

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ZARAGOZA, UNAM

"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE SUBPOBLACIONES
DE MACROFAGOS DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATON"

TESIS QUE PARA OBTENER

EL TITULO DE BIOLOGO

PRESENTA: RAMIRO RIOS GOMEZ.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
III. ANTECEDENTES	4
A. Cultivo de Células y Tejidos	4
B. Sistema Hematopoyético	8
C. Funciones generales de los Macrófagos	14
D. Heterogeneidad Funcional de los Macrófagos	23
E. Separación de Células en Subpoblaciones	26
IV. OBJETIVOS	38
V. HIPOTESIS	39
VI. MATERIAL Y METODOS	
A. Determinación de la Mejor Relación Tiempo- Concentración de Macrófagos y Tiempo-Celulas Cultivadas-Células Adheridas, en Ratones Estimulados	40
B. Separación de Subpoblaciones de Macrófagos por Adherencia	41
C. Separación de Subpoblaciones de Macrófagos por Gradientes de Densidad	45
VII. RESULTADOS	49
Gráficas Tablas Figuras y Fotografías	60
VIII. DISCUSION	83
IX. APENDICES	90
X. BIBLIOGRAFIA	96

I. RESUMEN

El arribo de las células a la cavidad peritoneal de ratones - estimulados con caseinato de sodio presenta dos etapas, una primera en la que las células almacenadas en el último compartimento de la médula ósea son liveradas entre los 57 min. y las 4 hrs. y una segunda en la que las células que acuden a la cavidad son resultado de la proliferación en la médula ósea principalmente. Se encontró que las células almacenadas en el último compartimento de la - médula ósea de ratón es de aproximadamente de 16×10^6 , mismo que se duplica a las 67.5 hrs. Este incremento en el número de células durante la reacción inflamatoria es casi exclusivamente de macrófagos y linfocitos después de las 8 hrs., encontrando que a las 67.5 hrs (4 días) la línea monocito-macrófago representa el - 73% (25.6×10^6 cel) de la población total de células de la cavidad.

De los métodos empleados para hacer la separación de los macrófagos, los que se basan en la propiedad de adherencia en general aportaron menos del 10% de células viables después de 24 hrs del - tratamiento. A diferencia de estos, el método de separación por centrifugación en gradientes de densidad de Percoll permitieron obtener porcentajes de recuperación de 80 a 90.5% con un 85.5 y 98% de viabilidad para el gradiente discontinuo y continuo respectivamente. Estas células fueron activas en la fagocitosis de esferas de - latex, enlazar eritrocitos de carnero a su membrana y para secretar lisozima al medio.

II. INTRODUCCION

Un problema general de la Hematología experimental ha sido conocer las interrelaciones entre los distintos elementos de la sangre y dilucidar el proceso de diferenciación del sistema hematopoyético, para poder comprender la naturaleza de los distintos desordenes que se presentan en este sistema, como la anemia aplástica, policitemia rubra vera y varios tipos de leucemia, así como comprender las interacciones celulares en el proceso inmunológico.

El sistema hematopoyético-linfoide es una mezcla compleja de células, que hace difícil la caracterización completa de los diversos tipos celulares que lo componen, por lo que surge la necesidad de crear métodos que permitan obtener poblaciones homogéneas, de tal forma que sea posible su caracterización morfológica, bioquímica, inmunológica y funcional.

Varios investigadores reconocen una heterogeneidad de tipos celulares en las distintas líneas del sistema hematopoyético (v.gr. se reconocen dos tipos de linfocitos y tres de granulocitos) que se identifican por sus características tanto citológicas como funcionales. Para el caso de la línea monocito-macrófago, numerosas investigaciones han confirmado la existencia de una heterogeneidad funcional. ¿Es esta heterogeneidad debida a distintos tipos celulares de la línea monocito-macrófago, u obedece a diferentes grados de diferenciación celular?, ¿ es debida a influencias locales en las que se encuentran las células?. Estas preguntas y otras más sólo se pueden resolver si se tienen aislados los diferentes tipos funcionales para poder estudiarlos individualmente.

