



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACION DE LA MASA MOLECULAR DE LA MOLECULA
INDUCTORA A LA DIFERENCIACION DE MACROFAGOS Y GRA-
NULOCITOS (MGI) PRODUCIDO IN VITRO POR LAS CELULAS
ADHERENTES DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATON
E IDENTIFICACION DEL TIPO CELULAR QUE LA PRODUCE.

T E S I S

Que para obtener el Titulo de

B I O L O G O

P r e s e n t a

TERESITA DEL NIÑO JESUS MARIN HERNANDEZ



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.

R E S U M E N

Es innegable la importancia que tienen los macrófagos y los granulocitos en la defensa del organismo contra cuerpos extraños. Una de las moléculas más estudiadas encargadas de inducir a la formación de estas células, es el inductor de macrófagos y granulocitos (MGI), el cual induce a la proliferación y diferenciación de precursores mieloides hacia células morfológicamente maduras. Muchos intentos se han realizado hoy en día, para determinar la masa molecular de este MGI, utilizando para ello diferentes medios condicionados tanto por tejidos, órganos, extractos tisulares, diversos fluídos corporales y células. Dentro de esta gran gama de factores reguladores ha despertado gran interés el producido por los fagocitos, ya que obviamente representarían un fenómeno de autoinducción.

Un sistema útil para el estudio y obtención de fagocitos mononucleados lo representa la cavidad peritoneal en donde en forma fácil y poco traumática se pueden obtener un buen número de estas células, pudiéndose aumentar considerablemente dicha población celular mediante una reacción inflamatoria. Sin embargo, existe una gran heterogeneidad en el tipo de células de dicha cavidad, en consecuencia el MGI encontrado en los medios condicionados por estas, puede provenir de cualquiera de los tipos celulares que la componen por lo que no se puede asegurar cual es el causante de dicha secreción. Se ha postulado que los macrófagos son los productores de este MGI, debido a que representa la gran mayoría de las celulas de la cavidad peritoneal. Sin embargo no existe a la fecha ningún estudio que identifique al macrófago como pro

ductor del inductor a la formación de colonias. Existe una controversia respecto al origen de los macrófagos de la cavidad peritoneal, por un lado la mayoría de los investigadores consideran que estas células, provienen del monocito formado en la médula ósea. osea son células inducidas al lugar de acción; por otro, se han aportado evidencias de la existencia de un precursor local que da origen a los llamados macrófagos residentes.

Con la finalidad de contribuir al estudio del origen de los fagocitos tanto inducidos como residentes de la cavidad peritoneal y para detectar la posible producción del MGI por estas células, se obtuvieron y analizaron medios condicionados por ambos tipos celulares.

Los resultados aquí presentados indican que las células inducidas a la cavidad peritoneal fueron las únicas capaces de producir MGI, para el cual se encontraron dos masas moleculares diferentes, una muy activa de 70 000 daltones y otra poco activa de 44 000 daltones. Debido a que las técnicas bioquímicas involucraban diluciones del medio condicionado se diseñó un bioensayo de preactivación para aumentar la sensibilidad del ensayo en bicapa en agar normalmente utilizado.

Por último en este trabajo se discute tanto el posible origen macrofágico del MGI de 45 000 daltones y fibroblástico de 70 000 daltones como, la posibilidad de una purificación bioquímica que facilite el estudio de los procesos de diferenciación celular, así como de su utilización para fines terapéuticos y de diagnóstico.

INTRODUCCION

PRECURSORES HEMATOPOYETICOS

En la mayoría de los tejidos de los mamíferos las células que los conforman se encuentran diferenciadas y por lo tanto muestran poca evidencia de proliferación y autorrenovación. No obstante un pequeño grupo de células tanto de la mucosa gastrointestinal, de la piel y del tejido hematopoyético, tienen la capacidad de proliferar y diferenciarse continuamente hacia células maduras (1).

La existencia, en el tejido hematopoyético, de una célula totipotencial, fue establecida en los inicios de los años cincuenta mediante estudios en ratones letalmente irradiados (2-5). Estudios posteriores (6), aportaron fuertes evidencias de la existencia de células hematopoyéticas precursoras, al experimentar con ratones irradiados, los cuales morían por pancitopenia. La muerte de estos animales se podía evitar mediante la administración de una suspensión celular proveniente de animales sanos. Los animales así tratados sobrevivían mostrando en su bazo nódulos que representaban pequeñas colonias de células precursoras de eritrocitos, granulocitos, megacareocitos y células indiferenciadas a este tipo de células se les llamó "unidades formadoras de colonias del bazo" (colony-forming unit-spleen) (CFU-S). Sin embargo, la relación de los linfocitos con las CFU-S no ha quedado del todo claro, ya que los progenitores linfoides no se encuentran en las colonias del bazo, lo que su

giere la existencia de una célula precursora común más primitiva, llamada "precursora común de la unidad formadora de colonias linfoides y mieloides" (lymphoid-myeloid colony-forming) (CFU-L-M) (7-9). También se postula, que la CFU-L-M da origen tanto a los precursores linfoides como a las CFU-S (1), que a su vez generan a células más diferenciadas llamadas comprometidas, las cuales son; "unidad formadora de eritrocitos" (burst-forming unit-erythroid) (BFU-E) (1, 31,32), "unidad formadora de megacariocitos" (colony-forming unit-megacariocitos) (CFU-M) y "unidad formadora de colonias en cultivo" (colony-forming unit in culture) (CFU-C) (1), las cuales dan origen a los eritrocitos, megacariocitos y granulocitos macrófagos respectivamente.

La mayoría de las CFU-S, se encuentran localizadas en la médula ósea y muy pocas (alrededor de 50 veces menos) en el bazo (6,8,10,11). No obstante, en ocasiones las CFU-S pueden ser localizadas en la sangre periférica y muy raramente en otros tejidos, en estos últimos es muy probable que se deba a la contaminación por la sangre periférica (11,12).

FUENTES INDUCTORAS A LA DIFERENCIACION CELULAR

Existen evidencias de que algunas sustancias humorales e influencias microambientales celulares locales, regulan la diferenciación y proliferación de células precursoras hematopoyéticas que se encuentran en la médula ósea (13-16). Entre estas sustancias humorales se encuentran: la eritropoyetina la cual induce a la proliferación y diferenciación de los eritrocitos mediante una rápida síntesis de RNA (17), la trombopoyetina, que estimula la producción de megacariocitos (19, 20), y el inductor de macrófagos y granulocitos (MGI) (21,22) también llamado "factor estimulador de colonias" (colony sti

mulating factor) (CSF) (23-25) o "estimulador activador de colonias" (colony stimulating activity) (CSA) (26-28). Esta sustancia humoral es indispensable en los cultivos in vitro para inducir a la proliferación y diferenciación de las CFU-C hacia colonias de granulocitos y macrófagos maduros, ya que si no se encuentra presente en el medio de cultivo no hay producción de colonias (29,30). Por otro lado, esta inducción puede permanecer durante todo el tiempo de cultivo o hasta un determinado momento, en el cual se agote o sea retirado el medio inductor (33,34).

Existen varias fuentes de obtención del MGI, algunas de ellas se enlistan en la tabla 1. Cabe hacer notar que entre las células más utilizadas para la producción de MGI in vitro se encuentran los macrófagos y los fibroblastos. Por otra parte el medio condicionado por los fibroblastos en cultivo ha sido frecuentemente utilizado hasta la fecha para el estudio de las propiedades moleculares de éste MGI, así como su posible función fisiológica. Se ha llegado al grado de obtener anticuerpos contra un MGI previamente purificado para facilitar la purificación en gran escala de este factor (56).

Sin embargo, sea cual fuere la fuente de obtención del MGI éste se encuentra en muy pequeñas cantidades, por lo que para aumentarlas se ha recurrido a la activación de las células mediante el uso de sustancias tales como los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram-negativas (57), el glucan, zymosan, Mycobacterium Basillus Calmette-Guerin, tuberculina y myristate phorbol, entre otros (46). Por otra parte se han descubierto otras sustancias no intrínsecas al grupo de los MGI que ayudan a aumentar el tamaño de las colonias al actuar junto con el MGI, como son; los antígenos (58), eritrocitos lisados (59) y algunos componentes del suero con masa molecular muy pequeña (60).

TABLA 1.- Diferentes fuentes de obtención del MGI.

Lineas celulares	Medios fisiológicos	Tejidos
Lineas macrofágica WR19W con mm de 45 000 d (64).	Sangre periférica (45). Suero normal (65).	Corazón (41). Hígado regenerando (49).
Macrófagos (42,47,48).	Orina humana con mm de 85 000 d (35,50).	Pulmón con mm de 41 000, 35 000, 79 000 d (36,38).
Fibroblastos, con mm de 65 000 a 70 000 d (55,56).		Utero con mm de 45 000 d (39,40).
Linfocitos T (43,51).		Timo (44).
Linea PV5-1.8 (46).		
Linea 1GCT con mm de 30 000 a 40 000 d (53).		
Linea sarcoma Yoshida con mm de 22 000 a 25 000 d (52).		

mm ; masa molecular
d ; daltones

TABLA 1.- Diferentes fuentes de obtención del MGI.

