peritoneales, que inducen la aparición de receptores para Fc y C₃ en células de médula ósea (FcRI) y C₃RI). Estos factores actúan en forma conjunta con el MGI para la creación de macrófagos completamente maduros.

Con la finalidad de contribuir al estudio del macrófago y para detectar la posible existencia de factores diferenciadores en diversos medios condicionados, se obtuvieron éstos, después de 4 días de incubación de macrófagos residentes en la cavidad y de macrófagos inducidos a ésta; ya que si in tipo celular secreta alguno de estos factores y el otro no, esto podría implicar funciones diferentes y en consecuencia origen diferente.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Los resultados aquí presentados indican que los macrófagos residentes fueron las únicas células capaces de producir inductores a la formación de receptores Fc y C₃, mientras que los macrófagos inducidos sólo secretan MGI. Asimismo, se encontró que los macrófagos residentes tienen la capacidad de autoinducirse en la formación de receptores inmunológicos, lo cual contribuye al entendimiento de los procesos de defensa mediados por estas células. Este trabajo abre la posibilidad de la purificación bioquímica de los factores inductores para receptores Fc y C₃, ya que se encontró que existe producción in vitro de éstos en ausencia de suero de caballo. Es evidente que si se pudiera disponer de estas moléculas se facilitaría el estudio de los procesos de diferenciación celular, así como de la utilización para fines terapéuticos y de diagnóstico.

INTRODUCCION

La sangre es uno de los mayores mecanismos homeostáticos del cuerpo. La sangre distribuye calor, acarrea gases respiratorios, nutrientes y desechos; fluye a través de sensores específicos capaces de regular a factores tales como tensión osmótica, pH, temperatura y los niveles de ciertas hormonas. La sangre provee transporte celular entre tejidos hematopoyético, conectivo y otros tejidos y órganos. La sangre contiene los agentes celulares y humorales que controlan los efectos de tumores e infecciones en el cuerpo (1).

Aproximadamente el 45% del volumen sanguíneo consiste de eritrocitos o células sanguíneas rojas. Alrededor del 1% está formado por plaquetas y leucocitos, o células sanguíneas blancas, de las cuales existen tres tipos: linfocitos, monocitos y granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos); el resto del volumen sanguíneo lo constituye el plasma, el cual es una sustancia rica en proteínas y se considera como el líquido intercelular (1). La existencia de una célula hematopoyética precursora de eritrocitos, leucocitos y plaquetas ha sido un tema de constante experimentación en hematología (2) aunque ha habido un intenso debate acerca de si existe un tipo celular precursor pluripotente, o varias células precursoras unipotentes para cada línea celular (3,4). La posible existencia de células hematopoyéticas repobladoras fue establecida, en los primeros años de la década de los 50, mediante estudios en ratones irradiados letalmente (5-8). Posteriormente, se aportaron fuertes evidencias de la existencia de una célula hematopoyética precursora al experimentar con ratones fuertemente irra-

diados, los cuales morían por pancitopenia. La muerte de estos animales podía evitarse con el suministro de una suspensión de células provenientes de la médula ósea de animales sanos. Los animales así tratados sobrevivían mostrando en su bazo nódulos que representaban pequeñas colonias de células precursoras de todo tipo de células sanguíneas, las cuales fueron llamadas unidades formadoras de colonias del bazo (CFU-S; del inglés "colony-forming unit-spleen") (9). El carácter clonal de estas colonias fué demostrado por medio de marcadores cromosómicos inducidos por radiación (10).

La relación de los linfocitos con la CFU-S ha sido tema de controversia puesto que se ha demostrado que los progenitores linfoides no se encuentran en las colonias del bazo, lo que sugiere la existencia de una célula precursora común más primitiva, llamada precursora común de la unidad formadora de colonias linfoides y mieloides (CFU-L-M; del inglés "lymphoid-myeloid colony-forming unit common progenitor") (11-13). Se postula que la CFU-L-M da origen a los precursores linfoides y a la CFU-S, que a su vez genera a los progenitores de los granulocitos, monocitos, eritrocitos y plaquetas (2) (Fig. 1):

Asímismo se aportaron técnicas para el crecimiento in vitro de las células precursoras de los elementos de la médula ósea. Mediante el cultivo de células mieloides en medios adaptados, se ha registrado la presencia de células madres precursoras comprometidas o especializadas (CFU-C; del inglés "colony-forming unit-culture") capaces de originar in vitro colonias mixtas de polimorfonucleares y macrófagos (14). Asímismo se han encontrado células madre especializadas que generan eritrocitos en presencia de eritropoyetina (CFU-E; del inglés "erythroid colony-forming unit") (14-16) ó células precursoras de megacariocitos que darán lugar a las plaquetas (CFU-M; del inglés "colony-forming unit-megakaryocyte").

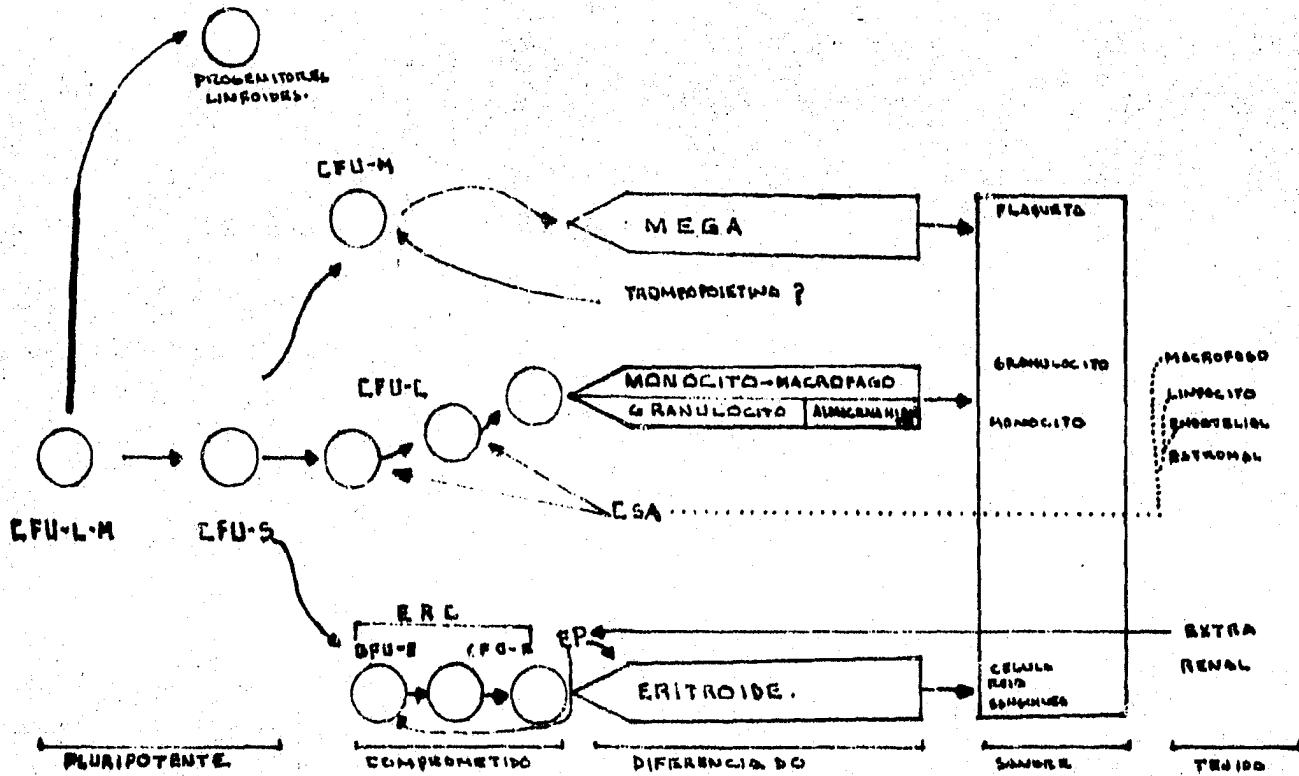


Fig. 1 Modelo de la hematopoyesis (2).

Existen evidencias de que algunas sustancias humorales e influencias ambientales locales, regulan la diferenciación y proliferación de células precursoras hematopoyéticas que se encuentran en la médula ósea (17-20).

En los ensayos clonales in vitro para células precursoras de granulocitos-monocitos-macrófagos se ha observado que la proliferación requiere de la presencia obligada de un factor llamado "colony stimulating activity" (CSA) (21-25), también llamado "colony stimulating factor" (CSF) (26-28) o "macrophage and granulocyte inducer" (MGI) (29-30) y que probablemente tiene relación con el llamado "macrophage growth factor" (MGF) (31). El MGI es una sustancia normalmente producida por varios órganos del cuerpo y dependiendo de la fuente de que se trate puede encontrarse en cantidades mayores o menores (32).

Es conocido que algunas fuentes poseen grandes concentraciones de MGI, no obstante es complicado purificar este factor debido a la gran cantidad de contaminantes bioquímicos que estas fuentes poseen, entre otros, las proteínas del suero (Tabla 1) (33).

Los granulocitos y monocitos están involucrados en la defensa contra infecciones. En consecuencia, se han realizado estudios sobre el efecto de endotoxinas, tales como los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas, en la actividad proliferativa de las poblaciones celulares, encontrándose que producen una fuerte elevación de los niveles de MGI tanto in vivo como in vitro (34-38).

Estudios de las propiedades de este factor indican que es de naturaleza glicoproteica (30), termolábil, resistente a la acción del éter, a la desoxirribonucleasa y a la ribonucleasa, está constituido por moléculas no dializables y en la electroforesis migra junto con la fracción de las gamma-globulinas (39).

Es de gran importancia mencionar que la masa molecular del MGI varía de acuerdo a la fuente de obtención; se ha encontrado en orina humana con una masa de 35,000 daltones (28) y en medio condicionado de pulmón humano

TABLA 1. DIFERENTES FUENTES DE OBTENCION DEL MGI (23, 25, 29, 31 y 34).

MEDIO CONDICIONADO POR	EXTRACTOS TISULARES	OTRAS FUENTES
Fibroblastos embrionarios	Glándulas Salivales	Suero normal
Fibroblastos transformados por SV40	Riñon adulto	Suero con endotoxinas
Células de Riñon	Bazo	Orina humana
Pulmón de ratón	Utero Grávido	Suero leucémico
Leucocitos de sangra periférica	Pulmón	Orina murina
Macrófagos Peritoneales	Placenta	
Placenta humana	Membrana Fetal	
	Fluido Ascítico	
	Exudado Peritoneal	

con dos masas moleculares distintas, una de 40,000 y la otra de 200,000 daltones; entre otras.

Los macrófagos son residentes normales del tejido laxo, ingieren diversos tipos de bacterias infecciosas y también ayudan a liberar a este tejido de productos resultantes de la desintegración de células o desechos de éstas (42). El macrófago típico es de aproximadamente 12 μ m de diámetro y tiene pequeñas proyecciones citoplásmicas periféricas (43), el centro celular puede ser eosinófilo. Además contiene una gran variedad de enzimas hidrolíticas y el citoplasma muestra fuerte evidencia de la actividad secretora con el retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi bien desarrollados. Poseen una gran cantidad de vacuolas de diversos tamaños; algunas de éstas células contienen peroxidasas en cuerpos densos mientras otras la contienen en los canales del retículo endoplásmico, la zona de Golgi y en el espacio perinuclear, éstas últimas probablemente representen células residentes de la cavidad peritoneal, u otras regiones (44). Los microtúbulos son particularmente evidentes cerca de la zona de Golgi. En el citoplasma existen microfilamentos de dos tipos, unos de función incierta y otros que forman complejos en forma de flechas con meromiosina pesada y representan a la actina, que es la proteína más contráctil del macrófago (45). Además de fagocitar, los macrófagos son células secretoras de diversos factores tales como el MGI, eritropoyetina, estimulantes de células B y de células T, lisozima, factor estimulador de la migración de polimorfos e interferón; entre otros (46,47). Una tercera función de los macrófagos es su participación en la respuesta inmune, procesando y presentando a los antígenos de manera adecuada a los linfocitos (48).

Los receptores de superficie son de importancia obvia para la actividad biológica de los leucocitos. Los receptores de membrana característicos de la actividad biológica del macrófago son los receptores para la porción Fc de la IgG, receptores para el complemento y receptores

no específicos denominados también receptores para sustancias extrañas (49).

Aparentemente, la función de los receptores de superficie en los leucocitos, consiste en incrementar la respuesta inmune celular. Los estudios hechos recientemente acerca de la morfología de la interacción linfocito-macrófago en la respuesta inmune a un antígeno dado, proporcionan una oportunidad de poder correlacionar la estructura y función en este aspecto de la inmunidad (49).

Se ha encontrado que los receptores de membrana de los macrófagos están involucrados en la migración de subpoblaciones de macrófagos que llevan material extraño hacia los tejidos linfoides (50), en la liberación de los mediadores de la estimulación de los linfocitos, en la agregación de los macrófagos (51), en el desarrollo de la tolerancia y en la salida de los macrófagos del torrente sanguíneo hacia los tejidos (52,53).