El presente estudio tiene como finalidad aislar y caracterizar en subpoblaciones funcionalmente distintas a los macrófagos de la cavidad peritoneal de ratón, y forma parte del programa general de investigación "Producción y Caracterización de la Proteína Diferenciadora de Macrófagos y Granulocitos MGI en Células Mieloides", que corre a cargo del Dr. Benny Weiss Steider y que se desarrolla en el Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer de la ENEP Zaragoza UNAM.

III. ANTECEDENTES

A. CULTIVO DE CELULAS Y TEJIDOS

Cualquier organismo animal o vegetal no vive aislado del medio ambiente físico, y tiene la característica de regular su fisiología normal ante la presencia de cambios que acontecen a su alrededor, manteniéndose en un estado de homeostasis necesario para la supervivencia.

Del mismo modo, las células y los tejidos en cultivo guardan una relación estrecha con su entorno físico, y exigen condiciones adecuadas para su desarrollo. Para el cultivo de células y tejidos el mejor ambiente es aquel que proporciona las condiciones más semejantes a las encontradas in vivo, lo que hace necesario controlar los factores del medio que afectan a los tejidos. Estos pueden ser listados como sigue:

- Temperatura
- Presión osmótica
- Concentración de hidrógeno
- Otros iones inorgánicos
- Metabolitos esenciales
- Metabolitos complementarios
- Hormonas
- Otros factores complementario
- Matriz en que se desarrollan las células
- Interacción entre factores

Dentro de estos factores, el medio de cultivo cumple con las funciones de proporcionar: 1. Las condiciones físicas de pH, presión osmótica, iones inorgánicos, etc., necesarios para la sobrevivencia del tejido, y 2. Las sustancias químicas necesarias para el tejido, y que no puede sintetizar por sí mismo, como aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, etc.

El cultivo de células animales se inició el siglo pasado, con experimentos de Wilhelm Roux (1885), al mantener la placa medular de embriones de pollo en solución salina. Arnold (1887) mantuvo en cultivo leucocitos de rana igualmente en solución salina y siendo esta un medio de cultivo muy simple, las células sólo sobrevivían pocos días. A partir de entonces, el esfuerzo por crear medios de cultivo con mejores cualidades para el cultivo celular se convirtió en un problema central, siendo Ljunggren en 1898 quién utilizó fluido ascítico para mantener por muchos días piel humana in vitro y es hasta 1907, cuando Ross Harrison describe un medio de cultivo reproducible y que permite la proliferación celular. Este consistía en un coágulo de linfa de la misma especie, en el que cultivó fragmentos del tubo neural de embriones de rana.

Burrows y Carrel modificaron la técnica de Harrison, el primero utilizó coágulos de plasma en lugar de coágulos de linfa, y Carrel añadió extractos de embrión de pollo logrando mejores resultados, además de introducir el uso de frascos de cultivo el 1923. Carrel logró cultivar tejido embrionario de corazón de pollo, creando líneas que fueron mantenidas por 34 años.

Por su origen, los medios de cultivo utilizados para promover el crecimiento celular pueden ser clasificados como:

a) Medios Naturales, entre los cuales podemos citar la linfa, plasma, sangre, colágeno, suero, suero placentario, líquido amniótico, fluido ascítico, fluido pleural, humor acuoso y extractos de tejido.

b) Medios Sintéticos o Definidos, que podemos agrupar en cuatro tipos para el cultivo de células de mamífero y ave.

- Medio esencial para la sobrevivencia inmediata; se concreta a una solución salina balanceada que provee un control de la presión osmótica, pH, fuente de energía y ciertos iones inorgánicos necesarios.