Lineas celulares	Medios fisiológicos	Tejidos
Lineas macrofágica WR19W con mm de 45 000 d (64).	Sangre periférica (45).	Corazón (41).
Macrófagos (42,47,48).	Suero normal (65).	Hígado regenerando (49).
Fibroblastos, con mm de 65 000 a 70 000 d (55,56).	Orina humana con mm de 85 000 d (35,50).	Pulmón con mm de 41 000, 35 000, 79 000 d (36,38).
Linfocitos T (43,51).		Utero con mm de 45 000 d (39,40).
Linea PV5-1.8 (46).		Timo (44).
Linea LGCT con mm de 30 000 a 40 000 d (53).		
Linea sarcoma Yoshida con mm de 22 000 a 25 000 d (52).		

mm ; masa molecular
d ; daltones

Estudios de naturaleza bioquímica realizados con el MGI, han mostrado que es una glucoproteína, termolabil, resistente a la acción del éter, a la desoxirribonucleasa y ribonucleasa, está constituida por moléculas no dializables, y en la electroforesis migra junto con la fracción de la gama globulina inmediatamente después de la albumina (61,62). Ahora bien las masas moleculares encontradas para el MGI varían en un rango de 5 000 (63) a 150 000 (85) daltones, parte de esta gama se enlista en la tabla 1. Esta discrepancia de resultados en torno a las masas moleculares, parece depender en parte de la fuente de obtención así como del bioensayo utilizado. Alternativamente es posible que los diferentes MGI tengan también diferentes propiedades biológicas, ya que se han hecho estudios al respecto, encontrando por ejemplo que la sangre periférica de fetos de ratón producen un MGI que favorece la producción de macrófagos en un 90 % más que los granulocitos (45) cosa que no ocurre en los otros MGI, otro ejemplo sería la de una línea leucémica tumoral monocítica PU5-1.8 (46), que produce un MGI el cual induce a la formación de colonias en 2 ó 3 días, mientras que la mayoría de los MGI las producen en 6 ó 7 días.

MACROFAGOS DE LA CAVIDAD PERITONEAL

Los macrófagos son un grupo de células muy importante en la producción del MGI, lo cual representa un fenómeno de autoinducción en el organismo. La cavidad peritoneal es considerada generalmente como un sitio conveniente para el estudio de estos fagocitos bajo condiciones normales y patológicas, porque; contiene una población celular caracterizable y finita en términos de los tipos celulares, el total de la población celular es relativamente manejable, la distribución celular es homogénea por lo que las alicuotas son representativas de la población, el número es fácilmente cuantificable

por métodos hematológicos rutinarios (66). El lavado de la cavidad peritoneal normal, provee de una suspensión celular que contiene macrófagos, linfocitos, eosinófilos y células cebadas se ha encontrado que el número y la relativa proporción de estas células varía de acuerdo a la especie, edad del animal (67,68) y a las variaciones de interpretación típicas del observador (69) (tabla 2). Este número de células puede ser incrementado mediante la administración intraperitoneal de agentes inflamatorios o irritantes tales como el caseinato de sodio (70), el glicógeno, el tioglicolato y los aceites minerales (71,72). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la inyección intraperitoneal de cualquiera de estas sustancias, trae como consecuencia la alteración del estado normal del animal experimental, provocando con ello no solo un aumento en el número de sus células sino también la migración y acumulación intraperitoneal de estas células provenientes de la sangre periférica. Entre estas células se encuentran los monocitos los que se diferenciarán a macrófagos maduros, los cuales difieren tanto morfológica como funcionalmente a los macrófagos que normalmente residen en la cavidad peritoneal (73). Cuando se administra caseinato de sodio en la cavidad peritoneal de ratón, se encuentra que entre una y dos horas después, los granulocitos comienzan a llegar a ésta, seguidos con el tiempo de arribo de un número cada vez mayor de monocitos, los cuales llegan a su máximo hasta las 16 horas y comienzan a declinar su migración a las 24 horas (70). El tiempo que tarda para el restablecimiento de la normalidad de la cavidad peritoneal, depende de la naturaleza de estímulo así como de la cepa con la que se esté trabajando (74). De esta manera, encontramos que después de la estimulación con solución salina la normalidad se recupera 4 días más tarde, en cambio si la irritación es con gránulos de melanina, la recuperación tarda 50 días (72-75).

Se ha postulado (66), que los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal forman una población autorreplicable y que el pequeño porcentaje de células con las características morfológicas y citoquímicas de monocitos presentes en dicha cavidad sin estimular, pueden ser considerados como células que se encuentran de paso y no como precursores de los macrófagos residentes. Sin embargo pocas veces se hace diferencia entre los macrófagos residentes y los inducidos provenientes del monocito.

Hacia principios del siglo, se encontró que existen diferencias entre los "clasmátocitos" (análogos a los macrófagos residentes) y los monocitos de la cavidad peritoneal (76). Posteriormente en 1930 (86), se postuló que los histiocitos secundarios los cuales derivan del monocito sanguíneo durante una inflamación, son distinguibles de los histiocitos primarios los cuales son originados en el tejido local. Algunos estudios muestran que en la electroforésis celular, los macrófagos residentes tienen un comportamiento totalmente diferente al de los inducidos a la cavidad peritoneal, lo que indica diferencias en la carga superficial de ambos tipos (77). Asimismo, se ha demostrado que los macrófagos inducidos, son más sensibles a los factores inhibidores de la migración (78). También se han encontrado diferencias marcadas en ambos tipos celulares en cuanto a la producción y liberación de diferentes enzimas (79,80). Un estudio realizado en cuanto a la distribución de la peroxidasa muestra diferencias características en los dos tipos de macrófagos; por un lado los macrófagos inducidos presentan la peroxidasa en gránulos mientras que en los residentes se encuentra en el retículo endoplásmico rugoso y rodeando a la envoltura nuclear (81,82). Recientemente en 1981 (83), se encontraron evidencias acerca de un origen diferente para los macrófagos residentes, mediante el uso de marcadores con Imferon (hierro dextrano) y se propone que el

precursor de estos macrófagos se localiza en los puntos lechosos y que por mitosis da origen a macrófagos inmaduros llamados proresidentes, los cuales poseen un patrón de peroxidasa similar al de los macrófagos maduros. Estudios que apoyan esta teoría fueron realizados con la cavidad peritoneal in vitro en los cuales muestran la formación de estos histiocitos (84).

Siendo que una propiedad de los macrófagos maduros de la cavidad peritoneal es la producción del inductor MGI y que se ha demostrado que la población fagocítica de dicha cavidad está compuesta tanto por macrófagos residentes como por inducidos; en este trabajo se cultivaron por separado estos dos tipos celulares, para determinar cual de ellos era capaz de producir este inductor así como la evaluación de sus masas moleculares.

Si tomamos en consideración que existe una controversia acerca de si los macrófagos residentes y los inducidos provienen de un precursor común, nosotros esperamos que las diferencias o similitudes encontradas en la producción del MGI por estos dos tipos celulares, puedan contribuir al esclarecimiento del origen de ellos.

MATERIALES Y METODOS

Animales.- Se emplearon ratones de la cepa CD-1 de ambos sexos y de 6 a 8 semanas de nacidos para la obtención de células de médula ósea y cavidad peritoneal. Los animales fueron sacrificados mediante dislocación céfalo-medular.

Cultivo celular.- Como fuente de nutrición se usó el medio mínimo esencial de Eagle (EM) (Gibco Labs. USA) (Apéndice 1), al que se le adicionaron antibióticos (penicilina 100 UI/ml, estreptomycin 100 mcg/ml) y 3.7 g/l de bicarbonato de sodio para obtener un pH de 7.2; posteriormente fue suplementado con suero fetal de bovino al 10% (Gibco Labs. USA) el cual fue previamente desactivado a 56°C durante 30 min.

Para los cultivos en medios semisólidos se utilizó EM a doble concentración y agar (Bacto Agar Difco Labs. USA). Las células fueron sembradas a las concentraciones requeridas para cada experimento en cajas de Petri de cultivo de 60x15 mm (Tissue Culture Ware, Lux Scientific Co. USA) a las cuales se les adicionaron 5 ml de medio de cultivo. La cantidad de células se determinó por conteo en un hemocitómetro (American Optical USA). Los cultivos se mantuvieron in vitro en una incubadora a 37°C con una atmósfera parcial de CO₂ al 10 % y humedad a punto de rocío. Para la observación del desarrollo celular se utilizó el microscopio invertido.

Técnica para la obtención de células de médula ósea.- Se sacrificaron ratones para proceder a retirar los huesos, colocándolos inmediatamente en cajas de Petri que contenían solución amortiguadora de fosfatos (SAF, Apéndice 2). Se perforaron ambas epífisis con una jeringa haciendo fluir medio de Eagle de un extremo a otro del hueso, las células así obtenidas se lavaron mediante centrifugación a 500 g durante 3 min. La cantidad de células obtenidas se determinó por conteo en un hemocitómetro, sembrándose 10⁵ células en el medio de cultivo.

Preparación de medios condicionados por células peritoneales adherentes al sustrato de cultivo.- Para la preparación del medio condicionado (MC) por células residentes peritoneales (CRP), se sacrificaron ratones para proceder a extraer las CRP 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 fin de recuperar la mayor cantidad de células. Las células así obtenidas de varios animales fueron mezcladas para proceder a lavarlas mediante centrifugación a 500 g durante 3 min. Posteriormente las células fueron sembradas a las concentraciones requeridas para cada experimento e incubadas durante dos horas con la finalidad de que las células se adhirieran al sustrato de cultivo. Transcurrido este tiempo las células no adheridas y el medio de cultivo fueron retirados y nuevo medio fue agregado para la preparación de los medios condicionados los cuales se incubaron tanto en ausencia como en presencia de 7.5 mcg de lipopolisacáridos de Salmonella typhimurium (Sigma, Chemical USA) disuelto en 0.3 ml de SAF. Los medios condicionados así preparados fueron centrifugados a 500 g por 5 min para eliminar las células en suspensión y almacenados a -20°C hasta su uso.