Las inmunoglobulinas han sido específicamente relacionadas con los anticuerpos (54) especialmente la inmunoglobulina G (IgG) y el complemento (55,56). La IgG sola y la inmunoglobulina enlazada a componentes del complemento han aportado mucho al conocimiento de la selectividad de la adherencia macrofágica (57). El papel del anticuerpo en la fagocitosis selectiva mediada, depende de la unión de una región del anticuerpo a un receptor o sitio de reconocimiento en la superficie del macrófago. Entonces, la molécula de IgG aparentemente se une inmunoespecíficamente a los microorganismos a través de su porción variable de su región Fab y a la superficie macrofágica vía su región Fc (58,59). Los receptores para la región Fc de la IgG en la superficie de los macrófagos son importantes para el combate de las infecciones parasitarias (60,61). Además de su función en la eliminación de agentes extraños, los receptores Fc funcionan en la remisión fisiológica de eritrocitos viejos por medio de los macrófagos (62). Estos eritrocitos son sensibilizados o cubiertos por inmunoglobulinas autólogas *in situ*, promoviendo consecuentemente la fagocitosis por macrófagos hepáticos y

del bazo (63-65).

La presencia de receptores para Fc, comúnmente se demuestra por medio de la técnica de formación de rosetas eritrocitarias (49). Cuando los eritrocitos son cubiertos por un anticuerpo, éstos se unen a la superficie de los leucocitos dando lugar a lo que se ha denominado roseta; considerándose como tal, a aquella célula con más de tres eritrocitos adheridos en su membrana (66).

Se han mencionado otras técnicas menos comunes para la valoración de estos receptores con fluoresceinatos de anticuerpos (67) o por medio de radioisótopos (68-70). La afinidad de los macrófagos por complejos de antígenos con IgG ha sido caracterizada, e indica que los enlaces en el receptor dependen de un número finito de sitios activos. Los complejos inmunes se combinan más ávidamente, posiblemente porque se ofrece un número adicional de receptores Fc por complejo molecular (71-73), o porque ellos inducen cambios conformacionales en los componentes del Fc (74,75).

El receptor Fc une varias subclases específicas de IgG, incluyendo las subclases IgG₁ e IgG₃ (76), IgG_{2A} e IgG_{2B} (77) y posiblemente la subclase IgG₁ en el ratón (78). Dependiendo del método empleado y de la especie que se examina, el macrófago posee aproximadamente 10^5 receptores en su membrana. Mediante el complejo soluble peroxidasa-antiperoxidasa se ha podido demostrar que hay mayor número de receptores en los macrófagos que en los granulocitos, los cuales a su vez presentan una frecuencia mayor de tales receptores que los linfocitos (79).

A baja amplificación, en el microscopio de luz, los receptores de los macrófagos parecen estar distribuidos al azar, en aquellos que se encuentran en suspensión; mientras que menos al azar en aquellos que forman monocapas (79); en alta resolución los receptores para los complejos solubles antígeno-anticuerpo son discontinuos y muestran una periodicidad de 120 a 130 nm (80). El receptor para Fc es sensible a la digestión con fosfolipasa y para su actividad depende de un componente lipídico (49).

La regeneración o conservación selectiva de estos receptores después de la unión con complejos inmunes, puede ser un fenómeno que se relaciona con el tamaño o la cantidad total del material ingerido (81).

Los receptores para el complemento presentes en la membrana del macrófago tienen una función importante en la eliminación de los patógenos invasivos. Estos receptores están involucrados en la defensa del huésped. La adherencia secuencial de los productos del complemento da lugar, a partir del tercer componente, a una mayor susceptibilidad para la ingestión en estas células (82). En pacientes con una deficiencia hereditaria o metabolismo anormal de C_3 , se evidencia la importancia biológica de este sistema.

Estos pacientes son susceptibles a infecciones bacterianas recurrentes (83,84), puesto que disminuye la capacidad opsonisante del suero, ordinariamente estas infecciones pueden ser controladas por los fagocitos en presencia de suero normal (85).

Los receptores del complemento se encuentran, entre otros, en los leucocitos, en los eritrocitos de primates y en las células epiteliales de los glomérulos renales (86). Es posible que los receptores para el complemento, estén implicados en la inhibición de la migración de los macrófagos por medio de endotoxinas (87). Dicha influencia podría ser efectuada por factores que se sabe son generados por el complemento y el sistema de coagulación sanguínea, los cuales pueden actuar sobre la membrana plasmática para inducir la activación de los macrófagos (88).

Entre las técnicas para la detección y cuantificación de receptores para el complemento, se encuentra la técnica de rosetas, utilizando para este fin eritrocitos sensibilizados (cubiertos con anticuerpo) más suero como fuente del complemento (89).

Se sabe que los eritrocitos cubiertos con IgM son incapaces de unirse a los macrófagos, pero cuando estos eritrocitos son incubados en presencia de suero fresco, la unión puede existir (82,90).

Las numerosas observaciones de las membranas de los macrófagos indican que existe un número relativamente pequeño de receptores de alta afinidad para el complemento (91). Además, existen evidencias de que la unión del complemento requiere la presencia de magnesio (92). Asimismo, se ha observado que este tipo de receptores es sensible a la tripsina (93).

La maduración gradual de las células hematopoyéticas ha sido caracterizada tradicionalmente por una serie de cambios en la morfología celular. No obstante, se ha trabajado poco para definir la diferenciación de los leucocitos en relación con la aparición de receptores sobre sus membranas, ya que las células precursoras van adquiriendo marcadores a medida de que se diferencian (94).

Mediante hidrólisis en condiciones apropiadas de pH se ha fragmentado la IgG y se han encontrado tres partes; dos de ellas similares, denominadas fragmentos Fab que contienen cada una porciones que se unen a los antígenos y una tercera porción que se ha denominado fracción Fc, la cual, como ya se ha mencionado, se une a la superficie de los macrófagos. Además, esta porción interviene en importantes funciones biológicas incluyendo, entre otras, la fijación del complemento, la transferencia placentaria y la anafilaxis cutánea pasiva (95-97). Se ha determinado que en su forma más simple una inmunoglobulina está formada por 4 cadenas polipeptídicas, dos cadenas ligeras y dos pesadas unidas por puentes disulfuro. Cada cadena posee dos regiones diferentes, una constante y otra variable en donde la secuencia de aminoácidos es diferente para cada anticuerpo (96).

El sistema del complemento es un conjunto de proenzimas de origen glicoproteico, que se encuentran en la sangre de todos los vertebrados en forma inactiva.

Constituyen aproximadamente del 10 al 15% de las proteínas séricas. Este sistema es activado en forma de cascada, una proenzima es transformada a enzima y ésta a su vez actúa sobre la siguiente proenzima transformándola

a enzima y así sucesivamente (97).

La activación del complemento se puede llevar a cabo por dos vías: una vía clásica, que es a través de una reacción antígeno-anticuerpo (mecanismo específico), en donde el anticuerpo es fijador del complemento.

La otra forma de activación es conocida como vía alterna o vía de la properdina; esta vía es considerada como un mecanismo de resistencia no específico.

En la activación del complemento por la vía clásica, hay 11 proteínas en el sistema, las cuales se designan por la letra C seguida de los números 1, 2, 3 hasta llegar al 9. El componente C_1 está compuesto por tres subunidades llamadas: q, r y s. El número les fué asignado antes de que se conociera bien la secuencia de activación, no obstante la refleja, con una sola excepción: la glicoproteína C_4 la cual reacciona después del C_1 y antes del C_2 .

El sistema del complemento puede dividirse en tres partes: Unidad de reconocimiento, activación enzimática y unidad de ataque celular.

Estudios recientes han evidenciado la existencia de un factor inductor de la aparición de receptores para Fc (FcRI); el cual se obtuvo a partir de una línea celular de tipo macrófágico mantenida in vitro y activada por LPS. Además se encontró que este factor pierde su actividad biológica al ser sometido al tratamiento proteolítico y al calor, lo cual indica que es de naturaleza proteica (98).

Asimismo, se ha encontrado un factor inductor de la formación de receptores para C_3 (C_3 RI) en medio condicionado de pulmón murino endotóxico. Se aportó que el C_3 RI es sensible a tripsina y termolábil; es decir, es de naturaleza proteica. Es independiente del factor inductor de macrófagos y granulocitos (MGI) ya que éste no induce a la formación de colonias al utilizar la técnica de bica-pa en agar (99).

La cavidad peritoneal se considera como un sitio conveniente para el estudio de los fagocitos bajo condiciones normales y patológicas, debido a que contiene una población celular finita y caracterizable, el total de la población puede ser manejable, las células se pueden distribuir homogéneamente y las alícuotas son representativas de la población, y el número celular es cuantificable de manera sencilla por métodos hematológicos rutinarios (100). Otra gran ventaja para el uso de los macrófagos peritoneales es que se pueden obtener fácilmente. En contraste; otros tipos de macrófagos residentes, por ejemplo los del hígado, sólo pueden ser colectados por digestión enzimática y el efecto de ésta en las células no ha podido establecerse. Por estas razones, la cavidad peritoneal (especialmente la de ratón), es utilizada frecuentemente para estudios acerca de la morfología, diferenciación, fagocitosis, citotoxicidad y respuesta inmune; entre otros de los aspectos de estas células (101).

El lavado de la cavidad peritoneal normal, provee de una suspensión celular que contiene un gran número de macrófagos, junto con linfocitos, eosinófilos y células cebadas.

Las suspensiones obtenidas de diversas especies difieren considerablemente con respecto a las proporciones de los tipos celulares presentes (102).

El número de células obtenidas de la cavidad peritoneal puede aumentar mediante la administración intraperitoneal de compuestos que producen una inflamación local. Sin embargo, debe tenerse muy en cuenta que al alterar el estado de normalidad del animal experimental, un rápido flujo de células y otros componentes llegan a la cavidad peritoneal. A este respecto es muy importante señalar que la inyección de sustancias extrañas en el peritoneo, no solo incrementa el número de macrófagos en él, sino que también evoca a otra población de macrófagos peritoneales que difiere de la población residente normal, tanto morfológica como funcionalmente. Adicionalmente, los macrófagos peritoneales pueden ser influenciados cualitativa

y cuantitativamente por inyección intravenosa o subcutánea de agentes que activen al sistema inmune y que tengan un efecto remoto sobre las células peritoneales (103-108). En el presente trabajo se distinguirá entre la población de los macrófagos tisulares (residentes) y la población de macrófagos evocados, inducidos o exudados que provienen del monocito y que llegan a la cavidad en respuesta a un estímulo.

La suspensión celular obtenida de una cavidad peritoneal no estimulada, contiene principalmente tres tipos de células: macrófagos residentes, granulocitos eosinófilos y células linfoides. Ocasionalmente se encuentran monocitos, siendo los ratones y ratas los que más poseen de estas células. Los granulocitos neutrófilos raramente se observan en la cavidad peritoneal no estimulada, pero puede encontrarse un escaso número en asociación con un incremento del número de monocitos, lo cual puede reflejar un estado no saludable del animal (109).

Como ya se menciona, el número de células y su relativa proporción varía de acuerdo a la especie; además puede influir la edad y el sexo del animal (110-114), así como las variaciones personales del observador (113).

Se ha postulado que los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal forman una población autoreplicante y que el pequeño porcentaje de células con las características morfológicas y citológicas de monocitos presentes en la cavidad peritoneal sin estimular, pueden ser considerados monocitos que están de paso en la cavidad y no pueden ser vistos como precursores de los macrófagos residentes (100)

Los macrófagos de la cavidad peritoneal intacta son células relativamente grandes, cuya morfología depende de la especie (114). En contraste con los macrófagos evocados a la cavidad peritoneal estimulada, los cuales muestran amplia variación en la estructura fina, los macrófagos residentes forman una población homogénea morfológicamente, especialmente con respecto al tamaño (115), pero es probable que también lo sean funcionalmente. El

citoplasma de los macrófagos residentes contiene los organelos celulares usuales. Estas estructuras muestran una polaridad en la que el aparato de Golgi y los lisosomas están localizados en un lado del núcleo; y en el otro, rodeando al núcleo, los elementos del retículo endoplásmico rugoso (114).

Por otro lado, los macrófagos peritoneales exudados son utilizados comúnmente para el estudio de diversas propiedades. Para inducir estos exudados, puede usarse la administración intraperitoneal de una variedad de agentes inflamatorios o irritantes tales como el glicógeno, tioglicolato y aceites minerales (116-118), cualquiera de los cuales provocan un incremento en el número de células peritoneales. La inyección intraperitoneal de algunas de estas sustancias permite, entre otras cosas, la migración y acumulación intraperitoneal de monocitos sanguíneos, los cuales se diferencian in loco a macrófagos maduros. Los exudados inflamatorios también contienen un gran número de granulocitos, particularmente en los primeros estados después de la inducción, por lo que los exudados peritoneales también se utilizan frecuentemente para el estudio de las poblaciones granulocíticas. La cavidad peritoneal se considera un sitio excelente para el estudio de células inflamatorias y poblaciones celulares, por esto, han sido utilizados muchos métodos para iniciar una inflamación leve en la cavidad peritoneal. La razón obvia para utilizar exudados peritoneales en vez de poblaciones celulares de la cavidad intacta, es que existe un número muy elevado de células en el exudado; sin embargo, existen serias dudas acerca de si las células inducidas a la cavidad puedan ser consideradas como representantes de las células en reposo del organismo normal (114).