- Medio esencial para la sobrevivencia prolongada; presenta además de la solución salina balanceada, todos los aminoácidos esenciales, vitaminas y suero proteico dializado.

- Medio esencial para el crecimiento indefinido; a diferencia del anterior, el suero no debe ser dializado.

- Medio esencial para funciones especializadas; su composición está basada sobre los medios definidos complejos, pero con ciertos factores conocidos que demanda cada órgano o tipo celular, así tenemos entre los más conocidos, la vitamina A para el crecimiento de epitelio ciliado, el cortex adrenal sólo sobrevivirá en la proximidad de tejido de pituitaria y probablemente requiera de la hormona adrenocorticotrópica.

Los medios obtenidos de fuentes naturales presentan varias desventajas, en particular, su composición es variable y desconocida.

da, y es prácticamente imposible reproducir exactamente las condiciones en otro experimento. Por esta razón y como resultado de los avances de la química aparecen los medios definidos, formados en primer término por una mezcla de compuestos inorgánicos que forman en conjunto una solución salina balanceada, la cual es básica para todo medio de cultivo y cuya función es proporcionar iones inorgánicos, mantener la isotonicidad del medio e impedir los cambios bruscos de pH; y en segundo lugar, una mezcla de sustancias orgánicas conocidas, entre las que figuran aminoácidos, vitaminas, azúcares y otras sustancias biológicas activas y que en conjunto sostienen la nutrición de las células en cultivo.

Varios medios de cultivo sintético son ahora empleados en el cultivo de células y tejidos, entre los que podemos citar: medio V-605, de Fischer et al (1948); medio 199, de Morgan et al (1950); medio N-858, de Parker y Hearly (1955); medio NCTC 109, de Evans et al (1964); medio Eagle, de Eagle (1955) y medio MB752/1, de Weymouth (1958).

De los medios de cultivo citados, el mejor ejemplo y que más cumple con las exigencias antes mencionadas para el cultivo in vitro, es el desarrollado por Eagle en 1955 (ver Apéndice I), que tiene como base la solución salina de Eagle, rojo fenol como indicador del pH y las sustancias orgánicas que sirven como fuente de energía para las células. Sin embargo, no ha sido posible, salvo muy pocas excepciones, mantener líneas celulares que crezcan en un medio definido, y normalmente es necesario añadir porcentajes variables de fluidos biológicos, siendo los más comunes el suero de

caballo y al suero fetal de becerro. De esta forma se logran medios esenciales para el crecimiento indefinido, en los que el cultivo puede mantenerse por largos períodos de tiempo.

El cultivo celular ha permitido dilucidar varios problemas -- con respecto a los mecanismos de la inmunidad (Unanue and Calderon 1975, Unanue 1978), como la naturaleza de las interacciones de células que intervienen en la respuesta inmune (Waldron et al 1973, Rosenthal et al 1975, Rosenthal et al 1978); analizar los mecanismos de control que regulan el crecimiento y diferenciación de las células en metazoarios, que incluyen hormonas detectadas in vivo y otros factores producidos localmente, caracterizados in vitro (Que senberry and Levitt 1979, Hartmann et al 1981), y factores activadores que participan induciendo la maduración funcional (Beller et al 1978).

B. SISTEMA HEMATOPOYETICO.

En el hombre, muchos tejidos consisten primariamente de células diferenciadas que normalmente muestran poca evidencia de proliferación y autorrenovación. Sin embargo, las células gastrointestinales, piel y tejido linfoide-hematopoyético continuamente se autorrenuevan y así proliferan y diferencian extensamente. En realidad, en cada sistema, un número pequeño de células madre (stem cells) - tiene la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse, y las células más maduras son derivadas de estas células madre.