Para la obtención de MC por células inducidas peritoneales (CIP), se inocularon ratones por vía intraperitoneal con 3 ml de una solución de caseinato de sodio al 10 % en SAF, dejándose actuar este irritante por un periodo de 4 días, después de los cuales se sacrificaron los animales para proceder a obtener y cultivar las células tal y como se describió para las CRP.

Técnica de formación de colonias en bicapa de agar.- La evaluación del contenido de inductor de macrófagos y granulocitos (MGI) en los diferentes medios condicionados fue con base en 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 0.6 %, medio de Eagle a doble concentración 20 %, suero fetal de bovino 20 % y el 40 % restante formado por el MC a ensayar y medio de Eagle. Se espera 20 min. a temperatura ambiente y posteriormente se coloca una capa superior conteniendo 20 % de agar al 0.4 %, 20 % de medio de Eagle a doble concentración, 10 % de suero fetal de bovino y 50 % de medio de Eagle con 10^5 células de médula ósea; en este caso al igual que con la primera capa se espera 20 min. a temperatura ambiente para proceder a la incubación. El agar se diluyó con agua bidestilada para que al ser mezclado con el medio de Eagle no se altere 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.

Cromatografía en gel ACA 54.- Para la determinación de la masa molecular del mGI se utilizó una columna K26-100 (Pharmacia Fine Chemical, Suecia) conteniendo ultrogel ACA-54 (LKB Producter AB, Bromma Suecia) para separación de moléculas entre 5 000 y 70 000 daltones. Se hizo una calibración con proteínas de masa molecular conocida, (insulina de cerdo 3 900, citocromo c de caballo 11 700, mioglobulina de caballo 17 200, B-lactoglobulina 35 000, ovoalbúmina 43 000, hemoglobina humana 64 000, albumina del suero de bovino 68 000 daltones y azul dextrano como indicador del volumen de exclusión. Se tomó una muestra de 2 ml de MC-CIP concentrado y se eluyó con Tris 50 milimolar con cloruro de sodio 0.15 molar a un pH de 7.7 y a un flujo de 4 cm/hora.

Técnica de tripsinización.- Esta técnica fue utilizada para poder separar las células adherentes de la caja de cultivo. La tripsina se utilizó en combinación con el ácido etilén diamín tetracético de sodio (EDTA), como agente dispersante. El procedimiento de esta técnica fue el siguiente:

- a) Se desecha la solución nutritiva y se agregan 5 ml de verseno (junto con el EDTA) (Apéndice 3) bombeando continuamente para quitar los residuos de la solución nutritiva.
- b) Se desecha el verseno y se agregan 2.5 ml de una solución de tripsina al 0.25 % en verseno, se incuban las cajas con esta solución a 37 °C durante 3 min. Pasado este tiempo, se agrega la solución de tripsina, en forma suave sobre el fondo de la caja, con el objeto de separar las células.
- c) La solución de tripsina, conteniendo las células en suspensión se coloca en un tubo de centrifuga a 700 g por 3 min.
- d) Después de centrifugar, se desecha el sobrenadante y el paquete celular se resuspende en 2 ml de medio de cultivo. Las células son contadas en un hemocitómetro y se siembran en las concentraciones requeridas para cada experimento.

Técnica de lavado molecular.- Para la concentración del MC-CIP-LPS se utilizó la técnica de lavado molecular, la cual consiste en separar a las proteínas globulares en disolución de los solutos de baja masa molecular. Para ello se utilizó un filtro cilíndrico Millipore con corte aproximado de 10 000 daltones (Millipore Co. USA), el cual estuvo conectado por medio de una bomba peristáltica a un tubo de recolección mediante mangueras. Posteriormente se intrdujo el filtro en un tubo que contenía 20 ml de MC-CIP-LPS, ocasionando con ello que las moléculas de baja masa molecular fueran filtradas hacia el tubo recolector, la separación molecular fue parada cuando en el tubo que contenía el MC-CIP-LPS quedaban solamente 2 ml.

Confiabilidad de los resultados.- Todos los experimentos realizados en este trabajo, fueron repetidos un mínimo de dos veces y siempre por duplicado.

Para todo experimento se incluyó un bioensayo sin medio activador como control negativo.

RESULTADOS

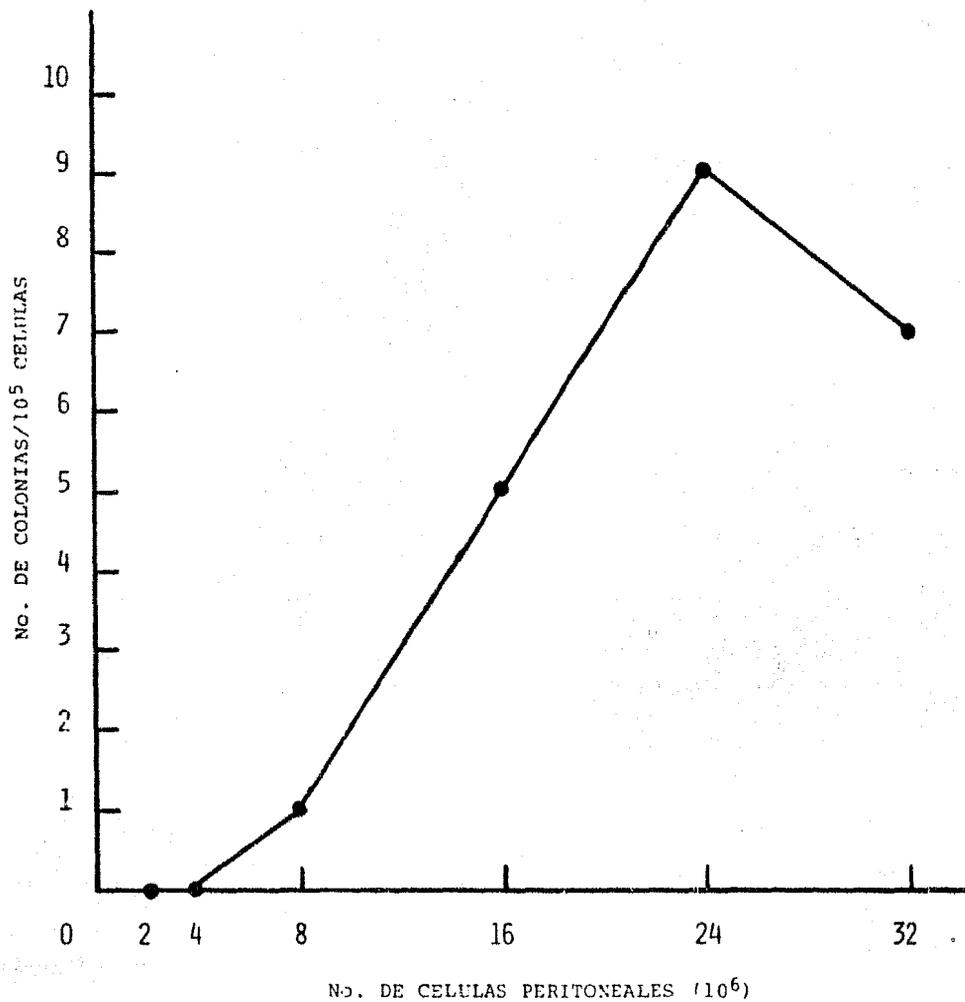
La cantidad del inductor de macrófagos y granulocitos (MGI), presente en los medios condicionados, se evaluó con base en la producción de colonias en agar a partir de precursores de médula ósea.

Producción del MGI por las células inducidas en cavidad peritoneal (CIP).

Tomando en consideración que las CIP pueden ser mantenidas in vitro durante largos periodos de tiempo y que los lipopolisacáridos amplifican una gran gama de actividades biológicas, se produjeron MC por 15×10^6 CIP incubadas durante 4 u 16 días en presencia de 50 mcg/ml de lipopolisacáridos de Salmonella typhimurium (LPS), con el objeto de determinar si los MC-CIP-LPS producidos contenían MGI. Se encontró que al utilizar 1.0 ml de MC-CIP-LPS sólo el MC de 16 días indujo a la formación de colonias, lo cual indicó que las CIP eran capaces de secretar este inductor, pero que se necesitaban más de 4 días de incubación para que en nuestros bioensayos fuera detectable.

Producción de MGI en función del número de CIP.

Para determinar la variación de la producción del MGI en función del número de CIP, se produjeron MC-CIP-LPS condicionados por; 2, 4, 8, 16, 24 y 32×10^6 células durante 16 días de incubación. Se encontró que los MC-CIP-LPS por 2 y 4×10^6 células no contenían suficiente MGI para inducir a la formación de colonias, a partir del MC de 8×10^6 CIP se observó la inducción de una colonia (por 10^5 células sembradas) siguiendo un aumento lineal hasta el MC de 24×10^6 que produjo 9 colonias declinando posteriormente al utilizar MC de 32×10^6 CIP (gráfica 1).



Gráfica 1.- Inducción a la formación de colonias por medios condicionados por diferentes concentraciones de células inducidas a la cavidad peritoneal.