Se han realizado pocos estudios comparativos en los cuales, la composición de la población de la cavidad peritoneal estimulada, ha sido analizada cuantitativamente a diferentes intervalos de tiempo después de la administración intraperitoneal de diversos compuestos (118-126).

Muchos de los reportes están basados en las diferentes poblaciones celulares inducidas por un solo agente extraño y más aún, cada autor da un nombre a cada tipo celular de tal manera que, como un ejemplo, los términos histiocito, macrófago-monocito, célula monocitoide y célula adherente, se refieren a un mismo tipo celular. Además pocas veces se hace diferencia entre los macrófagos residentes y los inducidos provenientes del monocito.

El uso de una gran variedad de agentes irritantes para estimular la cavidad peritoneal, provoca la llegada a ella de un gran número de células, entre ellas, monocitos y granulocitos neutrófilos. El patrón que sigue la respuesta a la estimulación por agentes diversos, es generalmente la misma (114).

Cuando se utiliza caseinato de sodio como agente irritante en la cavidad peritoneal de ratón, se encuentra que los granulocitos comienzan a llegar a la cavidad entre una y dos horas después, seguida con el arribo de un número cada vez mayor de monocitos, el cual, llega a su máximo a los 4 días y la población granulocítica aumenta hasta las 16 horas y comienza a declinar a las 24 (127). El tiempo que lleva el restablecimiento de la normalidad en la cavidad varía dependiendo de la concentración y de la naturaleza del estímulo (121); también difiere en algunas cepas de la misma especie. De esta manera, encontramos que después de la inducción con salina se recupera la normalidad 4 días más tarde (118) y se ha mencionado un caso en el que la irritación con gránulos de melanina tarda en recuperarse 50 días (119).

Durante la irritación, el número de linfocitos de la cavidad no varía significativamente, al igual que no varía el número de células cebadas (114,118). Los granulocitos eosinófilos aumentan significativamente en algunos tipos de inducción y regresa a la normalidad después de 16 horas (118).

La irritación de la cavidad produce una mezcla de macrófagos y de aquellos que se derivan de los monocitos y en vista de su heterogeneidad funcional, es muy delicado trabajar con estas poblaciones mixtas. Los ensayos rea-

lizados con macrófagos inducidos son de considerarse debido al estado de irritación en que se encuentran (114). El comportamiento y la composición de los macrófagos exudados depende de la naturaleza del estímulo usado (109, 124,125). El uso de irritantes proporciona una cosecha de macrófagos con el metabolismo alterado, tanto en su potencial fagocítico como bactericida (128), en el cual, no existen muchos representantes de la población normal (114). Las alteraciones pueden ocurrir tanto por la fagocitosis del irritante como por la inducción de cambios que producen un estado de activación (118).

En cuanto al desarrollo o diferenciación de monocitos a macrófagos durante la inducción, puede decirse que ellos llegan a la cavidad con todas las características de los monocitos sanguíneos y que durante el desarrollo del proceso inflamatorio adquieren las características de los macrófagos maduros, teniendo como resultado que la población macrófágica del exudado peritoneal, sea más pleomórfica, en comparación con la de la cavidad peritoneal sin estimular. Aunado al incremento de tamaño, los monocitos en diferenciación muestran cambios en la superficie celular y en los organelos (114).

Hacia principios de siglo (1925) se llevaron a cabo estudios que puntualizaron que existen diferencias entre los "clasmatocitos" (análogos a los macrófagos residentes) y los monocitos de la cavidad peritoneal. Asimismo, en 1930 se postuló que en los "histiocitos secundarios", los cuales se derivan de los monocitos sanguíneos durante una inflamación, son distinguibles de los "histiocitos primarios" los cuales son originados en el tejido local (114). En estudios más recientes se explica la heterogeneidad funcional de los macrófagos (128-133).

Algunos estudios muestran diferencias entre los macrófagos residentes y los evocados en cuanto a la funcionalidad y a la cantidad de receptores Fc: los macrófagos de la cavidad peritoneal estimulada, ingieren células rojas por medio de receptores para IgG; mientras que, los macrófagos residentes atrapan células rojas por mecanis-

mos más primitivos, no inmunológicos (129). También se encontraron diferencias en cuanto a los receptores del complemento: los macrófagos inducidos con tioglicolato poseen receptores para el complemento, que median tanto la unión como la ingestión; mientras que, en los macrófagos residentes los receptores del complemento median solo la unión (134-135).

En contraste con los macrófagos inducidos, los macrófagos tisulares responden pobremente al estímulo quimiotáctil (136). Además en 1975 se sugirieron diferencias entre los monocitos sanguíneos y macrófagos de la cavidad peritoneal intacta, con respecto a la dosis-respuesta y al tiempo de la respuesta quimiotáctica a linfocinas y a componentes del complemento activado(114). Sin embargo en ese mismo año se encontró que la respuesta de los macrófagos exudados al estímulo quemotáctico dependía del material utilizado para la inducción(114). Se ha encontrado también, que existe una relación entre la respuesta quimiotáctica y la actividad tumoricida (114).

En electroforesis celular, los macrófagos residentes muestran un comportamiento totalmente diferente al de los inducidos en la cavidad peritoneal, lo que indica diferencias en la carga superficial de ambos tipos (137). Asimismo, se ha demostrado que los macrófagos inducidos son más sensibles a los factores inhibidores de la migración (138).

Se han encontrado diferencias entre ambos tipos celulares en cuanto a la composición de la membrana plasmática (139) además también difieren en cuanto a velocidad y adhesión (130).

Se han realizado diversos estudios acerca de la producción y liberación de diferentes enzimas, tanto por los macrófagos residentes como por los inducidos, encontrándose diferencias marcadas entre ambos (140-146).

En cuanto a la distribución de la peroxidasa, se han reportado diferencias características en los diferentes tipos de macrófagos: los macrófagos evocados muestran la peroxidasa en gránulos, mientras que los residentes la muestran rodeando a la envoltura nuclear y en el retícu-

lo endoplásmico rugoso (147,148).

Con respecto a la endocitosis, eliminación y actividad lisosomal, también demuestran diferencias, siendo los macrófagos inducidos los más ávidos; no obstante, los autores mencionan que este efecto puede ser debido al aumento considerable de células activas durante la estimulación, más que a las cualidades de las células en sí (141,149,150). Recientemente se han encontrado diferencias en cuanto a los fenotipos ectoenzimáticos y a la actividad tumoricida de ambos tipos celulares (151-152).

Acerca del origen de los macrófagos de la cavidad peritoneal, existen dos corrientes científicas. Una de ellas afirma que todos los macrófagos de la cavidad peritoneal (evocados y residentes) provienen del monocito de la médula ósea, el cual no se divide más en la cavidad sino solamente se diferencia a macrófago puesto que no se ha encontrado evidencia de una población autoreplicante, sino que se propone que unos cuantos fagocitos mononucleares inmaduros puedan dividirse en la cavidad y formar monocitos que posteriormente se convertirán en macrófagos (153). Sin embargo, se han encontrado diferencias entre los macrófagos residentes y los provenientes de los monocitos. Mediante el uso de marcadores con Imferon (hierro dextrano) se evidencia claramente el origen diferente de ambas poblaciones y se postula como un precursor de los macrófagos peritoneales residentes a un tipo celular que se piensa se encuentra localizado en "puntos lechosos". Se propone que este precursor da origen por mitosis a macrófagos inmaduros, a los que se les nombra como proresidentes y que poseen un patrón de peroxidasa similar al de las células residentes, además dichos precursores pueden ser aislados de la cavidad peritoneal. Evidencias que apoyan esta segunda teoría se encuentran en estudios realizados con la cavidad in vitro que muestran la formación de estos histiocitos. (154).

Aunque todavía existe un intenso debate acerca de la heterogeneidad de los macrófagos peritoneales y de su ori-

gen; cada día se adicionan más seguidores de la teoría que postula un diferente origen para cada población (155).

Día a día se acumulan más evidencias del origen dual de las poblaciones de macrófagos de la cavidad peritoneal por lo que es de esperarse en un futuro no muy lejano el esclarecimiento de la controversia existente.

Con la finalidad de contribuir al estudio del origen de las poblaciones macrofágicas de la cavidad peritoneal se cultivaron macrófagos residentes e inducidos a dicha cavidad para obtener medio condicionados a los cuales se les evaluó la existencia de diferentes factores diferenciadores como son el FcRI, el C₃RI y el MGI; considerando además la importancia de dichos factores en los procesos de defensa inmunológica para el organismo.

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO.- El trabajo experimental se realizó con células de médula ósea, macrófagos de cavidad peritoneal y con suero de ratones de la cepa CD - 1 hembras y de 6 a 8 semanas de edad. Además se utilizaron eritrocitos de carnero.

CULTIVO CELULAR.- Como fuente de nutrición se usó el medio mínimo - esencial de Eagle (ME) con exceso de vitaminas y aminoácidos (Gibco Labs, USA) (apéndice 1) al que se adicionaron 100 UI/ml de penicilina G y 100 µl/ml de estreptomycin como medida preventiva para una posible contaminación bacteriana y 3.7 g/l de bicarbonato de sodio para mantener un pH fisiológico (7.2) en los cultivos en presencia de CO₂. Posteriormente se filtró en membrana Millipore (Millipore, USA) con un diámetro de poro de .22 micras para garantizar la esterilidad del medio. Para verificar dicha esterilidad se tomaron 5 gotas y se colocaron por duplicado en tubos de ensaye que contenían 2ml. de caldo de soya tripcaseína al 3% (Bioxon, Mex), previamente esterilizado en autoclave , incubándolos durante 48 horas a 37°C. El medio de cultivo fué constituido por medio suplementado con suero de caballo (Gibco Labs, USA) al 10%, el cual fué previamente desactivado a 56°C durante 30 min.

Las células fueron sembradas en la cantidad y condiciones requeridas para cada experimento en cajas Petri, ya sea de vidrio o de plástico desechables de 60 x 15 mm las cuales contenían siempre un volumen total de 5ml. Las células se mantuvieron in vitro en una incubadora a 37°C con una atmósfera relativa del 10% de CO₂ y humedad saturante. Todo trabajo de cultivo se realizó en una campana limpia y esterilizada con luz ultravioleta durante 15 min. Para verificar las condiciones de las células en cultivo se utilizó un microscopio de tipo invertido (American Optical, USA).

TECNICA PARA OBTENER CELULAS DE MEDULA OSEA.- Con la finalidad de obtener células viables para cuantificar la actividad de los factores inductores a la formación de receptores para Fc y C₃; se sacrificaron ratones mediante dislocación céfalo-medular, para proceder a retirar los fémures colocándolos inmediatamente en cajas de petri que contenían una solución amortiguadora de fosfatos (SAF) (Apendice 2). En seguida se eliminó la mayor cantidad posible de tejido muscular circundante. Se cortaron las epífisis con unas tijeras pequeñas y con una jeringa de 1 ml que contenía SAF, se hizo fluir el líquido de un extremo a otro del hueso para de esta forma coleccionar las células en un tubo de ensaye. Las células así obtenidas se lavaron en SAF y se centrifugaron a 500 g durante 3 min repitiendo este lavado en 3 ocasiones. Por último, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 5 ml de medio de cultivo resuspendiendo las células a continuación. La cantidad de células obtenidas se determinó con un hemocitómetro (American Optical, USA). Se sembraron para cada experimento 8×10^6 células por caja de Petri desechable (Ve la Plastic, Mex) y se mantuvieron en cultivo durante 4 días.

PREPARACION DE MEDIOS CONDICIONADOS POR MACROFAGOS PERITONEALES.-

Para la preparación del medio condicionado (MC) por macrófagos residentes (MR) se sacrificaron ratones para proceder a extraer los macrófagos por medio de una jeringa hipodérmica que contenía 10 ml de SAF, inyectándolos en la cavidad peritoneal dando en seguida un ligero movimiento al animal con el objeto de suspender la mayor cantidad de células no adherentes de la cavidad peritoneal y poder recuperarlas al extraer el SAF inyectado con la misma jeringa. En seguida, se colocó el exudado en un tubo cónico de plástico, el cual se mantuvo en hielo para evitar, hasta donde fuera posible, la adhesión de los fagocitos a sus paredes. Posteriormente, se repitió el proceso de extracción de MR con 5 ml de SAF. Las células así obtenidas se lavaron en SAF en 3 ocasiones mediante centrifugación a 500 g durante 3 min se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en 5 ml. de medio de cultivo para proceder a la cuenta celular. Se sembraron 4×10^6 células en cajas de Petri de vidrio (Pyrex, USA).

las cuales después se incubaron durante 1 hora con la finalidad de que las células se adherieran a la base del recipiente de cultivo. Transcurrido este tiempo se procedió a retirar el medio de cultivo en él iban todas aquellas células no adheridas, adicionando en seguida, medio de cultivo nuevo.