El concepto de célula hematopoyética 'stem' como la progenitora de eritrocitos, leucocitos y plaquetas (las tres clases de ele-

mentos formadores de la sangre) ha sido un principio básico de la hematología experimental. Aunque aún hay intensos debates, existe un tipo de célula 'stem' pluripotencial o varias células 'stem' -- unipotenciales para cada línea celular (Quassenberry and Levitt, -- 1979). Hay evidencias experimentales de la existencia de células -- unipotenciales en el hombre (Pike and Robinson 1970), y de ambos -- tipos de células en el ratón (Bradley and Metcalf 1966). Además, -- varias sustancias humorales e influencias ambientales locales tam-- bién parecen influenciar la diferenciación y proliferación en el -- compartimento de la célula madre de la médula.

El uso de radiaciones para inducir marcas en los cromosomas -- de células madre individuales y el seguimiento ulterior de la dife-- renciación de estas células, permitió concluir que el sistema lin-- foide y mieloide derivan de una célula madre común, pues se encon-- tró células diferenciadas en ambos sistemas con cromosomas marca-- dos (Edwards et al 1970, Abramson et al 1977), la repoblación de -- células hematopoyéticas y linfopoyéticas tuvo por tanto su origen en una sola célula 'stem' primitiva: la unidad formadora de colo-- nias mieloide-linfoide (CFU-L-M) (Curry et al 1967, Abramson et al 1977). Esta célula da origen a los progenitores del sistema lin-- foide por un lado, y a la unidad formadora de colonias del bazo -- (CFU-S) por otro (ver Fig.1). Este tipo de células de la CFU-S -- (llamada así por formar nódulos de células en los órganos linfoi-- des de ratones irradiados letalmente) probaron tener naturaleza -- clonal en forma definitiva; por un lado, los nódulos consistieron de células eritroides, granulocíticas, megacariocíticas y no dife-- renciadas, y en agar semisólido se obtuvieron poblaciones puras o

mezcladas a partir de ellas; por otro lado, el seguimiento de estas células que contenían marcadores cromosómicos permitió concluir que es una célula capaz de producir los tres tipos de células mieloides, y que estas células formadoras de colonias proliferan y se diferencian extensamente y experimentan autorrenovación (Becker et al 1963). Esta característica define a la célula 'stem' hematopoyética como pluripotencial (Fig. 1). Varios investigadores reconocen a la CFU-S como la célula progenitora de todas las células mieloides y elementos linfoides (Wu et al 1967, Wu et al 1968, Edwards 1970, Nowell et al 1970). Esta ha sido un área de controversia.

Así, el sistema hematopoyético es convenientemente representado como una serie de poblaciones celulares con diferencias en su capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en células maduras de la sangre (Dexter and Testa, 1980), tanto en el hombre como en el ratón, dichas poblaciones parecen ser una serie concatenada de células con un grado crecientemente limitado de pluripotencialidad conforme las células se mueven a través de los compartimentos del sistema hematopoyético (Wintrobe et al 1981). Recientes trabajos indican que puede estar implicada una edad de generación, en la que una célula joven que ha producido pocas generaciones tiene mayor capacidad de renovarse a sí misma que la que ha producido varias generaciones (Micklem et al 1975, Rosendaal et al 1976).

Los mecanismos homeostáticos que regulan y mantienen la hematopoyésis no son bien conocidos, sin embargo, una variedad de mecanismos reguladores han sido identificados. Estos incluyen hormonas

detectadas in vivo y factores producidos localmente caracterizados in vitro (Quesenberry and Levitt 1979, Hartmann et al 1981), los cuales pueden actuar en varios estados de la diferenciación celular.

En el animal adulto, la médula ósea es el sitio de continua y rápida producción de células sanguíneas (hematopoyésis) y exhibe un estado dinámico que balancea la pérdida de las células tanto en ella como en la sangre (Fulop et al 1983). El proceso se inicia -- por un estímulo humoral que recibe la célula precursora especializada para cada línea y que conduce a cambios estructurales, bioquímicos, inmunológicos y funcionales en la célula especializada (diferenciada). Dicho estímulo es por medio de una hormona que actúa sobre una población de células más diferenciadas que la CFU-S.