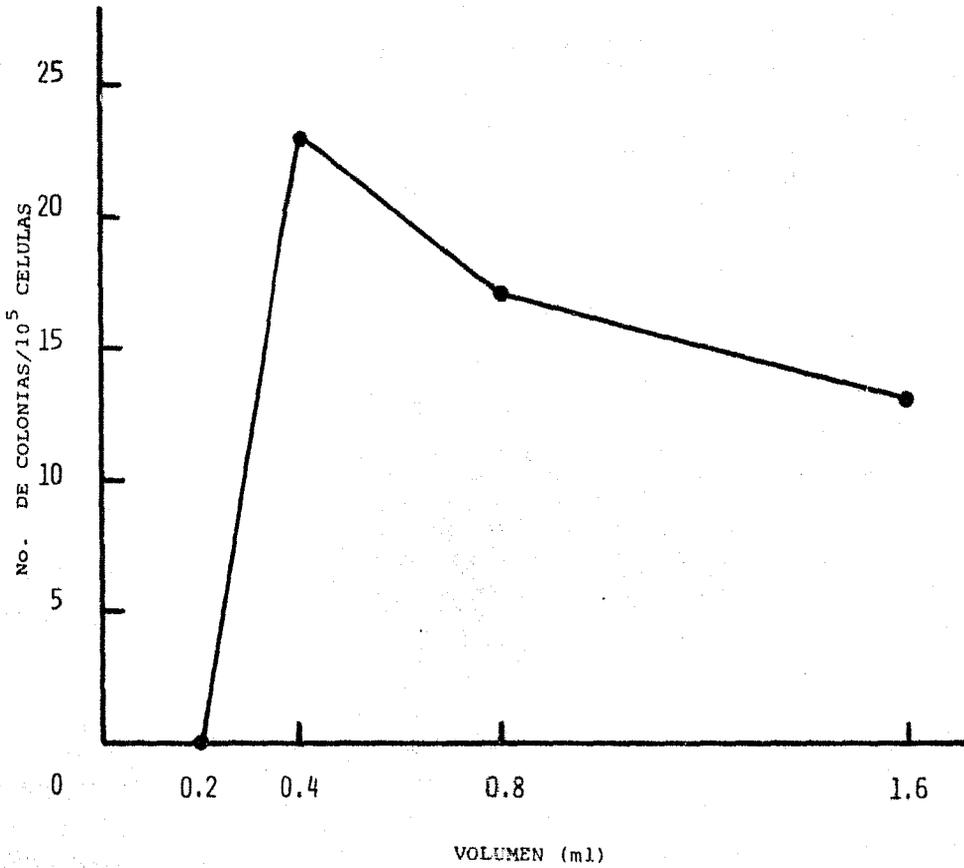
Determinación de la dosis respuesta del MGI contenido en el MC-CIP-LPS.

Una vez determinado que 24×10^6 CIP con 16 días de incubación produjeron la mayor cantidad de MGI en nuestras condiciones de cultivo, se procedió a evaluar la variación de esta producción en función de la concentración del MC. Para ello se utilizaron 0.2, 0.4, 0.8 y 1.6 ml, encontrándose que con 0.2 ml no hubo inducción de macrófagos y granulocitos mientras que con 0.4 ml se observó una máxima actividad inductora (13 colonias/ 10^5 células) posteriormente decayó esta actividad al utilizar 0.8 y 1.6 ml (17 y 13 colonias/ 10^5 células) (gráfica 2).

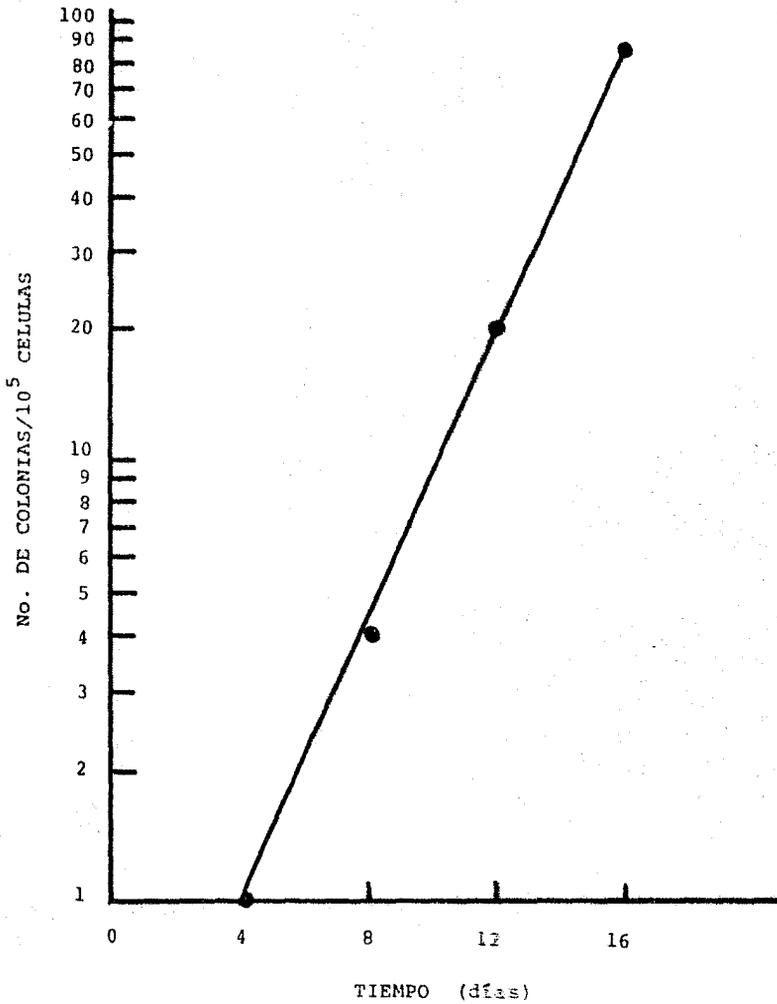
Debido a que en este ensayo el medio nutritivo está en exceso y que el número de células de médula ósea sembradas es pequeño, no se puede pensar en un fenómeno de falta de nutrientes o de saturación celular.

Producción de MGI por las CIP en función del tiempo de cultivo tanto en ausencia como en presencia de LPS y la falta de inducción de este factor por las células residentes de la cavidad peritoneal de ratón (CRP).

Con la finalidad de determinar la cinética de aparición del MGI en los MC por las CIP tanto en presencia (MC-CIP-LPS) como en ausencia de LPS (MC-CIP); se produjeron y ensayaron 0.4 ml de los MC por estas células a los 4, 8, 12 y 16 días de incubación. El incremento detectado en la inducción a la formación de colonias resultó ser exponencial en función del tiempo de incubación de las CIP con un tiempo de doblaje de 48 horas (gráfica 3, tabla 1). Sin embargo los MC-CIP-LPS indujeron un 70 % más de colonias que los MC-CIP. Tomando en consideración que las CIP producen MGI y que las CRP forman parte de las CIP se procedió a obtener MC de las CRP con el objeto de establecer si estas células producían el factor inductor o si esta producción era exclusiva de las CIP



Gráfica 2.- Dosis-respuesta del MGI en el medio condicionado por 24×10^6 células inducidas a la cavidad peritoneal.



Gráfica 3.- Cinética de aparición de MGI en el medio condicionado por 24×10^6 células inducidas a la cavidad peritoneal.

TABLA 1.- Formación de colonias por células de médula ósea en bicapa de agar en presencia de diferentes medios condicionados por las células adherentes de la cavidad peritoneal de ratón.

Días de incubación de los MC	MC-CRP						MC-CIP					
	L P S						L P S					
	+			-			+			-		
	<u>Experimento</u>			<u>Experimento</u>			<u>Experimento</u>			<u>Experimento</u>		
	1	3	2	1	3	2	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
12	0	0	0	0	0	0	14	28	45	4	11	20
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 5 ml de los diferentes medios condicionados. Para la formación de colonias, las células se mantuvieron 6 días en cultivo. En todos los casos el control fue de 0 colonias. * agrupaciones de menos de 10 células; MC medio condicionado; CRP células residentes de la cavidad peritoneal; CIP células inducidas de la cavidad peritoneal.

peritoneal. Siendo que desde el octavo día de incubación de las CIP fue detectable el MGI y que la máxima producción fue a los 16 días, se produjeron y ensayaron MC-CRP y MC-CRP-LPS con 8 y 16 días de incubación, no encontrándose actividad inductora en ninguno de ellos. (tabla 1).

Determinación de la masa molecular del MGI.

Debido a que; la columna fue diseñada para hacer cromatografía con un volumen ideal de 2 ml de MC, que la dilución inherente a esta columna se esperaba que fuese de 3 a 4 veces y que según nuestros resultados de dosis respuesta se necesitaba un volumen mínimo de 0.4 ml de MC-CIP para poder detectar el MGI, se consideró la necesidad de concentrar el MC-CIP-LPS de 16 días de incubación. Para ello se concentró el MC utilizado, 10 veces mediante la técnica de lavado molecular. Se eluyeron 2 ml de MC-CIP-LPS concentrado. Al ensayar 1.0 ml de cada una de las fracciones obtenidas, no se observó inducción alguna. En consecuencia consideramos que la actividad de esta molécula pudo haber sido alterada por la técnica bioquímica empleada. Con el propósito de determinar esta posibilidad se ideó una técnica de preactivación en medio líquido. Esta técnica se basa en el hecho de que las células proliferan más rápidamente en medios líquidos que en sólidos y en consecuencia se procedió a preincubar durante 24 horas células de médula ósea en presencia de 0.4 ml de MC-CIP-LPS, utilizando células de médula ósea recién extraídas del ratón y células de médula ósea preincubadas y lavadas. Se encontró que en las recién extraídas se obtuvieron 68 colonias / 10^5 células y en las preincubadas 175 colonias / 10^5 células. Por lo que se decidió hacer esta técnica de preactivación para cada una de las fracciones recolectadas de la columna cromatográfica. Detectando mediante este ensayo un pico de actividad máxima de MGI con 12 colonias en el volumen de elución de 187 ml. Debido a que en este caso la actividad fue muy pequeña se