Para la obtención de MC por macrófagos inducidos (MI) se inocularon ratones por vía intraperitoneal con 3ml de una solución de caseína tóde sódico al 10% en SAF, dejándose actuar este irritante por un período de 4 días, después de los cuales se sacrificaron los animales para proceder a obtener y cultivar los macrófagos tal y como se describió para los MR.

Los cultivos, tanto de MR como de MI, así preparados se incubaron a diferentes tiempos, y al término de éstos se retiraron, con ayuda de un gendarme, las células de las cajas y junto con su medio de cultivo, se colocaron en tubos de ensaye para proceder a la cuenta celular, que como promedio era de 1×10^6 , y a la centrifugación a 500 g por 5 min con la finalidad de sedimentar las células y residuos celulares y finalmente el sobrenadante fué almacenado a -20°C hasta su utilización, previa toma de una muestra para posterior prueba de esterilidad.

PREPARACION DE INMUNOGLOBULINA G (IgG).- Se diluyó inmunoglobulina G (7S IgG, Cordis Labs, USA) en SAF a 1:1600. Se guardaron 4 ml en tubos de ensaye estériles y se conservaron en congelación a -20°C hasta su uso. Siempre se utilizó el total de la IgG diluida una vez descongelada.

PREPARACION DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS CON ANTICUERPO.- Se emplearon eritrocitos de carnero que fueron extraídos de la yugular y colocados en una solución de Alsever 1:1 (Apéndice 3) de manera estéril. Los eritrocitos obtenidos se almacenaron a 4°C durante una semana antes de su uso y nunca después de 5 semanas.

Para la sensibilización los eritrocitos fueron lavados con SAF, mediante centrifugación a 500 g durante 3 min en 3 ocasiones; después de lo cual se decantó el sobrenadante y las células sanguíneas se resuspendieron en SAF en una preparación de 4ml por cada mililitro de eritrocitos en la solución de Alsever utilizado; posteriormente se les agregó un volúmen igual de IgG al utilizado de SAF. Esta mez

cla se resuspendió y se incubó en Baño María a 37°C durante 30 min , obteniéndose eritrocitos cubiertos con anticuerpo. Los eritrocitos sensibilizados con anticuerpo, así obtenidos fueron lavados en SAF - por centrifugación a 500 g por 3 min con el objeto de quitar el exceso de IgG, no absorbido por los eritrocitos. Las lavadas se repitieron cuantas veces fué necesario hasta que el sobrenadante fuera incoloro. Finalmente , se resuspendieron los eritrocitos sensibilizados con al antígeno en el doble volúmen de SAF utilizado para su preparación y se almacenaron a 4°C hasta el momento de su uso y nunca más de 5 días.

OBTENCION DE SUERO FRESCO DE RATON.- Después de sacrificar a los ratones se les extrajo del corazón mediante punción con una jeringa estéril de 1 ml la sangre que se colocó en un tubo de ensaye y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 min para que se formara el coágulo, después de los cuales el tubo se puso en hielo durante 1 hora con el propósito de lograr la retracción del coágulo; se separó de las paredes del tubo con ayuda de una pipeta y se procedió a centrifugar a 1,000 g durante 15 min. Finalmente el suero se recolectó con otro tubo y se diluyó 10 veces en SAF. Esta fuente del complemento siempre se usó inmediatamente para la preparación de eritrocitos sensibilizados con anticuerpo y complemento.

PREPARACION DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS CON ANTICUERPO Y COMPLEMENTO.- Se mezclaron partes iguales de eritrocitos activados y sensibilizados con anticuerpo y de suero fresco de ratón diluido el 1:10 en SAF y se incubaron en Baño María a 37 °C durante 30 min obteniéndose de esta forma eritrocitos sensibilizados con anticuerpo y complemento. Los eritrocitos sensibilizados con anticuerpo y complemento fueron lavados por centrifugación a 500 g por 3 min con 1:2 ml de SAF, con el objeto de retirar el exceso de complemento no adherido a los eritrocitos activados. El proceso de lavado se repitió cuantas veces fué necesario hasta que el sobrenadante fué incoloro. Por último, se resuspendieron los eritrocitos en un volúmen de SAF igual al utilizado originalmente de eritrocitos activados, conservándoseles a 4°C hasta su uso. Los eritrocitos sensibilizados con anticuerpo y complemento fueron utilizados hasta dos días después de su preparación.

DETERMINACION DE LOS RECEPTORES DE MEMBRANA POR FORMACION DE ROSETAS DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS CON ANTICUERPOS Y ERITROCITOS SENSIBILIZADOS CON ANTICUERPO Y COMPLEMENTO. Se incubaron las células de médula ósea de ratón, en presencia de los diferentes MC que se deseaban probar como fuentes de los factores inductores a la formación de receptores Fc y C₃. Al término de 4 días de incubación se revisaron los cultivos en el microscopio invertido y después de corroborar visualmente el buen estado general de éstos se procedió a separar las células adheridas a la superficie de cada cultivo, mediante el uso de un gendarme de hule y junto con las células que se encontraban en suspensión se colocaron tubos de ensaye y se lavaron 3 veces en SAF mediante centrifugación a 500 g durante 3 min, en seguida del último lavado se desechó el sobrenadante y se adicionó 1 ml de SAF. Una vez resuspendidas las células se procedió a la separación de dos partes iguales para sendas pruebas de rosetas Fc y C₃. En seguida se añadieron 100 µl ya sea de eritrocitos sensibilizados con anticuerpos o de eritrocitos sensibilizados con anticuerpos y complemento y se mezclaron con las células, posteriormente se centrifugaron a 500 g durante 5 min. Después de una incubación de 30 min. en Baño María se resuspendieron las células lentamente para finalmente determinar el porcentaje de rosetas. Se consideró como roseta a aquel leucocito que tenía adheridos más de tres eritrocitos a su membrana celular. Las evaluaciones del porcentaje de las células con receptores de membrana se hicieron al contar un mínimo de 200 células. En todos los experimentos se colocaron cultivos que no contenían ningún MC como control negativo.

Para la evaluación del número de receptores tanto para Fc como para C₃ en los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal adheridos al sustrato del cultivo, se procedió primero a revisar los cultivos en el microscopio invertido para determinar si las células estaban morfológicamente íntegras; en este caso se continuó con el ensayo mediante 3 lavados efectuados cuidadosamente con 5ml. de SAF. Se agregaron los eritrocitos activados con anticuerpos ó los eritrocitos sensibilizados previamente preparados y diluidos en SAF 1:4 de tal manera que al agregar 3ml de esta dilución quedara cubierto todo el fondo de la caja de cultivo en donde se encontraban adheridos los macrófagos. En seguida se incubaron 30 min a 37°C, tiempo durante el cual se movió el líquido de las cajas cada 10min con la finalidad de que

hubiera una buena interacción con las células. Se procedió a lavar cuidadosamente en tres ocasiones con SAF y posteriormente a teñir - y fijar por medio de la técnica de May Grunwal -- Giemsa. Con el primero se fijaron y tiñeron durante dos minutos y con el Giemsa al 10% se tiñeron por 10 min. Finalmente, se evaluó al microscopio el porcentaje de células con receptores para Fc ó C₃ .

TECNICA DE FORMACION DE COLONIAS EN BICAPA DE AGAR.- La evaluación del contenido de MGI en los diferentes medios condicionados fué en base a la producción de colonias de macrófagos y granulocitos , empleando para ello células precursoras provenientes de médula ósea - de ratón, mediante la utilización de la técnica de bicapa en agar. Este método consiste en colocar una capa inferior con 20% de agar - al 6%, medio de Eagle doble al 20%, suero fetal de bovino al 20% y el 40% restante formado por el medio condicionado a ensayar y medio sencillo. Se esperó 20 min. a temperatura ambiente y posteriormente se colocó una capa superior conteniendo 20% de agar al 0.4%, 20% de medio Eagle doble, 10% de suero fetal de bovino y 50% de medio Eagle sencillo con 10⁵ células de médula ósea; en este caso al igual que - con la primera capa se esperó 20 min a temperatura ambiente para - proceder a la incubación.

El agar se diluyó siempre con agua bidestilada para que al mezclarse con el medio de Eagle no se alterase la concentración de sales. El - agar se preparó mediante esterilización en autoclave y se mantuvo en Baño María a 46°C hasta su uso.

La evaluación del número de colonias se efectuó al término de 6 días de incubación, considerándose como colonia a las agrupaciones celulares de más de 10 células.

CONFIABILIDAD DE RESULTADOS.- Todos los experimentos realizados en - este trabajo fueron repetidos un mínimo de dos veces y siempre por duplicado. Los experimentos fueron repetidos cada vez que se encontraba una diferencia de más del 15% entre los duplicados. Así mismo , en cada ensayo se agregó un control sin medio condicionado. Hay que hacer notar que este control no es un negativo correcto, - pues los medios condicionados aparte de la posible existencia de los factores inductores, tienen una enorme cantidad de moléculas prove - nientes tanto de secreciones celulares como de los componentes de -

desintegración celular.

Sin embargo, este control es de gran utilidad, ya que si no se encuentra en cualquier prueba una actividad inductora de más del 20% respecto al medio sin MC, no se puede asegurar la existencia del factor inductor. Por otro lado la obtención de un resultado con menor inducción que el control sin MC es posible ya que como se ha mencionado anteriormente este es un control indirecto.

Es importante hacer notar que en todos los experimentos, cuando las células provenían de diferentes animales, se hizo una mezcla de todas las células a utilizar con el objeto de garantizar que controles y pruebas se realizaron a la misma población celular.

RESULTADOS

PRODUCCION DE FcRI, C₃RI Y MGI POR MACROFAGOS DE LA CAVIDAD PERITONEAL.

Con la finalidad de determinar la existencia de los factores inductores a la formación de receptores Fc (FcRI) y C₃ (C₃RI) así como del factor inductor de macrófagos y granulocitos (MGI), en medios condicionados (MC) por macrófagos de la cavidad peritoneal de ratón, se cultivaron tanto los macrófagos residentes (MacR), como los inducidos (MacI) a dicha cavidad.

Además, para determinar si la producción de estos factores es estimulada por productos de origen bacteriano, se produjeron MC por ambos tipos de fagocitos tanto en presencia como en ausencia de 10 µl/ml de lipopolisacáridos (LPS) provenientes de la pared celular de Salmonella typhimurium.

Para determinar el tipo celular que produce el FcRI se obtuvieron MC por MacR (MC-MacR), MC por MacI (MC-MacI), MC-MacR en presencia de LPS (MC-MacR-LPS) y MC-MacI en presencia de LPS (MC-MacI-LPS), de 4 días de incubación; de los cuales, al utilizar 500 µl, únicamente el MC-MacR-LPS indujo la formación de receptores Fc en células de médula ósea con un 25% de rosetas en un experimento y 24% en el otro, respecto a los controles sin MC que fueron de 15 y 16% (Tabla 1).

Una vez encontrado que el MC-MacR-LPS contenía el FcRI, se procedió a determinar si también este medio contenía el C₃RI. Para ello se ensayaron 100 µl de este MC y se evaluó la inducción tanto de receptores para Fc como para C₃. Mientras que se obtuvieron 22 y 18% de rosetas

Fc, respecto a 9 y 10% en el ensayo sin MC, para rosetas C₃ se encontró 15 y 42% respecto a 11 y 20% sin MC en el experimento 1 y el experimento 2 respectivamente. (Tabla 2). Ya que aún en presencia de LPS los MacI no produjeron el FcRI, se colectó y probó MC-MacI-LPS de 16 días de incubación, considerando que si después de 16 días en presencia de LPS no se detectaba en el MC este factor, era muy probable que este tipo celular no fuese capaz de producirlo.

Utilizando 100 µl de MC-MacI-LPS de 16 días no se encontró actividad inductora para receptores de Fc y C₃ ya que mientras que en los controles sin MC se obtuvo 10 y 16% para Fc y, 11 y 13% para C₃, en los ensayos con MC se obtuvo 10 y 17% de rosetas Fc y, 10 y 10% para rosetas C₃ en el experimento 1 y el experimento 2 respectivamente (Tabla 3).

Con la finalidad de determinar el tipo celular que induce la formación de colonias y el tiempo en el cual se produce el MGI, se utilizaron 500 µl de MC-MacR, MC-MacR-LPS, MC-MacI y MC-MacI-LPS de 4, 8 y 16 días de incubación. Sólomente los MC por MacI indujeron a la formación de colonias y esto únicamente cuando se usaron MC de 8 y 16 días (Tabla 4). Los resultados indican que existe un aumento en la inducción con la adición de LPS.

APARICION DE RECEPTORES Fc Y C₃ EN MACROFAGOS RESIDENTES DE LA CAVIDAD PERITONEAL, A DIFERENTES DIAS DE INCUBACION.