Los elementos formadores de la sangre en mamíferos se han dividido en cinco series de acuerdo a su origen: la granulocítica, linfocítica, trombocítica, eritrocítica y la monocítica, esto sin considerar a la célula plasmática.

La serie granulocítica en el adulto normal proviene del mieloblasto, pasando por el promielocito, mielocito, metamielocito y polimorfonuclear (PMN), distinguiéndose tres clases en la sangre circulante, el neutrófilo, el basófilo y el eosinófilo.

La serie linfocítica tiene la siguiente secuencia de maduración: linfoblasto, prolinfocito y linfocito, de los que se distinguen el linfocito T y el B, según hayan recibido su capacitación funcional en el timo o en la bolsa de Fabricio o equivalente, respectivamente.

La serie trombocítica se inicia con el megacarioblasto, continúa con el promegacariocito y culmina con el megacariocito que da origen a las plaquetas.

La serie eritrocítica, que se refiere a la secuencia de células de la eritropoyesis, se inicia con el proeritroblasto, sigue con el eritroblasto, normoblasto, y finaliza con el reticulocito o eritrocito.

Finalmente la serie monocítica (monocito-macrófago) presenta los estados de monoblasto, promonocito, monocito y macrófago, que se describen a continuación:

Monoblasto. Es una célula que no tiene motilidad, de 14 a 20 μ m de diámetro, de citoplasma basófilo o grisáceo cuando es teñido por técnicas convencionales como May-Grünwald-Giemsa. El gran núcleo, con ligera indentación y con cromatina fina y uno o dos nucleolos grandes. La microscopía electrónica revela retículo endoplásmico rugoso y ribosomas bien desarrolladas, pero un aparato de Golgi pequeño (Begemann 1974, Wintrobe et al 1981) y con capacidad de dividirse.

Promonocito. Es una célula mótil de 14 a 18 μ m de diámetro, con gran núcleo indentado, en el que se puede observar un nucleolo bajo el microscopio compuesto, su cromatina es más fina que la del monocito; su citoplasma presenta considerable basofilia, gránulos azurofílicos que no se observan al microscopio compuesto. Aparato de Golgi bien desarrollado, reacción peroxidasa positiva en la cisterna perinuclear, en el retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi. El promonocito es fagocíticamente activo, pero menos que el

monocito, y tiene asimismo menor contenido de lisosomas, menor número de receptores Fc y menor adherencia a superficies de vidrio y plástico cuando es cultivado in vitro (Territo and Cline 1977, Wintrobe et al 1981).

Monocito. Presente en la sangre periférica, con un diámetro que oscila entre 14 y 20 μm , con un gran núcleo central de forma oval y algo indentada aproximándose a la forma de riñón; citoplasma azul gris o azul claro con granulaciones azurófilas (azul-rojizas), y con grado variable de vacuolización. En el núcleo se presenta cromatina periférica granular densa, y los nucleolos no suelen ser visibles; tiene un aparato de Golgi bien desarrollado, siempre situado en la indentación del núcleo (Wintrobe et al 1981). Esta célula tiene cierta capacidad para dividirse, pero menor que la del promonocito. Funcionalmente, el monocito puede ser reconocido por sus propiedades citoquímicas (enzimáticas), su capacidad fagocítica, quimiotaxis, y sus propiedades de adherencia y extendimiento. Dentro de las propiedades citoquímicas cabe destacar su actividad peroxidasa positiva en algunos de sus gránulos, actividad estearasa positiva inespecífica --pues poseen enzimas que catalizan reacciones del tipo $\text{R-COOR}' + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{RCOOH} + \text{R}'\text{OH}$ --, producen y contienen lisozimas que pueden secretarla al medio y presentan reacciones ácido fosfatasa fuertemente positivas (Wintrobe et al 1981).