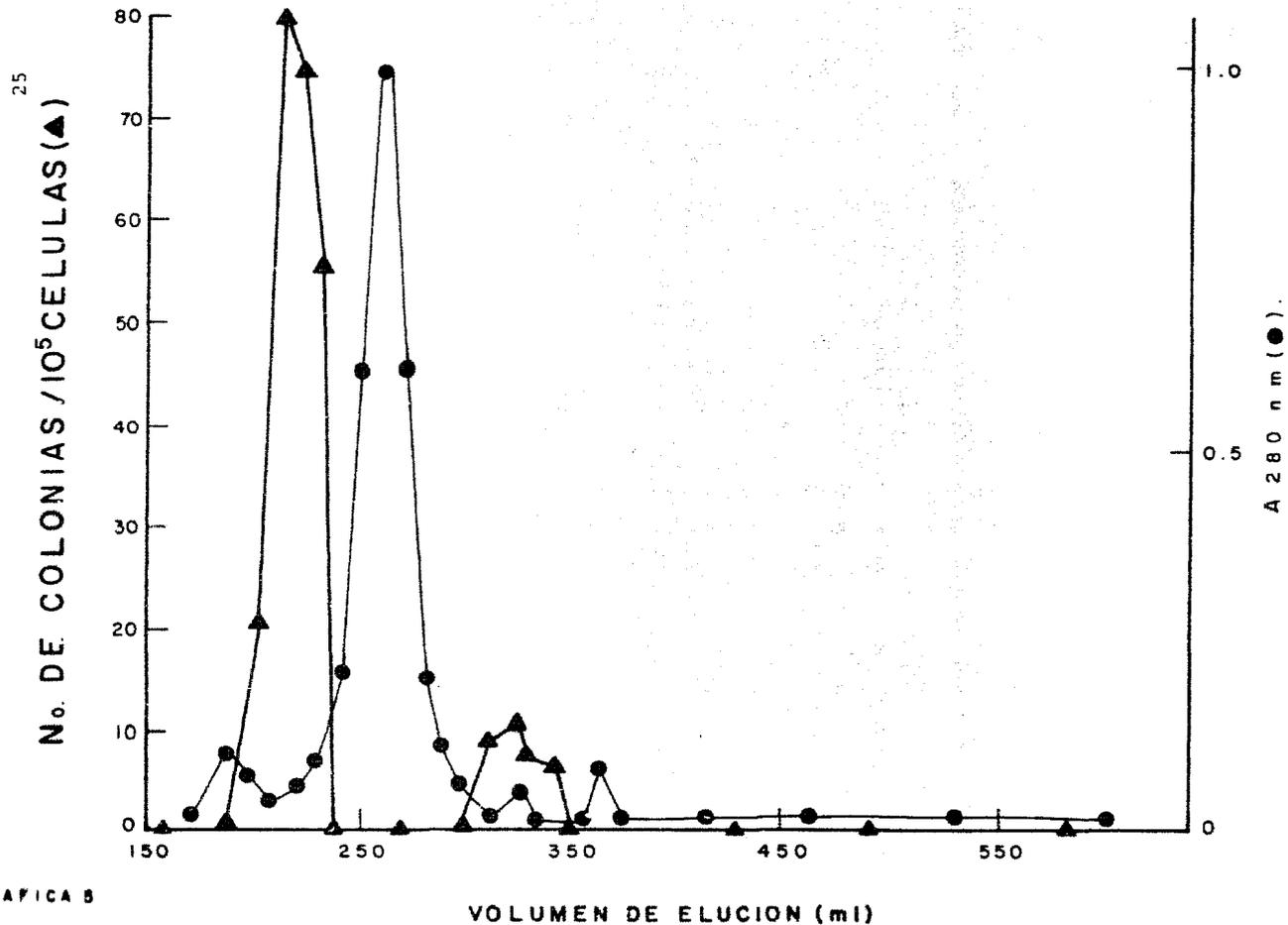
probaron MC para seleccionar uno con mayor actividad induc tora, se encontró que 0.4 ml de un MC indujo a la formación de 130 colonias. Con este medio condicionado se procedió a realizar las técnicas anteriormente descritas, encontrando en este caso dos actividades máximas de MGI correspondientes a los volúmenes de elución de 187 (90 colonias / 10^5 células) y 235 ml (27 colonias / 10^5 células) (gráfica 4).

La determinación de las masas moleculares se realizó mediante extrapolación, utilizando para ello moléculas de masa mole cular conocida. Encontrándose que las masas moleculares de los MGI obtenidos fueron de 70 000 (MGIa) y 44 000 (MGIb) daltones (gráfica 5).

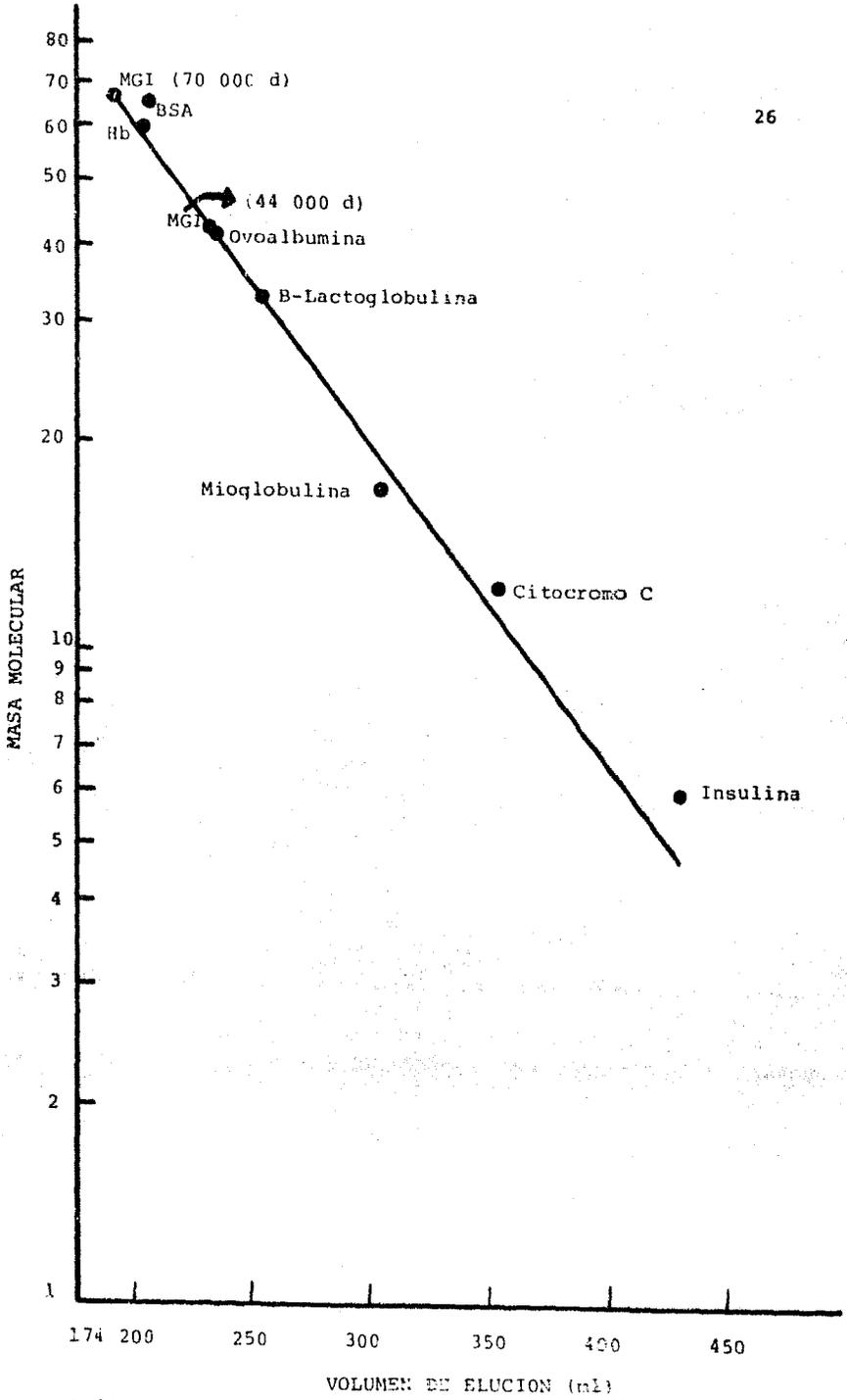
Determinación del tipo de célula que produce el MGI.

Mediante un análisis morfológico tanto de las CIP como de las CRP, se reconocieron dos diferentes tipos celulares; los macrófagos y los fibroblastos. Cabe hacer notar que en algunos de los cultivos con CRP estas células permanecían en número bajo y constante en función del tiempo de cultivo (menos del 1 % del total). En consecuencia, pensamos que el proceso inflamatorio empleado para obtener las CIP, proporcionó a las células fibroblásticas de la cavidad periitoneal la capacidad de proliferación in vitro. Por otro lado, sólo en los cultivos de CIP donde se presentó una proliferación de fibroblastos se obtuvo un MC con actividad de MGI.