Una vez determinado que los MacR son los productores del FcRI y C₃RI, se pensó en la posibilidad de que la secreción de estos factores por los MacR pudiera estimularlos a la formación de receptores para Fc y C₃. Para averiguar si esta autoinducción existía se cultivaron dichos fagocitos durante 0, 1, 2, 4 y 8 días encontrándose un 13, 29, 43, 68 y 81% de rosetas para Fc en el experimento 1, un 18, 31, 49, 72 y 70% en el experimento 2 y un 17, 22, 42, 74 y 81% en el experimento 3; mientras que para los receptores C₃ se encontró un 47, 52, 50, 65 y 93% en el ex-

TABLA 1. DETECCION DE FcRI EN MEDIOS CONDICIONADOS POR MACROFAGOS PERITONEALES EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE LIPOPOLISACARIDOS, MEDIANTE EL CULTIVO CON CELULAS MIELOIDES.

TIPO	MC-MacR			MC-MacI			SIN MC
	L	P	S	L	P	S	
DE MC	+		-	+		-	
PORCENTAJE DE ROSETAS Fc	Exp.1	23	12	17	15		15
	Exp.2	24	16	13	10		16

Se cultivaron 8×10^6 células mieloides durante 4 días en presencia de 500 μ l de los diferentes medios condicionados de 4 días de incubación.

MC, medio condicionado; MacR, macrófagos residentes; MacI, macrófagos inducidos; LPS, lipopolisacáridos. +, presencia de LPS; -, ausencia de LPS.

TABLA 2. INDUCCION A LA APARICION DE RECEPTORES PARA Fc Y C₃ EN CELULAS DE MEDULA OSEA POR MEDIO CONDICIONADO POR MACROFAGOS RESIDENTES EN PRESENCIA DE LIPOPOLISACARIDOS.

TIPO DE MC		MC-MacR-LPS	SIN MC	
PORCENTAJE DE ROSETAS	Fc	Exp.1	22	9
		Exp.2	18	10
	C ₃	Exp.1	42	20
		Exp.2	15	11

Durante 4 días se cultivaron 8×10^6 células de médula ósea en presencia de 100 μ l del medio condicionado de 4 días de incubación en presencia de LPS.

MC, medio condicionado; MacR, macrófagos residentes; LPS, lipopolisacáridos.

TABLA 3. INDUCCION A LA APARICION DE RECEPTORES PARA Fc Y C₃ EN CELULAS MIELOIDES POR MEDIO CONDICIONADO POR MACROFAGOS INDUCIDOS EN PRESENCIA DE LIPOPOLISACARIDOS.

TIPO DE MC		MC-MacI-LPS	SIN MC
PORCENTAJE	Fc	Exp.1	10
		Exp.2	17
DE	C ₃	Exp.1	11
		Exp. 2	13
ROSETAS			

Se cultivaron células mieloides (8×10^6) durante 4 días en presencia de 100 μ l del medio condicionado por macrófagos inducidos durante 16 días de incubación en presencia de LPS. MC, medio condicionado; MacI, macrófagos inducidos; LPS, lipopolisacáridos.

TABLA 4. FORMACION DE COLONIAS POR CELULAS DE MEDULA OSEA EN BICAPA DE AGAR EN PRESENCIA DE DIFERENTES MEDIOS CONDICIONADOS POR MACROFAGOS PERITONEALES.

DIAS DE INCUBACION DE LOS MC	MC-MacR						MC-MacI					
	L P S			L P S			L P S			L P S		
	+			-			+			-		
	Experimento			Experimento			Experimento			Experimento		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	4	7	9	0*	0*	4
16	0	0	0	0	0	0	49	72	123	19	48	87

Las colonias fueron inducidas en 1×10^5 células mieloides en bicapa de agar por 500 μ l de los diferentes medios condicionados. Para la formación de colonias, las células se mantuvieron 6 días en cultivo.

* agrupaciones de menos de 10 células; MC, medio condicionado; MacR, macrófagos residentes; MacI, macrófagos inducidos; LPS, lipopolisacáridos; +, presencia de LPS; -, ausencia de LPS.

Debido a las características del inductor, en todos los casos los controles fueron 0 colonias.

TABLA 5. APARICION DE RECEPTORES PARA Fc Y C₃ EN MACROFAGOS RESIDENTES DE LA CAVIDAD PERITONEAL A DIFERENTES DIAS DE INCUBACION.

	P O R C E N T A J E D E R O S E T A S					
	Fc			C ₃		
	Experimento			Experimento		
	1	2	3	1	2	3
DIAS DE INCUBACION DE LOS MacR						
0	13	18	7	47	67	44
1	29	31	22	52	59	47
2	43	49	42	50	66	49
4	68	72	74	66	76	63
8	81	70	81	93	91	93

MacR, macrófagos residentes.

Durante 4 días se incubaron 8×10^6 células mieloides en presencia de los medios condicionados.

perimento 1, un 67, 59, 66, 76 y 91% en el experimento 2 y un 44, 47, 49, 63 y 93% en el experimento 3, respectivamente (Tabla 5). Es importante hacer notar que mientras aproximadamente un 15% de los MacR poseían receptores para Fc en el tiempo 0, casi la mitad los tenían para C_3 . Asimismo, en tanto que el incremento de la aparición de receptores para Fc en función del tiempo es constante, hasta llegar a más del 80% a los 8 días de cultivo; las células con receptores para C_3 se mantienen constantes durante los primeros 2 días de cultivo para luego incrementar fuertemente, hasta llegar casi al 100% a los 8 días de incubación.

En consecuencia, los resultados indican que sí existe un aumento de ambos receptores en los MacR en función del tiempo de cultivo y que debido a que sabemos que estas células producen FcRI y C_3 RI, puede pensarse que este aumento es debido a un mecanismo de autoinducción.

DOSIS-RESPUESTA DE LA INDUCCION DE RECEPTORES Fc Y C_3 CONTENIDOS EN EL MC-MacR-LPS DE 4 DIAS DE INCUBACION.

Para evaluar la respuesta a la inducción de receptores para Fc y C_3 por el MC-MacR-LPS de 4 días de incubación a diferentes concentraciones del mismo, se cultivaron células mieloides en presencia de 0, 1, 3, 9, 27 y 81 μ l de dicho MC. Se detectó para Fc la aparición de 5, 5, 5, 7, 12 y 21% de rosetas en el experimento 1 y un 0, 1, 3, 7, 15 y 20% en el experimento 2; y para la inducción de receptores C_3 la aparición de 11, 11, 11, 16, 21 y 27% de rosetas en el experimento 1 y un 12, 11, 12, 15, 20 y 26% en el experimento 2, respectivamente. Por lo tanto, las actividades tanto del FcRI como del C_3 RI, contenidas en el MC-MacR-LPS utilizado fueron detectadas, en nuestras condiciones de cultivo, a partir de los 9 μ l (Tabla 6). Posteriormente, la inducción de ambos receptores aumenta hasta que se llega a un máximo a los 81 μ l. Cabe hacer no

TABLA 6. DOSIS-RESPUESTA DE LA INDUCCION DE RECEPTORES Fc Y C₃ POR MEDIO CONDICIONADO DE MACROFAGOS RESIDENTES EN PRESENCIA DE LIPOPOLISACARIDOS.

CONCENTRACION (µl)	PORCENTAJE DE ROSETAS			
	Fc		C ₃	
	Experimento		Experimento	
	1	2	1	2
0	5	0	11	12
1	5	1	11	11
3	5	3	11	12
9	7	7	16	15
27	12	15	21	20
81	21	20	28	26

Se cultivaron 8×10^6 células de médula ósea durante 4 días en presencia de las diferentes concentraciones del medio inductor.

tar que la respuesta mediada por el C_3 R1 es más acentuada que la del FcR1.

CINETICA DE LA APARICION Y DETERMINACION DE LA CAPACIDAD PRODUCTORA DE FcR1 POR LOS MACROFAGOS RESIDENTES DE LA CAVIDAD PERITONEAL.

Tomando en consideración que el FcR1 contenido en el MC-MacR-LPS de 4 días proporciona una buena respuesta, se consideró conveniente inducir la formación de receptores para Fc con cantidades mucho menores de estos MC, las cuales garanticen que no se llegue a saturación, para de esta manera determinar comparando la inducción producida a los 4 y 8 días, si las células continúan produciendo FcR1 durante más de una semana; puesto que al efectuar el ensayo de sensibilidad (Tabla 6) se encontró actividad a partir de los 9 μ l, se creyó conveniente utilizar 6 μ l de diferentes MC. Para ello, se produjeron y probaron con células de médula ósea MC-MacR-LPS de 2, 4 y 8 días de incubación, junto con un ensayo de 10 μ l del MC de 4 días para asegurar, mediante la comparación de los valores obtenidos con 6 y 10 μ l, que no se estaba en saturación. Los resultados señalan que la actividad inductora es detectable en el MC desde los dos días de incubación con un 22 y 15% en el experimento 1 y 2 sobre los controles sin MC de 18 y 11%, respectivamente; la inducción es similar con MC-MacR-LPS de 4 y 8 días de cultivo. El ensayo con 10 μ l produjo una aparición mayor de receptores Fc (35% en el experimento 1 y 18% en el experimento 2) que los inducidos con 6 μ l lo cual indica que no se estaba en saturación (Tabla 7). En consecuencia, al observar que en estas condiciones los MC de 4 y 8 días contienen aproximadamente la misma cantidad de FcR1, se consideró que los MacR no siguen produciendo este factor más allá de los 4 días de incubación; no obstante, cabe hacer notar que esta interrupción en la producción del factor, a criterio per-

TABLA 7. INDUCCION A LA FORMACION DE RECEPTORES Fc EN CELULAS DE MEDULA OSEA UTILIZANDO 6 μ l DE MC-MacR-LPS DE 2, 4 Y 8 DIAS DE INCUBACION.

DIAS DE INCUBACION		2	4	8	4*	SIN MC
PORCENTAJE DE ROSETAS Fc	Exp.1	22	26	24	35	18
	Exp.2	15	15	15	18	11

Se cultivaron 8×10^6 células de médula ósea durante 4 días en presencia de los diferentes medios condicionados.

* Se utilizaron 10 μ l de MC-MacR-LPS de 4 días como control positivo.

MC, medio condicionado; MacR, macrófagos residentes; LPS, lipopolisacáridos.

sonal, no es consecuencia de daño celular pues aún después de 16 días de cultivo las células se observaban morfológicamente íntegras (birefringentes y esféricas).

APARICION DE RECEPTORES Fc Y C₃ EN CELULAS MIELOIDES INDUCIDAS POR MC-MacR-LPS DE 4 DIAS DE INCUBACION OBTENIDO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUERO DE CABALLO.

Debido a la gran cantidad y diversidad de moléculas de tipo proteico existentes en el suero de animales y considerando la importancia de la purificación bioquímica de ambos factores inductores, se procedió a determinar la cantidad mínima necesaria de suero de caballo en el medio de cultivo durante la incubación de los MacR para la producción de FcRI y C₃RI. Se obtuvieron MC-MacR-LPS de 4 días de incubación con diferentes cantidades de suero de caballo; las concentraciones elegidas fueron: 0% puesto que sería la ideal para nuestros propósitos al presentar la menor cantidad de moléculas exógenas y 1% ya que aportaría elementos que se creen indispensables para ciertas funciones celulares sin introducir muchas moléculas externas. Posteriormente para el ensayo se añadieron 100 µl de cada MC a células mieloides obteniendo un 22 y 16% de rosetas Fc en el experimento 1 y, un 18 y 18% en el experimento 2 respecto a los controles de 7 y 10%; mientras que para rosetas C₃ se obtuvo un 6 y 3% en el experimento 1 y un 28 y 27% en el experimento 2, comparado con los controles de 1 y 17%; respectivamente (Tabla 8).

Los resultados muestran la mejor respuesta a la inducción de receptores tanto para Fc como para C₃, en aquellas células mieloides inducidas por el MC obtenido en ausencia de suero, lo que permite pensar que los elementos contenidos en él, no son necesarios para la liberación de FcRI y C₃RI a los MC. Por lo anterior, se considera que el MC-MacR-LPS obtenido en ausencia de suero es lo suficientemente concentrado y escaso en moléculas exógenas como para efectuar un proceso de purificación bioquímica.

TABLA 8. RECEPTORES Fc Y C₃ INDUCIDOS EN CELULAS MIELOIDES POR MC-MacR-LPS DE 4 DIAS OBTENIDO CON DIFERENTES CANTIDADES DE SUERO DE CABALLO DURANTE LA INCUBACION.

CONCENTRACION DE SUERO DE CABALLO EN EL MC-MacR-LPS			0%	1%	SIN MC
PORCENTAJE DE	Fc	Exp.1	22	16	7
		Exp.2	18	18	10
ROSETAS	C ₃	Exp.1	6	3	1
		Exp.2	28	27	17

Durante 4 días se cultivaron 8×10^6 células de médula ósea con 100 µl de cada medio condicionado.

MC, medio condicionado; MacR, macrófagos residentes; LPS, lipopolisacáridos.

DISCUSION

En general, en la actualidad se considera que todos los macrófagos de la cavidad peritoneal provienen del monocito producido en la médula ósea. Aunque no hay duda de que este sea el caso para los macrófagos inducidos, existen algunos trabajos que contemplan la posibilidad de que un precursor mesenquimatoso existente en la misma cavidad sea capaz de generar y mantener a dicha población residente.