Macrófago. Se trata de la misma célula monocítica de la sangre periférica, que se convierte en macrófago cuando entra en los tejidos. Esta célula posee cualitativamente similar actividad enzimática a la de los monocitos; cuantitativamente y en términos gene

rales, la actividad es mayor en macrófagos que en monocitos pues ésta tiende a aumentar con el estado de diferenciación (Wintrobe et al 1981), aunque hay un número de factores que participan, y -- que se detallan en otra sección (III D).

C. FUNCIONES GENERALES DE LOS MACROFAGOS.

Los macrófagos constituyen un grupo diverso de monocitos involucrados en muchos papeles de la inmunidad, tanto específicos, como no específicos. Numerosas investigaciones han demostrado que la interacción de los macrófagos con los linfocitos es un evento importante en la inducción y regulación de la respuesta inmune in vivo e in vitro (Unanue and Calderon 1975).

Los macrófagos son necesarios como mediadores para la activación antígeno-específico de los linfocitos T, así como para su proliferación (Rosenthal et al 1978) y es claro que el reconocimiento de antígenos proteicos solubles por el linfocito T está usualmente precedido por un consumo inicial del antígeno por los macrófagos - (Waldron et al 1973, Basten and Mitchell 1976, Lohmann et al 1982). La relación macrófago-linfocito puede ocurrir directamente por interacción célula-célula (Rosenthal et al 1975, Rosenthal et al --- 1978) o vía secreción del antígeno complejado o productos citofílicos solubles del macrófago para el linfocito (Rosenthal et al 1975, Oppenheim and Seeger 1976, Pierce and Kapp 1976, Friedman 1978, Rosenthal et al 1978, Unanue 1978).

Se ha enfatizado también la importancia del macrófago en la inmunovigilancia (Evans and Alexander 1976, Keller 1976, Adams and

Snyderman 1979); en algunas circunstancias, los macrófagos y monocitos pueden actuar como células supresoras (Stobo 1977, Stout and Fisher 1983) o como célula accesoria (Klinkert et al 1982); los macrófagos activados tienen la capacidad de destruir células tumorales in vitro (Lee and Berry 1977, Russell et al 1977, Kaplan et al 1978, Nathan et al 1980). Los macrófagos humanos han demostrado repetidas veces ser mediadores anticuerpo dependientes de la citotoxicidad celular para varias células blanco de la sangre (McDonald et al 1975, Norris et al 1979, Marino et al 1981).

Los macrófagos secretan un producto de 35 000 a 40 000 daltones que induce a la maduración funcional de timocitos in vitro, molécula que es llamada Factor Diferenciador de Timocitos (Beller -- and Unanue 1977). Este factor actúa sobre timocitos inmaduros para transformarlos a timocitos maduros induciéndoles algunas características estructurales y funcionales in vitro (Beller et al 1978).

Otras funciones de los macrófagos no directamente relacionados a la respuesta inmune son: su importante papel en el metabolismo del hierro (Friedman 1978); la habilidad de los macrófagos para matar directamente bacterias (actividad bactericida) in vivo e in vitro, así como inhabilitar su crecimiento (actividad bacteriostática) (Rowley 1962).

Recientemente se le ha dado importancia al papel del macrófago como una célula activamente secretora. A través de sus secreciones y sus receptores, el macrófago participa en complejas interacciones implicando componentes celulares y humorales de las redes inflamatorias e inmunológicas, así como también sustancias no bien

caracterizadas que pueden mediar o modular el tejido dañado y repararlo (Unanue and Cerrotini 1970, Gordon et al 1975, Leibovich and Roos 1975, Davies and Allison 1976). Dentro de los productos de secreción de los macrófagos se pueden citar : enzimas, componentes del complemento, proteínas de enlace, factores quimiotácticos, factores promotores de la proliferación y diferenciación de linfocitos, etc. (Nathan et al 1980, ver Apéndice IV).