Debido a que solamente las CIP produjeron MGI, se procedió a determinar de entre estas células, cuáles eran las causantes de dicha producción. Si tomamos en cuenta que hemos obtenido por medio de la cromatografía de masas moleculares dos diferentes MGI provenientes del MC-CIP-LPS, uno de ellos con 70 000 daltones semejante al producido por una línea de tipo fibroblástica (55,56) y una segunda de 44 000 daltones parecida a la secretada por una línea leucémica de tipo mag



GRAFICA B



Gráfica 5

Gráfica 4.- Cromatografía en Gel ACA-54 y determinación de colonias en agar. Absorbancia a 280 nm (●). Formación de colonias en agar (▲).

Gráfica 5.- Calibración para la determinación de la masa molecular del MGI, empleando varias sustancias de masa molecular conocida.

crofágico (64), se prodría en consecuencia pensar que los dos tipos de células en las CIP puedan ser los causantes de la producción del MGI.

Para determinar más específicamente cómo es la producción del MGI en cada uno de estos tipos celulares se consideró pertinente separar los fibroblastos de los macrófagos en cultivos de CIP con 11 días de incubación. Debido a que los macrófagos no pueden ser separados del sustrato de cultivo sin ser dañados considerablemente se consideró pertinente, el dejar este tipo de células en el sustrato original y se parar los fibroblastos a otra caja de cultivo mediante la técnica de tripsinización. Tal y como se esperaba, los fibro blastos fueron las únicas células que se separaron del sus trato de cultivo, mientras que los macrófagos parecían ac tivarse aumentando aún más su superficie de adherencia. Es tos macrófagos fueron posteriormente cultivados, pero al poco tiempo comenzaron a desintegrarse, lo cual interpretamos como toxicidad ocasionada por la fagocitosis de la trip sina. En vista de que no había forma de separar a estos dos tipos celulares sin dañar a los macrófagos, se procedió a trabajar exclusivamente con los fibroblastos, para determi nar si éstos eran las células productoras del MGI. Para ello se efectuó una pequeña variante a la técnica establecida de tripsinización que consistió en tripsinizar todas las célu las adherentes y 15 min después agregar, sin retirar las cé lulas, 0.2 ml de suero fetal de bovino en la caja de culti vo, para de esta forma inhibir la acción proteolítica de la tripsina. Posteriormente se cultivaron todas las células du rante 24 horas, al cabo de las cuales quedaron exclusivamen te colonias formadas por células de morfología fibroblástica (FCP, fibroblastos de la cavidad peritoneal), adheridas a la caja de cultivo y células muy dañadas en suspensión, las cuales consideramos son los macrófagos y algunos fibro blastos que no soportaron el tratamiento. Por último, se

cambi6 el medio de cultivo para eliminar los residuos culu
lares quedando as4 solamente los fibroblastos adheridos a
la caja de cultivo y se procedi6 entonces a la obtenci6n de
los medios condicionados (MC-FCP-LPS), para ello se agrega
ron a las cajas de cultivo con FCP, 50 mcg/ml de LPS incubán
dolos durante 4 d4as m4s.

Al ensayar 0.4 ml provenientes de estos MC-FCP-LPS, en el
bioensayo de bicapa en agar, se obtuvo una inducci6n de 123
colonias/ 10^5 c4elulas, semejante a la obtenida con las CIP.
Con la finalidad de determinar si los fibroblastos de la ca
vidad peritoneal proliferaban con un tiempo de doblaje seme
jante al de 48 horas encontrado para la producci6n de MGI
(gr4fica 3), se procedi6 a evaluar la proliferaci6n de es
tas c4elulas en funci6n del tiempo de cultivo. Para lo cual
se cultivaron y cuantificaron las CIP que se separaron del
sustrato de cultivo por acci6n de la tripsina a los 4, 8,
12 y 16 d4as de incubaci6n. Encontrando que exist4a un in
cremento exponencial de estas c4elulas y que el tiempo en que
se duplicaba era de 52 horas. Sin embargo este experimento
fue realizado en s6lo una ocasi6n por lo que ser4a recomen
dable reconfirmarlo.

DISCUSION

Es innegable la importancia que tienen los macrófagos y los granulocitos en la defensa del organismo contra cuerpos extraños. Una de las moléculas más estudiadas encargadas de inducir a la formación de estas células es el inductor de macrófagos y granulocitos (MGI) también conocido como factor estimulante de colonias (CSF), el cual induce a la proliferación y diferenciación de precursores mieloides hacia células fagocíticas morfológicamente maduras. Se han realizado muchos intentos hoy en día, para determinar la masa molecular de este MGI, utilizando para ello diferentes medios condicionados (MC) tanto por tejidos, órganos, células, extractos tisulares y por diversos fluidos corporales, encontrándose una gran variedad de resultados dependiendo de la fuente de obtención. Así tenemos en los extremos valores tales como 5 000 y 150 000 daltones. Dentro de esta gran gama de factores reguladores ha despertado gran interés el producido por los fagocitos, ya que obviamente representarían un fenómeno de autorregulación. Un sistema útil para el estudio y obtención de fagocitos mononucleados lo representa la cavidad peritoneal en donde en forma fácil y poco traumática se pueden obtener un buen número de estas células, pudiéndose aumentar considerablemente dicha población celular mediante una reacción inflamatoria. Sin embargo, cabe mencionar que existe una gran heterogeneidad en el tipo de células de dicha cavidad, en consecuencia el MGI existente en los MC por estas células, puede provenir de cualquiera de los tipos celulares que la componen y en

consecuencia no se puede asegurar el tipo celular responsable de esta secreción.

Se ha propuesto (42,47) que los macrófagos son los productores del MGI debido a que representan la gran mayoría de este grupo de células y que el monocito (su precursor) ha sido identificado como una célula productora de este factor. No obstante no existe a la fecha ningún estudio que identifique al macrófago como productor del inductor a la formación de colonias y más aún en caso de ser este el causante de dicha secreción no se sabe si esta función corresponde a los macrófagos residentes o a los inducidos.

En el presente trabajo se observó que al ensayar MC provenientes de las células inducidas de la cavidad peritoneal (CIP) solamente las CIP fueron capaces de secretar MGI, este resultado indicó que los macrófagos residentes, que constituyen casi la totalidad de las CRP, no son capaces de producir el MGI.

Durante el desarrollo del presente trabajo, se obtuvieron tres diferentes resultados que señalan al fibroblasto como la célula causante de la síntesis principal del MGI. El primer resultado indicó que, al eliminar de los cultivos de CIP a los macrófagos mediante la técnica de tripsinización modificada, el MC producido por los fibroblastos restantes contenía cantidades de MGI muy similares a las obtenidas cuando se encontraban presentes la totalidad de las células. Por otro lado se encontró que la producción del MGI por las CIP en función del tiempo, fue exponencial con un tiempo de doblaje de 48 horas, similar al de 52 horas en contrado para la duplicación de los fibroblastos en dichos cultivos. Por último, no en todos los cultivos de CIP se obtuvo un MC rico en MGI, sino exclusivamente en aquéllos en los cuales se presentaba, una proliferación de células de tipo fibroblástico, las cuales en ocasiones llegaban a cubrir todo el sustrato de cultivo. No sabemos la razón por la cual en aproximadamente un 50 % de los casos existía una

proliferación de fibroblastos, pero creemos que está directamente relacionado con el proceso inflamatorio ya que con CRP se obtuvo esta proliferación. Mayores estudios serán necesarios para determinar la causa de dicha proliferación. El hecho de que los resultados aquí discutidos señalen al fibroblasto como una célula secretora del MGI, no excluye la posibilidad de que el macrófago tal y como ya ha sido mencionado (42,47), contribuya aunque en forma minoritaria a dicha producción.

Al cromatografiar MC de las CIP activadas con LPS se obtuvieron dos diferentes picos de actividad: uno correspondiente a una masa molecular de 70 000 daltones y otra de 44 000, siendo el primer pico 5.11 veces más activo que el segundo. Tenemos por un lado que la masa molecular del MGI producido por líneas celulares de tipo fibroblástico, ha sido reportado de alrededor de 70 000 daltones (54,55) y el de una línea celular de tipo macrofágico con 45 000 daltones (64). En consecuencia se puede suponer que debido a que las masas moleculares coinciden con las obtenidas por nosotros y que tenemos exclusivamente macrófagos y fibroblastos en nuestros cultivos, que los dos picos de actividad por nosotros obtenidos, en este ensayo puedan corresponder al producido por estos dos tipos celulares.

Cabe mencionar que en un principio al hacer el análisis de las diferentes fracciones recolectadas de la cromatografía no se obtuvo actividad de MGI aún cuando el MC utilizado sí era activo. En consecuencia y bajo la suposición de que la técnica bioquímica empleada haya diluido o alterado al MGI, se tuvo que diseñar una técnica de preincubación para aumentar la sensibilidad del ensayo, y obtener de esta forma los resultados aquí mencionados. Tomando en consideración que no se obtuvo actividad de MGI a partir de los MC por CRP y CIP en ausencia de fibroblastos proliferantes, sería recomendable el repetir estos experimentos con un periodo de

preincubación, para de esta forma aumentar la sensibilidad del ensayo y poder asegurar, con mayor certeza si los macrófagos son capaces de participar en un proceso de autorregulación. Asimismo, sería recomendable obtener MC formados exclusivamente por fibroblastos o por macrófagos inducidos para determinar mediante una evaluación de masas moleculares si los dos picos de MGI encontrados corresponden realmente a los producidos; uno por los fibroblastos, otro por los macrófagos, o representan únicamente dos tipos de MGI producidos por los fibroblastos. Además consideramos que se debería realizar la purificación de los diferentes MGI, con la finalidad de determinar la heterogeneidad tanto funcional como molecular de cada uno de ellos, ya que se ha mencionado que el MGI proveniente de fibroblastos (55) no induce fuertemente a la proliferación celular, sino a la completa maduración del macrófago. En consecuencia pudiese ser que el MGI producido por los macrófagos inducidos de la médula ósea tengan también aparte de una función de inducción a la proliferación, alguna más específica, por lo tanto sería recomendable purificar este MGI de macrófagos inducidos a la cavidad peritoneal, con masa molecular de 45 000 daltones y compararlo con el producido con el de los macrófagos alveolares para determinar si a partir de la inducción a la proliferación tengan ya información hacia la producción de otros macrófagos específicos ya sea del pulmón o de la cavidad peritoneal, pues pudiese considerarse que si en el proceso evolutivo se formaron dos diferentes moléculas de MGI, una con la doble masa molecular que la otra, entonces debería existir alguna otra razón para ello, ya que en el organismo existe una economía de energía y no es factible que se produzcan dos moléculas diferentes provenientes de un mismo tipo celular, para una misma función.