Los resultados del presente trabajo indican que los macrófagos residentes (MacR) producen los factores inductores a la formación de receptores Fc (FcRI) y C_3 (C_3 RI) en células mieloides en presencia de lipopolisacáridos (LPS); mientras que los macrófagos inducidos (MacI) a la cavidad peritoneal mediante una reacción inflamatoria fueron incapaces de secretar estos factores. Por otra parte, el factor inductor de macrófagos y granulocitos (MGI) sólo fué producido por los MacI; en este caso, se observó un incremento de la respuesta en presencia de LPS. Esta heterogeneidad funcional entre los MacR y los MacI sugiere que la célula precursora de estos fagocitos sea diferente.

En vista de que los MacI provienen del monocito de la sangre periférica y que los resultados aquí reportados indican la existencia de otro tipo de precursores para los MacR, puede apoyarse la teoría de la presencia de un precursor mesenquimatoso local para la población residente. Sin embargo, no hay que perder de vista que los MacR pueden provenir del monocito y haber cambiado sus propiedades funcionales después de una larga estancia en

la cavidad peritoneal. Esta última posibilidad implica que ambos tipos de macrófagos representes diferentes grados de diferenciación de un mismo precursor.

Independientemente del origen de los macrófagos de la cavidad peritoneal, la función de ambos tipos de fagocitos en la defensa del organismo contra cuerpos extraños puede ser complementaria; ya que los MacI al fabricar MGI, garantizan el suministro de fagocitos provenientes de la médula ósea y los MacR al secretar FcRI y C₃RI, aumentan la capacidad de reconocimiento del elemento extraño mediante la inducción a la aparición de receptores para Fc y C₃ tanto en las células recién llegadas a la cavidad como en las residentes. Más aún, si dicho cuerpo extraño resulta ser una bacteria los LPS de su pared celular (como se reporta en este trabajo), aumentarían considerablemente la producción de estos factores y por consiguiente la inmunofagocitosis anterior a la eliminación del agente exógeno.

El hecho de que los MacR de la cavidad peritoneal en presencia de LPS producen el FcRI y el C₃RI en forma detectable ya desde el cuarto día de incubación, implica que la respuesta de inmunofagocitosis aparece en este sistema de manera temprana; en consecuencia, se puede argumentar que es prioritario para la defensa del organismo aumentar los receptores inmunológicos de los fagocitos atraídos en forma masiva de la reserva medular entre los cuales existe un bajo porcentaje con receptores para Fc y C₃. Por lo tanto, los MacR, el FcRI y el C₃RI secretados por ellos, y los granulocitos y monocitos provenientes de la reserva medular activados por estos factores, constituirían la primera línea de defensa del organismo contra infecciones bacterianas. Posteriormente si esta defensa no fuera suficiente, la producción tardía (a los 8 días de incubación) de MGI por los MacI, aumentaría el número de células inmunocompetentes en la cavidad peritoneal facilitando así la eliminación del agente exógeno. Es importante hacer notar que el MGI

aquí reportado es diferente (156) al que tempranamente se produce en el organismo en cualquier proceso defensivo. La aparición de dicho MGI tardío probablemente representaría un mecanismo de atracción a la cavidad peritoneal de células específicas que constituyesen la segunda línea de defensa en el proceso que se está llevando a cabo.

En adición al poder inductor que tienen el FcRI y C₃RI en los fagocitos atraídos a la cavidad peritoneal. existe un fenómeno de autoinducción mediante el cual aumenta la cantidad de MacR que poseen receptores, sumándose de esta forma a la que en el presente trabajo se ha llamado la primera línea de defensa. Esta autoinducción resultó ser muy importante en los receptores para Fc mientras que de menor cuantía en el caso de los receptores para C₃, lo cual indica que posiblemente los MacR fueron expuestos mayoritariamente a C₃RI durante su estancia en la cavidad peritoneal ó que se encuentran en un estado de diferenciación tal, que manifiestan más el receptor para C₃ necesitando un período de mayor maduración para la óptima presentación de ambos receptores.

Teniendo en consideración que los MacR cesaron la producción del FcRI al cuarto día de cultivo, se podría pensar en la carencia en el medio de cultivo de los elementos indispensables para la síntesis y secreción de los factores ó en un agotamiento celular. En vista de que en ausencia de suero de caballo se obtuvo una alta producción de FcRI y C₃RI, se considera que la falta de nutrientes no es el factor limitante. En consecuencia, la suposición de que las células tienen una capacidad limitada para producir los factores sería la más probable. Además, el hecho de que una buena producción de estos factores se realizó en un medio carente de suero de caballo indicaría que los MacR contienen una reserva de FcRI y C₃RI la cual es liberada en cultivo.

Sería recomendable repetir estos experimentos en presencia de suero de ratón para evaluar esta suposición y además para demostrar si estas células tienen la capacidad, en presencia de suero autólogo, de sintetizar di novo estos factores y no únicamente liberar sus reservas. Por último, al producir un medio condicionado en ausencia de suero de caballo y con una sensibilidad tal que 100 μ l de éste proporcionan una buena respuesta de inducción para receptores para Fc y C₃ en células de médula ósea, se cree tener una fuente lo suficientemente activa como para proceder a su purificación bioquímica, la cual sería de gran importancia tanto por su posible aplicación terapéutica en padecimientos en los cuales un aumento de receptores para Fc y C₃ pueda ser de utilidad, como por su probable valor diagnóstico mediante la producción de anticuerpos que permitan detectar en forma inmediata la existencia de niveles anormales de estos factores en el organismo y como por su utilización en el estudio de los mecanismos de diferenciación celular e inmunofagocitosis.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Weiss, L. 1977. The Blood. En: Histology. (Weiss, L. ed.). Cap. 10. p 432. Mc Graw Hill, New York.
- 2.- Quesenberry, P. Levitt, L. 1979. Hematopoietic stem cells. New Eng J Med 301: 755.
- 3.- Maximov, A.A. 1924. Relation of blood cells to connective tissues and endothelium. Physiol Rev 4: 533.
- 4.- Sabin, F.R. Miller, F.R. Smithburn, K.C. 1976. Changes in the bone marrow and blood cells of developing rabbits. J Exp Med 64: 97.
- 5.- Ford, C.E. Hamerton, J.L. Barnes, B.W.H. 1956. Cytological identification of radiation -chimaeras. Nature 452: 453.
- 6.- Lindsley, D.L. Odell T.T. Tausche, F.G. 1955. Implantation of functional erythropoietin elements following total body irradiation. Proc Soc Exp Biol Med 90: 512.
- 7.- Mitchison, N.A. 1956. The colonisation of irradiated tissue by transplanted tissue spleen cells. Br J Exp Pathol 37: 239.
- 8.- Nowell, P.C. Cole, L.J. Habermayer, J.G. 1956. Growth and continued function of rat marrow cells in X-radiated mice. Cancer Res 16: 258.

- 9.- Till, J.E. McCulloch, E.A. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat Res.14: 213-222
- 10.- Becker, A.J. McCulloch, E.A. Till, J.E. 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. Nature 197: 452-455
- 11.- Curry, J.L. Trentin, J.J. 1967. Hemopoietic spleen colony studies. I Growth and differentiation Dev Biol 15:395-413
- 12.- Curry, J.L. Trentin, J.J. Cheng, U. 1967. Hemopoietic spleen colony studies. III. Hemopoietic nature of spleen colonies induced by lymph node or thymus cells, with or without phytohemagglutinin. J Immunol 99: 907-916
- 13.- Trentin J. Wolf, N. Cheng, U. et al. 1967. Antibody production by mice repopulated with limited numbers of clones of lymphoid cell precursors. J Immunol 98: 1326-1337
- 14.- Dexter, TM1978. Stem Cells in vitro. En: Hematopoietic Cell Differentiation. Vol. X (Golde DW Cline M. Metcalf, D. Moore MAS. eds.). Academic Press, N. York. p 163-173.
- 15.- Philips, R.A. Jones, E.V. Miller, R.G. 1978. Differentia Potential of Hematopoietic Stem Cells En: Hematopoietic Cell Differentiation. Vol X (Golde DW. Cline M., Metcalf D., Moore MAS, eds.). p 129-131. Academic Press, New York.

- 16.- Bach, J.F. 1978. Immunology. First edition. Wiley Medical, New York. p 72-76.
- 17.- Wolf, N.S. Trentin, J.J. 1968. Hemopoietic colony studies V. Effect of hemopoietic organ stroma on differentiation of pluripotent stem cells. J Exp Med 127: 205-214.
- 18.- Reissmann, K.R. 1950. Studies of the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hipoxia. Blood 5: 372-380.
- 19.- Bleiberg, I. Liron M. Feldman M. 1967. Studies on the regulation of hemopoietic spleen colonies. Blood 29: 469-480.
- 20.- Curry, J.L. Trentin, J.J. Wolf, N. 1967. Hemopoietic spleen colony studies. II. Erythropoiesis. J Exp Med 125: 703-719.
- 21.- Bradley, T.R. Metcalf, D. 1966. The growth of bone marrow cells in vitro. Aust J Exp Biol Med Sci 44: 287-300.
- 22.- Pluznik, D.H. Sachs, L. 1965. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. J Cell Comp Physiol 66: 319-324.
- 23.- Eaves, A. Bruce, W. 1973. In vitro production of colony stimulating activity. I. Exposure of mouse peritoneal cell to endotoxin. Cell Tissue Kinet 7: 19.
- 24.- Price, G. Krosgrud, R. Steward, S. Gen, J. 1978. Heterogeneity of colony stimulating activities. En: Hematopoietic Cell Differentiation Vol X (Golde, D.W. Cline, M. Metcalf, D. Moore, M.A.S. eds.). Academic Press, New York.

- 25.- Ralph, P. Broxmeyer, H. Moore, R. Nakoinis, I. 1978. In-
duction of myeloid colony stimulating acti-
vity in murine monocyte tumor cell lines by
macrophage activators as in a "T" cell by
Concavalin A. Cancer Research 38: 1414.
- 26.- Metcalf, D. Johnson, G.R. Burger, A.W. 1980. Direct sti-
mulation by purified GM-CSF of the prolifera-
tion of multipotential and erythroid precu-
sor cells. Blood: 55:1.
- 27.- Steward, C. Lin, H. 1978. Macrophage Growth factor
and its relationship to colony stimulating
factor. J Reticul Endothel Soc 4: 269.
- 28.- Laukel, H. Gasel, W.D. Doch, M.H. Haverman, K. 1978.
Preparation of colony stimulating activity
from large batches of human urine and produc-
tion of antisera against it. J Cell Physiol
94: 21.
- 29.- Di Persio, J.F. Brennan, J.K. Lichman, M.A. Spicer,
B.L. 1978 Granulocyte grow modulators elabo-
rated by human cell lines in hematopoietic
cell differentiation. Blood 51: 3.
- 30.- Metcalf, D. Foster, R. 1977. Behavior of transfer of
serum stimulated bone marrow colonies. Proc
Nat Acad Sci 68: 10.
- 31.- Landau, T. Sachs, L. 1971. Characterization of the
inducer required for the development of ma-
crophage granulocytes colonies. Proc Nat Acad
Sci 68: 10.
- 32.- Bianco, C. Patrick, P. Nussenzweig, V. 1970. A po-
pulations of lymphocytes bearing a membrane
for antigen-antibody complement complexes.

1. Separation and characterization. J Exp Med 132: 702.

- 33.- Ming-Chi, W. Cini, J. 1979. Purification of colony stimulating factor for culture pancreatic carcinoma cells. J Biol Chem 254: 14.
- 34.- McGue, R. Kiyono, H. Michalek, M. 1980. Regulation of LPS induced granulopoiesis and macrophage formation by spleen cells. J Immunol 1244: 1603.
- 35.- Apte, R. Hertogs, CH. Pluznik, D. 1980. Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response J Immunol 1243: 1223.
- 36.- Cline, M. Rotham, B. Golde, D. 1974. Effect of the endotoxin on the production of colony stimulating factor by human monocyte and macrophage. J Cell Physiol 84: 193.
- 37.- Lotem, J. Sachs, L. 1974. Different blocks in the differentiation of myeloid leukemic cells. Proc Nat Acad Sci 71: 3507.
- 38.- Griffin, D.F. 1981. Activation of murine T lymphocyte with LPS. J Immunol 1262: 1186.
- 39.- Stanley, E. Robinson, W. Ada, G. 1968. Properties of colony stimulating factors in leukemic and normal mouse serum. Exp Biol Med Sci 46: 715.
- 40.- Burges, A. Camakaris, J. Metcalf, D. 1976. Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung conditioned medium. J Biol Chem 252: 1998.

- 41.- Burges, A. Metcalf, D. 1978. Purification and characterization of cell specific colony stimulating factor. En: Hematopoietic Stem Cell Differentiation. Vol X. Academic Press, New York.
- 42.- Ham, A. Tratado de Histologia. 4a ed. Ed. Interamericana. p 248.
- 43.- Carr, I. 1973. The Macrophage: A review of ultrastructure and function. Academic Press, New York.
- 44.- Daems, W. Wisse, E. Brederoo, P. Emeis, J.J. 1975. Peroxidatic activity in monocytes and macrophages. En: Immunity, infection and Pathology (R. van Furth ed.) pp 57-67. Blackwell, London.
- 45.- Allison, A. Davies, P. de Petris, S. 1971. Role of contractile microfilaments in macrophage movement and endocytosis. Nature New Biol 232: 153.
- 46.- Allison, A. Davies, P. 1975. Increased biochemical and biological activities of mononuclear phagocytes exposed to various stimuli, with reference to secretion of lysosomal enzymes. En: Mononuclear Phagocytes in Immunity, infection and pathology (r. van Furth ed.) pp 487-504. Blackwell, London.
- 47.- Kay, N. Douglas, D. 1977. Mononuclear phagocyte: Development, structure, function and involvement in immune response. N Y State J Med 77: 327.
- 48.- Nelson, D. (ed.) 1976. Immunobiology of the Macrophage. Academic Press, New York.

- 49.- Mc Keever, P. Spicer, S. 1980. Surface Receptor of Mononuclear Phagocytes. En: Reticuloendothelial System. Vol I. (Carr, I. Daems, W. eds.) Plenum Press, New York. pp 161-258.
- 50.- Mc Keever, P. Balatine, J. 1978. Macrophage migration through the brain parenchyma to the perivascular space following particle ingestion. Am J Pathol 93: 191.
- 51.- Stubbs, M. Kuhner, A. Glass, E. David, J. Karnovsky, M. 1973. Metabolic and functional studies on activated mouse macrophages. J Exp Med 137: 537.
- 52.- Diener, E. Peaetkau, V. 1976. Antigen Recognition early surface receptor phenomena induced by binding of a tritium labeled antigen. Proc Nat Acad Sci 69: 2364.
- 53.- Musson, R. Henson, P. 1979. Humoral and formed elements of blood monocytes. I. Plasma and serum inhibit and platelets enhanced monocyte adherence. J Immunol 122: 2026.
- 54.- Vaughan, R. 1965. The discriminative behaviour of rabbit phagocytes. BR. J Pathol 146: 71.
- 55.- Jones, T. 1975. Attachment and ingestion phases of phagocytes. En: Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology (R. van Furth ed.) Blacwell, Oxford. pp 269-282.
- 56.- Muller- Eberhard, H. 1968. Chemistry and action mechanism of complement. Adv Immunol 8: 1.
- 57.- Haranaka, K. Matsuo, M. Mashimo, K. 1977. The enhancement of phagocytosis and intracellular killing of Pseudomonas aeruginosa and its common antigen (OEP) coated latex particles

by mouse spleen macrophages to which anti-OEP-IgG and gentamicin have been added. Jpn J Exp Med 47: 35.

- 58.- Diamond, B. Birshtein, B. Scharff, M. 1979. Site of binding of mouse IgG_{2b} to the Fc receptor in mouse macrophages. J Exp Med 150: 721.
- 59.- Dorrington, K. 1976. Properties of the Fc receptor in macrophages and monocytes. Immunol Commun 5: 263.
- 60.- Shear, H. Nussenzweig, R. Bianco, C. 1979. Immune phagocytosis in murine malaria. J Exp Med 149: 1288.
- 61.- Kassis, A. Aikawa, M. Mahmoud, A. 1979. Mouse antibody dependent eosinophil and macrophage adherence and damage to schistomula of Schistosoma mansoni. J Immunol 122: 398.
- 62.- Knyszynski, A. Lebovich, S. Danon, D. 1977. Phagocytosis of "old" red blood cell by macrophages from singenic mice in vitro. Exp Hematol 5: 480.
- 63.- Kay, M. 1975. Mechanism of removal of senescent cell by human macrophages in situ. Proc. Nat. Acad Sci 72: 3521.
- 64.- Jancik, J. Schaver, R. 1978. Sequestration of neuroaminidase treated erythrocyte. Studies on it is topographic, morphologic and immunologic aspects. Cell Tissue Res 186: 209.
- 65.- Nicolson, G. 1973. Neuraminidase "unmasking" and failure of trypsin to "unmask" B-D-galactose like sites on erythrocyte, lymphoma, and

normal and virus-transformed fibroblast cell membranes. J Nat Can Inst 50: 1443.

- 66.- Bianco, C. 1976. Methods of study of macrophage Fc and C₃ receptors. En: In vitro methods in cell mediated and tumor immunity. (Bloom, B. Davies, J. eds.) pp 407-415. Academic Press, New York.
- 67.- Thrasher, S. Bigazzi, P. Yhosida, T. Cohen, S. 1975. Distribution of cytophilic and anti-macrophage antibody on the macrophage surface. Immunol Commun 4: 219.
- 68.- Kuhn, R. Cassida, G. 1978. An indirect quantifiable assay for cytophilic antibody. J Immunol Methods 19: 387.
- 69.- Unkeless, J. Eisen, H. 1975. Binding of monomeric immunoglobins to Fc receptors of mouse macrophages. J Exp Med 142: 1520.
- 70.- Segal, D. Hurwitz, E. 1977. Binding of affinity cross-linked oligomers of IgG to cell bearing Fc receptors. J Immunol 118: 1338.
- 71.- Phillips-Quagliata, J. Levine, B. Quagliata, F. Uhr, J. 1971. Mechanism of underlying binding of immune complexes to macrophages. J Exp Med 133: 589.
- 72.- Segal, D.M. Titus, J. 1978. The subclass specificity for the binding of murine lyeloma proteins to macrophage and lymphocyte cell lines and to normal spleen cells. J Immunol 120: 1395.
- 73.- Benacerraf, B. 1968. Cytophilic immunoglobulins and delayed hypersensitivity. Fed Proc 27: 46.

- 74.- Shinomiya, T. Koyama, J. 1976. In vitro uptake and digestion of immune complexes containing guinea pig IgG₁ and IgG₂ antibodies by macrophages. Immunology 30: 267
- 75.- Thrasher, S. Cohen, S. 1971. Studies of the mechanism of binding of chemical modified cytophilic antibody to macrophages. J Immunol 107: 672.
- 76.- Huber, H. Holme, G. 1975. Surface receptor of mononuclear phagocytes: effect of immune complexes on in vitro function of human monocytes. En: Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology. (R. van Furth ed.) Blackwell, Oxford. pp 291-301.
- 77.- Grey, H. Anderson, C. Heusser, C. Borthistle, B. von Eschen, K. Shuller, J. 1976. Structural and functional heterogeneity of Fc receptors. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 41:315.
- 78.- Unkeless, J. Eissen, H. 1975. Binding of monomeric immunoglobulin to Fc receptors of mouse macrophages. J Exp Med 142: 1520.
- 79.- Mc Keever, P. Garvin, A. Spicer, S. 1976. Immune complexes receptors in cell surface. Ultrastructural demonstration of macrophages. J Histochem Cytochem 24: 948.
- 80.- Mc Keever, P. Garvin, A. Hardin, D. Spicer, S. 1976. Immune complex receptors on cell surface. II. Cytochemical evaluation of their abundance on different immune cells. Am J Pathol 84: 437.

- 81.- Munthe-Kass, A.S. 1976. Phagocytosis in rat Kuffer cells in vitro. Exp Cell Res 99: 319.
- 82.- Gigli, I. Nelson, R. 1968. Complement dependent immune phagocytosis. I. Requiriments for C₁, C₄, C₂, C₃. Exp Cell Res 51: 45.
- 83.- Alper, C. Abramson, N. Johnston, R. Jandl, J. Rosen, F. 1970. Studies in vivo and in vitro on an abnormality in the metabolism of C₃ in patients with increased susceptibility to infection. J Clin Invest 49:1975.
- 84.- Alper, C. Colten, H. Rosen, F. Rabson, A. Macnab, G. Gear, J. 1972. Homozygous deficiency of C₃ in a patient with repeated infection. Lancet 2: 1179.
- 85.- Ward, H. Enders, J. 1933. An analysis of the opsonic and tropic action of normal and immune sera based on experimental with the Pneumo coccus. J Exp Med 57: 527.
- 86.- Mc Conell, I. Lachman, P. 1977. Complement receptor and cell components. En: Immunology of receptors (B. Cinader, ed.). Marcel Dekker. New York. p 111.
- 87.- Heilman, D.H. 1977. Regulation of endotoxin-induced inhibition of macrophage migration by fresh serum. Infect Immun 17: 371.
- 88.- Bianco, C. Griffin, D.F. and Silverstein, S. 1975. Studies of the macrophage complement receptor. Alteration of receptor function upon macrophage activation. J Exp Med 141: 1278.

- 89.- Griffin, Jr. F. Bianco, C. Silverstein, S. 1975. Characterization of the macrophage receptor for complement and demonstration of its functional independence from the receptor for the Fc portion of immunoglobulin G. J Exp Med 141: 1269.
- 90.- Montovani, B. Rabinovitch, M. Nussenzweig, V. 1972. Phagocytosis of immune complexes by macrophages. Different roles of the macrophage receptor sites for complement (C₃) and for immunoglobulin (IgG). J Exp Med 135: 780.
- 91.- Ehlenberg, A.C. Nussenzweig, V. 1977. The role of membrane receptor for C_{3b} and C_{3d} in phagocytosis. J Exp Med 145: 1563.
- 92.- Lay, W.E. Nussenzweig, V. 1968. Receptors for the complement on leukocytes. J Exp Med 128: 991.
- 93.- Daughaday, C. Douglas, C. 1976. Membrane receptors on rabbit and human pulmonary alveolar macrophages. J Reticul Soc 19: 37.
- 94.- Rabellino, E.M. Gordon, D.F. Williams, N. Metcalf, D. 1978. Sequential expression of membrane receptors and phagocytic capacity during leukocyte differentiation. J Exp Med 147: 434.
- 95.- Fudenberg, H. 1978. Manual de Inmunología Clínica. Primera edición. Ed. El Manual Moderno. México. pp 30-66.
- 96.- Bhagavan, N.V. 1978. Biochemistry. Second edition. Lippincott Company, Philadelphia. pp 1050-1060.

- 97.- Osler, A.G. Sandberg, A.L. 1973. Alternate complement pathways. Prog. Allergy 17: 51-58.
- 98.- Calcagno, M. Pérez, J.R. Waldo, M.G. Cabrera, G. Weiss-Steider, B. 1982. Evidence of the existence of a factor that induces Fc receptor on bone marrow cells. Blood 59: 757.
- 99.- Calcagno, M. Ríos, B. Fragoso, A. Arciga, M.A. Torres, R. Weiss-Steider, B. 1983. Evidence of a factor that induces C₃ receptor on bone marrow cells. Blood 61: 403.
- 100.- Padawer, J. 1973. The peritoneal cavity as a site for studying cell-cell and cell-virus interactions. J Reticuloendothel Soc 14: 462.
- 101.- Davis, R.H. McGowan, L. 1968. Comparative peritoneal cellular content as related to species and sex. Anat Rec 162: 357.
- 102.- Cappell, D.F. 1930. Intravital and supravital staining. IV. The cellular reactions following mild irritation of the peritoneum in normal and vitally stained animals, with special reference to the origin and nature of mononuclear cells. J Pathol Bacteriol 33: 429.
- 103.- Mackaness, G.B. 1970. The mechanism of macrophage activation. En: Infectious Agents and Host Reactions. (S. Mudd, ed.) Saunders, Philadelphia. pp 61-75.
- 104.- Stubbs, M. Kuhner, A.V. Glass, E.A. David, J.R. Karnovsky, M.L. 1973. Metabolic and functional studies on activated mouse macrophages. J Exp Med 137: 537.
- 105.- Chin, K.W. Hudson, G. 1974. Ultrastructural chan-

ges in murine peritoneal cells following cyclophosphamide administration. Br J Exp Pathol 55: 554.

- 106.- Guttner, J. Augusten, K. Bimberg, R. Lange, P. 1975. Modification of the surface structure of murine peritoneal macrophages following chemotherapy. Exp Pathol 11: 209.
- 107.- Karnovsky, M.L. Lazdins, J. Drath, D. Harper, A. 1975. Biochemical characteristics of activated macrophages. Ann NY Acad Sci 256: 266.
- 108.- Reikvam, A. Hoiby, E.A. 1975. Phagocytosis and microbicidal capacity of mouse macrophages non-specifically activated in vitro. Acta Pathol Microbiol Scand Sect C 83: 121.
- 109.- Forbes, I.J. 1966. Mitosis in mouse peritoneal macrophages. J Immunol 96: 734.
- 110.- Padawer, J. Gordon, A.S. 1956. Cellular elements in the peritoneal fluid of some mammals. Anat Rec 124: 209
- 111.- Yang, H.I. Skinsness, O.K. 1973. Peritoneal macrophage response in neonatal mice. J Reticuloendothel Soc 14: 181.
- 112.- Lin, H. Kuhn, C. Stewart, C.C. 1978. Peritoneal exudate cells. V. Influence of age, sex, strain and species on the induction and growth of macrophage colony forming cells. J Cell Physiol 96: 133.
- 113.- Carr, I. 1973. The Macrophage. Academic Press, London.