Por otro lado, la purificación del MGI puede ser utilizada para la obtención de anticuerpos contra ella, para la realización tanto de un mejor ensayo para su determinación,

como para el entendimiento de su localización y síntesis intracelular o de su efecto en la célula blanca. Asimismo, la existencia del MGI purificado puede servir de utilidad terapéutica en pacientes en donde sea deseable un aumento en el número de granulocitos y macrófagos, como en enfermedades relacionadas con la eliminación de cuerpos extraños. Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente trabajo al demostrar una propiedad importante como es la producción de MGI por los macrófagos inducidos y la falta de esta por los residentes apoyan la hipótesis de que estas células puedan provenir de precursores distintos. Esto implicaría que en la cavidad peritoneal existen macrófagos provenientes de un precursor mesenquimatoso local que genera y mantiene a dicha población, y que el monocito sea el origen de los fagocitos que migran de la médula ósea por lo que se encuentran de paso en dicha cavidad. Siendo que los macrófagos provenientes de la médula ósea los que pueden aumentar en número cuando se registra un proceso inflamatorio, ocasionando con ello la secreción de más MGI. Ahora bien, el hecho de que los LPS hayan aumentado en forma tan importante la producción de este inductor, indicaría que en el organismo cuando el proceso inflamatorio es de tipo infeccioso la respuesta mediada por las CIP sería mucho más rápida, liberando al organismo de microorganismos más efectivamente que de otros elementos extraños a él.

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-Histiđina 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-Triptofđno	16.0
L-Tirosina (Sal Disóđica)	104.2
L-Valina	94.0
<u>VITAMINAS</u>	mg/l
D-Ca Pantotenato	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/l

Cloruro de Calcio anhidro	200.0
Nitrato de Fierro III nonahi dratado	0.1
Cloruro de Potasio	400.0
Sulfato de Magnesio Anhidro	96.67
Cloruro de Sodio	6400.0
Fosfato Monosódico Monohidra tado	125.0

OTROS COMPUESTOS mg/l

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 Estreptomycin 100 mcg/ml. Posteriormente se aforó a un volumen de 1000 ml y se agitó hasta disolver, sin sobreagitar. 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 utilizando 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

PREPARACION DE VERSENO

Para preparar el verseno se agregan en 800 ml de agua bides
tilada, las siguientes sustancias:

Tris base	3.04 gr
NaCl	8.00 gr
KCl	0.40 gr
E.D.T.A.	0.20 gr

Posteriormente se agita y se afora a 1 lt con agua bidesti
lada, se ajusta el pH a 7.7 con HCl y se esteriliza por auto
clave a 20 lb durante 20 min.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Quesenberry M. D. and Levitt M. D. : Hematopoietic stem cells. *J. Medicine*. 301 (14): 755 (1979).
- 2.- Ford C. E., Hamerton J. L. and Barnes B. W. H.: Cytological identification of radiation-chimeras. *Nature* 452:453. (1956).
- 3.- Lindsley D. L., Odell T. T. and Tausche F. G.: Implantation of functional erythropoietin elements following total body irradiation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 90:512 (1955).
- 4.- Mitchison N. A.: The colonisation of irradiated tissue by transplanted tissue spleen cells. *Br. J. Exp. Pathol.* 37:239. (1956).
- 5.- Nowell P. C. and Habermayer J. G.: Growth and continued function of rat marrow cells in X-irradiated mice. *Cancer Res.* 16:258. (1956).
- 6.- Till J. E. and Mc Coloch E. A.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marow cells. *Radiat Res.* 14: 213. (1961).
- 7.- Curry J. L. and Trentin J. J.: Hemopoietic spleen colony studies. I Growth and differentiation. *Dev. Biol.* 15:395 (1967).
- 8.- Curry J. L. and Trentin J. J.: Hemopoietic spleen colony studies. III. Hemopoietic nature of spleen colonies induced by lymphnode or thymus cells, with or without phytohemagglutinin. *J. Immunol* 99:907 (1967).
- 9.- Trentin J., Wolf N and Cheng U. : Antibody production by mice repopulated with limited numbers of colonies of lymphoid cell precursors. *J. Immunol* 98: 1326 (1967).

- 10.- Siminovitch L. J., Till J. E. and McCulloch E. A.: Radiation responses of hemopoietic colony-forming cells derived from different sources. *Radiat Res* 24: 482 (1965).
- 11.- Barnes D. W. H. and Loutit J. F.: Hemopoietic stem cells in the peripheral blood. *Lancet* 2:11238 (1967).
- 12.- Barnes D. W. H. and Loutit J. E.: Effects of irradiation and antigenic stimulation and antigenic stimulation on circulating hemopoietic stem cells of the mouse. *Nature* 213:1142 (1967).
- 13.- Wolf N. S. and Trenton J. J. Hemopoietic colony studies V. Effect of hemopoietic organ stroma on differentiation of pluripotent stem cells. *J. Exp. Med.* 127:205 (1968).
- 14.- Reissmann K. R.: Studies of the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. *Blodd* 5:372 (1950).
- 15.- Bleiger I. Liron M. and Feldman M.: Studies on the regulation of hemopoietic spleen colonies. *Blood* 29:469 (1967)
- 16.- Curry J. L., Trentin J. J. and Wolf N.: Hemopoietic spleen colony studies. II Erythropoiesis. *J. EXP. Med.* 125: 703 (1967).
- 17.- Krantz S. B. and Goldwasser E.: On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. II. The effect on RNA synthesis. *Biochim Biophys Acta* 103:325 (1965)
- 18.- Quesenberry P. and Levitt L: Hematopoietic stem cells. *Nex. Eng. J. Med.* 301 (15):819 (1979).
- 19.- Odell T. T., Jackson C. W. and Friday T. J.: Effects of thrombocytopenia on megakaryocytopoiesis. *Br. J. Hematol* 17:91 (1969).
- 20.- Shulman N. R., Marder V. J. and Weinrach R. S.: Similarities between known antiplatelet antibodies and the factor responsible for thrombocytopenia in idiopathic purpura; physiologic, serologic and isotopic studies. *Ann NY Acad Sci.* 124:499 (1965).

- 21.- Metcalf D. and Foster R.: Behavior on transfer of serum stimulated-bone marrow colonies. *Pro. Soc. Ex. Biol. N. Y.* 126:758 (1967).
- 22.- Di Persio J. F., Brean J. K., Lichtman M. A. and Sessler B. L.: Granulocyte grow modulators elaborated by human cells lines in hematopoietic-cell differentiation. *Blood.* 51:3 (1978).
- 23.- Metcalf D., Johnson G. R. and Burger A. W.: Direct stimulation by purified GM-CSF of the proliferation on multipotential and erythroid precursor cells. *Blood.* 55:1 (1980)
- 24.- Steward C and Lin H. : Macrophage grow factor and its relationship to colony stimulating factor. *J. Reticuloendothel. Soc.* 4: 269 (1978)
- 25.- Laukel H., Gessel W. D., Doch M. H. and Haverman K.: Preparation of colony stimulating activity from large batches of human urine and production of antisera against it. *J. Cell. Physiol.* 94:21. (1978).
- 26.- Eaves A. and Bruce W.: In vitro production of colony stimulating activity: I. Exposure of mouse peritoneal cells to endotoxin. *Cell Tissue Kinet.* 7:19 (1973).
- 27.- Price G., Krogsrud R., Stewart S. and Sen J.: Heterogeneity of colony stimulating activities. In *hematopoietic cell differentiation*. Academic Press (1978).
- 28.- Ralph P., Broxmeyer H. and Nakoinz I.: Induction of myeloid colony stimulating activity in murine monocyte tumor cells lines by macrophage activators and in a T cell by concavalin A. *Cancer Res.* 38:1414 (1978).
- 29.- Bradley T. R. and Metcalf D.: The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Asus J. Exp. Biol. Med. Sci.* 44:287 (1966).
- 30.- Pluznik D. H. and Sachs L.: The colonizing of normal "mast" cells in tissue culture. *J. Cell. Comp. Physiol.* 66:319 (1965).