- 114.- Daems, W. T. Peritoneal Macrophages. En: The Reticuloendothelial System. Vol 1. (Carr, I. Daems, W. eds.) Plenum Press, New York. pp 57-127.
- 115.- Williams, M.A. Mayhew, T.M. 1973. Quantitative microscopical studies on the mouse peritoneal macrophage following stimulation in vivo. Z Zellforsch Mikrosk Anat 140: 187.
- 116.- Daems, W.T. Brederoo, P. 1973. Electron microscopical studies on the structure, phagocytic properties and peroxidatic activity of resident and exudate peritoneal macrophages in the guinea pig. Z Zellforsch Mikrosk Anat 144: 247.
- 117.- Conrad, R.E. Yang, L.C. Hercowitz, H.B. 1977. Mononuclear phagocytic cells in peritoneal exudates in rabbits: A comparison of inducing agents. J Reticuloendothel Soc 21: 103.
- 118.- Daems, W.T. Koerten, H.K. 1978. The effect of various stimuli on the cellular composition of peritoneal exudates in the mouse. Cell Tissue Res 190: 47.
- 119.- Felix, M.D. Dalton, A.J. 1956. A phase-contrast microscope study of free cells native to the peritoneal fluid of DBA/2 mice. J Natl Cancer Inst 16: 415.
- 120.- Whaley, K. Singh, H. Webb, J. 1972. Phagocytosis of colloidal carbon by the fixed tissue and peritoneal macrophages of the New Zealand mice. Scot Med J 17: 383.
- 121.- Lin, H. Peritoneal exudate cells, II Kinetics of

appearance of colony-forming cells. J Cell Physiol 84: 159.

- 122.- Stewart, C.C. Lin, A.S. Adles, C. 1975. Proliferation and colony-forming ability of peritoneal exudate cells in liquid culture. J Exp Med 141: 114.
- 123.- Casciato, D.A. Goldberg, L.S. Bluestone, R. 1976. Collection of peritoneal exudate cells from small laboratory animals. Vox Sang 31: 25.
- 124.- Fishel, C.W. Halkias, D.G. Klein, T.W. Szantivanyi, A. Characteristics in cells present in peritoneal fluids of mice injected intraperitoneally with Bordetella pertussis. Infect Immun 13: 263.
- 125.- Beelen, R.H.J. Broekhuis-Fluitsma, D.M. Korn, C. Hoefsmid, E.C.M. 1978. Identification of exudate-resident macrophages on the basis of peroxidatic activity. J Reticuloendothel Soc 23: 103.
- 126.- Lin, H.L. Bianco, C. Cohn, Z.A. 1980. The iodination and turnover of the macrophage plasma membrane polypeptides. En: Mononuclear Phagocytes- Functional Aspects. (R. van Furth, ed.) M. Nijhoff, The Hague. pp 649-664.
- 127.- Monroy, A. 1983. Activación de precursores mieloides para la producción de macrófagos y granulocitos peritoneales y la formación de receptores Fc. Tesis Profesional. ENEP ZARAGOZA. UNAM.
- 128.- Jenkin, C.R. Rowley, D. 1963. Basis for immunity to typhoid in mice and the question of cellular immunity. Bacterial Rev 27: 391.

- 129.- Ohta, H. Shimizu, K. 1975. Maturation and interrelationship of mouse mononuclear phagocytes in bone marrow, peripheral blood and peritoneal cavity in terms of erythrophagocytic activity. Tokohu J Exp Med 116: 111.
- 130.- Raz, A. Shahar, A. Goldman, R. 1977. Characterization of an in vivo induced peritoneal macrophage population following intraperitoneal injection with Concavalin A. J Reticuloendothel Soc 22: 445.
- 131.- Miller, T.E. 1971. Metabolic event involved in the bactericidal activity of normal mouse macrophages. Infec Immun 3: 390.
- 132.- Thomas, M.A. Galbraith, I. MacSween, R.N.M. 1978. Heterogeneity of rat peritoneal and alveolar macrophage populations: Spontaneous rosette formation using sheep and chicken red blood cells. J Reticuloendothel Soc 23: 43.
- 133.- Rasmussen, J.M. 1983. Fractionation of untreated and inflammatory murine peritoneal macrophages on discontinuous Percoll density gradients. Acta Pathol Microbiol Scand Sect C 91: 299.
- 134.- Bianco, C. Griffin, F.M. Silverstein, F.M. 1975. Studies on the macrophage complement receptor alteration of receptor function upon macrophage activation. J Exp Med 141: 1278.
- 135.- Michl, J. Silverstein, S.C. 1978. Role of macrophage receptors in ingestion phase of phagocytosis. En: Molecular Basis of Cell-Cell Interaction. Birth Defects. Original Article Series 14:49.

- 136.- Jungi, T.W. McGregor, D.D. 1978. Impaired chemotactic responsivenesses of macrophages from gnotobiotic rats. Infect Immun 19: 553.
- 137.- Lutton, J.D. Kiremidjian, L. 1973. Electrokinetic studies on normal and thioglycollate stimulated peritoneal macrophages. Exp Cell Res 79: 492.
- 138.- Whitley, S.B. Leu, R.W. 1976. Role of macrophage activation on the expression of MIF receptors by guinea pig peritoneal and alveolar macrophages. J Reticuloendothel Soc 20: 9a.
- 139.- Kondo, E. Kanai, A. 1977. Phospholipid distribution pattern in uninduced (resident) and casein-induced mouse peritoneal cells. Jpn J Med Sci Biol 30: 269.
- 140.- Edelson, P.J. Cohn, Z.A. 1976. 5'-Nucleotidase activity of mouse peritoneal macrophages. I. Synthesis and degradation in resident and inflammatory populations. J Exp Med 144: 1581.
- 141.- Bianco, C. Edelson, P.J. 1978. Plasma membrane expressions of macrophage differentiation. En: The Molecular Basis of Cell-Cell Interaction (R.A. Lerner y D. Bergsma eds.) Alan R. Liss, New York. pp 119-124.
- 142.- Lazdins, J.K. Kunher, L. David, J.R. Karnovski, M.L. 1978. Alteration of some functional and metabolic characteristics of resident mouse peritoneal macrophages by lymphocyte mediators. J Exp Med 148: 746.

- 143.- Humes, J.L. Bonney, R.J. Relus, L. Dahlgren, M.E. Sadowski, S.J. Kuel, F.A. Davies, P. 1977. Macrophages synthesize and release prostaglandins in response to inflammatory stimuli. Nature (London) 269: 149.
- 144.- Unkeless, J.C. Gordon, S. Reich, R. 1974. Secretion of plasminogen activator by stimulated macrophages. J Exp Med 139: 834.
- 145.- Gordon, S. Unkeless, J.C. Cohn, Z.A. 1975. The macrophage as secretory cell. En: Immune Recognition (A.S. Rosenthal ed.) Academic Press, New York. pp 589-614.
- 146.- White, R. Lin, H.S. Kuhn, C. 1977. Elastase secretion by peritoneal exudative and alveolar macrophages. J Exp Med 146: 802.
- 147.- Lepper, A.W.D. D'Arcy Hart, P. 1976. Peroxidase staining in elicited and non-elicited mononuclear peritoneal cells from BCG-sensitized mice. Infec Immun 14: 522.
- 148.- Daems, W.T. Roos, D. Berkel, T.J.C. van.Rhee, H.J. van der. 1979. The subcellular distribution and biochemical properties of peroxidase in monocytes and macrophages. En: Lysosomes in Applied Biology and Therapeutics. Vol 6. (J.T. Dingle, I.H. Shaw y P Jaques eds.) Elsevier North-Holland, Amsterdam. pp 463-514.
- 149.- Cooper, G.W. Houston, B. 1964. Effects of single lipids on the phagocytic properties of peritoneal macrophages. II. Studies on the phagocytic potential of cell populations. Aus J Exp Biol Med Sci 42: 429.

- 150.- Morahan, P.S. Glasgow, L.A. Crane, J.L. Kern, E.R. 1977. Comparison of antiviral and antitumor activity of activated macrophages. Cell Immunol 28: 404.
- 151.- Morahan, P.S. Rozner, M.A. Jese, E.J. 1982. Effect of elicitation of peritoneal macrophage subpopulations: size distributions, ectoenzyme phenotypes and antitumor activity. Int J Cancer 30: 787.
- 152.- Johnson, W.J. Marino, P.A. Schreiber, R.D. Adams, D.O. 1983. Sequential activation of murine mononuclear phagocytes for tumor cytotoxicity: Differential expression of markers by macrophages in the several stages of development. J Immunol 131: 1038.
- 153.- Furth, R. van. 1981. Current view of the mononuclear phagocyte system. En: Disorders of the monocyte-macrophage system. (F. Schmalz, D. Huhn, H.E. Schaefer eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. pp 3-10.
- 154.- Bakker, J.M. Wit, A.W. Daems, W.T. 1981. The relation between monocytes and resident (tissue) macrophages. En: Disorders of the monocyte-macrophage system. (Schmalz, Huhn, Schaefer eds.) Springer Verlag Berlin Heidelberg, New York. pp 89-100.
- 155.- Bursucker, I. Goldman, R. On the origin of macrophage heterogeneity. A hypothesis. J Reticuloendothel Soc 33: 207.

156.- Marín, T. 1984. Masa molecular de la molécula -
inductora de macrófagos y granulocitos -
(MGI) secretada por las células de cavidad
peritoneal e identificación del tipo ce -
lular que lo produce. Fac. de Ciencias. -
UNAM México.

A P E N D I C E S

APENDICE 1

MEDIO MINIMO ESENCIAL DE EAGLE

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

<u>AMINOACIDOS</u>	mg/l
L- Arginina	84.0
L- Cistina	62.57
L-Glutamina	584.0
Glicina	30.0
L-Histidina HCl.H ₂ O	42.0
L-Isoleucina	105.0
L-Leucina	105.0
L-Lisina.HCl	146.0
L-Metionina	30.0
L-Fenilalanina	66.0
L-Serina	42.0
L-Treonina	95.0
L-Trintofano	16.0
L-Tirosina (Sal Disódica)	104.2
L-Valina	94.0

<u>VITAMINAS</u>	mg/l
------------------	------

D-Ca Pantotenato	4.0
------------------	-----

Cloruro de colina	4.0
Acido Fólico	4.0
Inositol	7.2
Nicotinamida	4.0
Piridoxal.HCl	4.0
Riboflavina	0.4
Tiamina	4.0

SALES INORGANICAS mg/1

Cloruro de calcio anhidro	200.0
Nitrato de Fierro III nonahidratado	0.1
Cloruro de Potasio	400.0
Sulfato de Magnesio Anhidro	97.67
Cloruro de Sodio	6400.0
Fosfato monosódico monohidratado	125.0

OTROS COMPUESTOS mg/1

L-Glucosa	4500.0
Rojo Fenol	15.0

En 950 ml de agua destilada, se diluyó el medio en polvo agitando ligeramente, se adicionaron 3.7 g/l de bicarbonato de sodio, además los antibióticos Penicilina G 100 U/ml y Estreptomocina 100 µl/ml. Posteriormente se aforó a un volumen de 1000 ml y se agitó hasta disolver, sin sobrealgitar. El medio fue ajustado a un pH de 6.9 y después se filtró con filtros Millipore (Millipore, USA.) con un tamaño de poro de 22 micras. Finalmente el medio se almacenó 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 períodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes fueron diluidos en un volumen final de 1000 ml de agua bidestilada.

Cloruro de Magnesio	0.1 g
Cloruro de Calcio	0.1 g
Cloruro de Sodio	8.0 g
Cloruro de Potasio	0.2 g
Fosfato monoácido de Sodio	2.16 g
Fosfato diácido de Potasio	0.2 g

El cloruro de magnesio y el de calcio fueron disueltos en 100 ml de agua bidestilada. Las restantes sales, por separado, se diluyen en 800 ml de agua bidestilada y después se adicionan los 100 ml que se prepararon inicialmente. En seguida se aforó a un volumen final de 1000 ml y esta solución se ajustó a un pH de 7.2 a 7.4; se procedió a esterilizar la solución utilizándose filtros de membrana (Millipore, USA.) con un diámetro de poro de 22 micras. Finalmente la solución se almacenó a una temperatura de 4°C hasta el momento de su uso.

APENDICE 3

SOLUCION DE ALSEVER

Esta solución permite mantener a los eritrocitos de carnero en condiciones estables por largo tiempo, aproximadamente 30 días, a una temperatura de 4°C. La fórmula dada abajo es una modificación de la fórmula original de Alsever.

Dextrosa	20.5 g
Citrato de Sodio dihidratado	8.0 g
Acido Cítrico monohidratado	0.55 g
Cloruro de Sodio	4.2 g
Agua destilada	1 litro

En 900 ml de agua destilada se disolvieron sucesivamente cada una de las sustancias, posteriormente se aforó a un volumen de 1000 ml. La solución se ajustó a un pH de 6.1 y se esterilizó en autoclave. Finalmente se guardó a una temperatura de 4°C hasta su uso. Esta solución se utilizó para colocar los eritrocitos de carnero en una proporción de 1:1.