- 31.- Hara H. and Ogawa M.: Erythropoietic precursor in mice under erythropoietic stimulation and suppression. *Exp. Hematol.* 5:141 (1977).
- 32.- Zucherman K. S. Sullivan R. and Quesenberry P.J.: Effects of actinomycin D in vivo on murine erythroid stem cells. *Blood* 51:957. (1978).
- 33.- Metcalf D. and Foster R.: Bone marrow colony-stimulating activity of serum from mice with viral-induced leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.* 39:1235 (1967).
- 34.- Paran M. and Sachs L.: The continued requirement for inducer for the development of macrophage and granulocyte colonies. *J. Cell Physiol.* 72:247 (1968).
- 35.- Motoyoshi K., Takaku F., Mizoguchi H., Miura Y.: Purification and some properties of colony-stimulating factor from normal human urine. *Blood* 52(5):1012 (1978).
- 36.- Fojo S. S., Wu M. C., Gross M. A. Purcell Y. and Yunis A. A.: Purification and characterization of a colony stimulating factor from human lung. *Biochemistry* 17 (15):3109 (1978).
- 37.- Hinterberger W., Paukovits W. R., Kineast H., Moritz E. and Zwintz O.: Human lung tissue as a source of colony stimulating activity. *Blut* 37(2):69 (1978).
- 38.- Fojo. S. S., Wu M. C., Gross M. A. Prucell Y. and Yunis A. A.: The isolation and characterization of a colony stimulating factor. *Biochim Biophys Acta* 494(1): 92(1977).
- 39.- Rosendaal M. : Colony-stimulating factor (CSF) in oestrogen-stimulated spayed murine uteri. *Exp Hematol* 5 (2):79 (1977).
- 40.- Bull F. G., Rosendaal M.: Macrophage colony development properties of colony stimulating factors from murine embryo and pregnant uterus. *Immunology* 34 (3):479 (1978).
- 41.- Byrene P. V., Heit W. and Kubanek B. Stimulation of in vitro granulocyte-macrophage colony formation by mouse heart conditioned medium. *Br. J. Hematol* 40 (2):197 (1978).

- 42.- Mahmood T. and Robinson W. A.: Granulocyte modulation of endotoxin-stimulated colony-stimulating activity (CSA) production. *Blood* 51 (5):879 (1978).
- 43.- Claesson M. H., Rodger M. B., Jognson G. R., and in agar medium. *Clin Exp. Immunol* 28 (3): 526 (1977).
- 44.- Nicola N. A., Burgess A. W. and Metcalf D.: Similar molecular properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factors produced by different mouse organs in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 254 (12): 5290 (1979).
- 45.- Johnson G.R. and Metcalf D.: Sources and nature of granulocyte-macrophage colony stimulating factor in fetal mice. *Exp. Hematol.* 6 (3): 327 (1978).
- 46.- Ralph P., Broxmeyer H. E. and Nakoinz I.: Immunostimulators induce granulocyte and macrophage colony stimulating activity and block proliferation in a monocyte tumor cell line. *J. Exp. Med.* 146 (2):611 (1977).
- 47.- Miyano Y., Tamai M. and Kitamura Y.: Development of the macrophage layer formed in the peritoneal cavity of S1/S1 (d) mice. *Int. Cancer Res. Med. Sch. Univ. Osaka.* 11 (2): 103 (1978).
- 48.- Ramsey R. Hays E. F. : Factors promoting colony stimulating activity (CSA) production in macrophages and epithelial-cells. *Exp. Hematol.* 7 (5):245 (1979).
- 49.- Naughton B. A., Gambaitalo C., Naughton G. K. and Luis P.: Granulopoiesis and colony stimulating factor production in regenerating liver. *Exp. Hematol.* 10 (15):451 (1982).
- 50.- Motoyoshi K., Suda T., Kusumoto K., Takaku F. and Miura Y.: Granulocyte-macrophage colony-stimulating and binding activities of purified human urinary Colony-stimulating factor to murine and human bone marrow cells. *Blood* 60 (6) :1378 (1982).

- 51.- Clark-Lewis I., Schrader J. W.: Biochemical characterization of regulatory factors derived from T cell growth factor and T cell replacing factor from granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol* 128 (1):168 (1982).
- 52.- Ohno T., Seki M and Shikita M.: Colony-stimulating factors active on human bone marrow cells from a Yoshida sarcoma cell line. *Blood* 51 (5):911 (1978).
- 53.- Di Persio J. F., Brennan J. K., Lichtman M. A. and Speiser B. L.: Human cell lines that elaborate colony-stimulating activity for the marrow cells of man and other species.
- 54.- Stanley E. R., Heard P. M.: Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L-cells. *J. Biol. Chem.* 153:4305 (1977).
- 55.- Waheed A. and Shadduck R. K.: Purification and properties of L-cell derived colony stimulating factor. *J. Lab. Clin. Med.* 94:180 (1979).
- 56.- Abdul Waheed and Richard K. Shadduck.: Purification of colony-stimulating factor by affinity chromatography. *Blood* 60 (1):238 (1982).
- 57.- Metcalf D. and Wilson J.: Endotoxin-induced size change in bone marrow progenitors of granulocytes and macrophages. *J. Cell. Physiol.* 89:381 (1976)
- 58.- McNeill T.A.: Antigenic stimulation of bone marrow colony forming cells. I. Effect of antigens on normal cells in vitro. *Immunology* 18:39 (1970).
- 59.- Bradley T. R., Telfer P. A. and Fry P.: The effect of erythrocytes on mouse bone marrow colony development in vitro. *Blood* 38:353 (1971).
- 60.- Metcalf D., MacDonal H. R. and Chester H. M.: Serum potentiation of granulocyte and macrophage colony formation in vitro. *Exp. Hematol.* 3:261 (1975).

- 61.- Metcalf, D. and Foster.: Behavior on Transfer of serum stimulated bone marrow colonies. Pro. Soc. Ex. Biol. N.Y. 126:758 (1967).
- 62.- Stanley, E., Robinson W., and Ada G. : Properties of colony stimulating factors in leukemic and normal mouse serum. Exp. Biol. Med. Sci. 46:757 (1968).
- 63.- Motoyoshi K., Takakuku F., Mizogouchi H. and Miuray Y. : Purification and some properties of colony stimulating factor from normal human urine. Blood 5:1012 (1978).
- 64.- Mario C., Jorege R., Maximo G. Gloria C. and Benny W.: Evidence of the existence of a factor that induces Fc Receptors on bone marrow cells.
- 65.- Mints J. and Sachs, L.: Differences in inducing activity for human bone marrow colonies in normal granulocytic colonies by mouse marrow cells in vitro. J. Cell. Physiol. 84:275 (1974).
- 66.- Padawer J. : The peritoneal cavity as a site for studying cell-cell and cell-virus interactions. J. Reticuloendothel Soc. 14: 462 (1973).
- 67.- Padawer J. and Gordon A.: Cellular elements in the peritoneal fluid of some mammals. Anat. Rec. 124:209 (1956).
- 68.- Yang H., Skinsness O.: Peritoneal macrophage response in neonatal mice. J. Reticuloendothel. Soc. 14:181 (1973).
- 69.- Carr I. : The macrophage. Academic Press, London. (1973).
- 70.- Monroy A. : Activación de precursores mieloides para la producción de macrófagos y granulocitos peritoneales y la formación de receptores Fc. Tesis profesional. ENEP Zaragoza UNAM.
- 71.- Daems W. and Brederoo P: Electron microscopical studies on the structure, phagocytic properties and peroxidatic activity of resident and exudate peritoneal macrophages in the guinea pig. Zellforsch Mikrosk

- Anat. 144:247 (1973).
- 72.- Daems W. T. and Koerten H. K. : the effect of various stimuli on the cellular composition of peritoneal exudate in the mouse. Cell Tissue Res. 190:47 (1978).
- 73.- Mackaness G.B. : The mechanism of macrophage activation. En : Infectious Agents and Host Reactions. (S. Mudd, ed.) Saunders, Philadelphia. pp 61-75 (1970).
- 74.- Lin H. : Peritoneal exudate cells, II Kinetics of appearance of colony-forming cells. J. Cell Physiol. 84: 159
- 75.- Felix M. D. and Dalton A. J. : A phase-contrast microscope study of free cells native to the peritoneal fluid of DBA/2 mice. J. Natl Cancer Inst. 16/ 415 (1956).
- 76.- Sabin F. R., Miller F. R. and Smithburn K.C. : Changes in the bone marrow and blood cells of developing rabbits. J. Exp. Med. 64 : 97 (1976).
- 77.- Lutton J. D. Kiremidjian L. : Electrokinetic studies on normal and thioglycollate stimulated on normal and thioglycollate stimulated peritoneal macrophages. Exp. Cell Res. 79: 492 (1973).
- 78.- Whitley S. B. and Leu R. W. : Role of macrophage activation on the expression of MIF receptors by guinea pig peritoneal and alveolar macrophages. J. Reticuloendothel Soc. 20: 9a (1976).
- 79.- Edelson P. J. and Cohn Z. A. : 5'-Nucleotidase activity of mouse peritoneal macrophages. I. Synthesis and degradation in resident and inflammatory populations. J. Exp. Med. 144:1581 (1976).
- 80.- Bianco C. and Edison P. J. : 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 (1978).
- 81.- Lepper A. W. and D'Arcy Hart P. : Peroxidase staining in elicited and non-elicited mononuclear peritoneal cells from BCG-sensitized mice. Infec. Immun. 14:522 (1976).
- 82.- Deams, 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. (1979).

- 83.- Bakker, J.M. de, Wit, A.W. de, Daems, W. T. : The relations between monocyte and resident (Tissue) macrophages. En: Disorders el monocyte-macrophage system. (F. Schazl, D. Hunh, H. E. Schaefer eds.) Spriger-Verlang Berlin-Heidelberg, New York. (1981).
- 84.- Bursuker, I. Goldman, R.: On the origin of macrophage heterogeneity. A hipothesis. J. Reticuloendothel Soc 33: 207 (1981).
- 85.- Rex W. B. and Willam A. R. : Bacterial, serum and cellular modulation of granulopoietic activity. J. Cell Physiol 92:145 (1977).