A continuación se da una explicación más detallada de las tres características del macrófago que son de interés en el presente trabajo.

1. Fagocitosis.

La fagocitosis es considerada como la actividad funcional principal de los macrófagos, e importante para el consumo, localización y procesamiento de antígenos.

La endocitosis es un término general que engloba a los de pinocitosis y fagocitosis, dos actividades que el macrófago realiza y que son de suma importancia en la defensa del organismo (Weissman and Dukor 1970).

Si se hace la diferencia entre fagocitosis y pinocitosis, se encontrará que la fagocitosis comprende la adherencia, ingestión y destrucción de las partículas sólidas, tales como bacterias, células y restos de células, y energéticamente, se desarrollan a base de un metabolismo por glicolisis, en tanto que la pinocitosis se refiere a la ingestión de partículas pequeñas, como las macromoléculas, y resulta inhibida en condiciones anaeróbicas y requiere por tanto del ciclo del ácido tricarboxílico y la fosforilación

oxidativa (Wintrobe et al 1991).

El proceso de fagocitosis de microorganismos involucra un número de etapas. La primera es la movilización de las células al área de inflamación a lo largo de un gradiente de concentración de factores quimiotácticos producidos como una consecuencia de reacciones inmunológicas o tejido dañado (Snyderman et al 1971).

La ingestión del microorganismo es la segunda etapa en el proceso. La opsonización, o recubrimiento de la superficie de la partícula con inmunoglobulina (Ig) y/o complemento, es requerida para la unión de muchos microorganismos a la superficie de la célula fagocítica (Holland et al 1972). Esta unión es facilitada por la presencia de receptores para la porción Fc de la molécula de IgG y receptores para C₃ sobre la superficie del fagocito mononuclear. En el ratón, tales receptores de superficie hacen su aparición en el estado de promonocito; en el hombre, dichos receptores se han desarrollado en el estado de monocito. En ambas especies, los receptores reconocen sólo algunas de las subclases de IgG (Cline et al 1972).

Después de la unión de la partícula opsonizada, la membrana y citoplasma celular se invaginan y engloban la partícula, formando así una vacuola fagocítica dentro del citoplasma de la célula. La membrana de la vacuola fagocítica se fusiona entonces con las membranas de los lisosomas asociados. Estos descargan su contenido enzimático en la vacuola fagocítica en el proceso de desgranulación. En el neutrófilo, y probablemente en el fagocito mononuclear el pH desciende abruptamente en el interior de la vacuola fagocítica con

comitantemente con el proceso de desgranulación.

El sistema fagocito mononuclear proporciona un sistema de defensa preciso para el tejido contra una variedad de microorganismos. El neutrófilo constituye la unidad primaria de defensa contra organismos pirogénicos, tales como el estafilococo y neumococo y al macrófago como una unidad de defensa celular contra organismos intracelulares como el bacilo de la tuberculosis y de la lepra --- (Territo and Cline 1976). Los estudios de microscopía electrónica indican que la muerte bacteriana se realiza extracelularmente. La degradación inicial de las bacterias se efectúa dentro de los 5 -- primeros minutos y la lisis es completa a los 25 a 30 minutos. La fagocitosis de las bacterias lisadas es máxima después de 25 a 30 minutos (Biggar and Sturgess 1977).

2. Receptores Fc.

La secuencia de maduración de las células incluye diversos tipos celulares intermedios hasta llegar a especializarse. Durante el trayecto, la célula va adquiriendo diferentes receptores en la membrana (Lotem and Sachs 1974, Rabelino and Metcalf 1975).

Entre los diferentes tipos de receptores en los macrófagos se incluyen receptores para sitios enlazantes no específicos para --- agregados proteínicos (Steinman and Cohn 1972) receptores de linfocina (v.gr. para MIF y MSF, Fox et al 1974), receptores para linfocitos T (Binz and Wigzell 1981), para linfocitos B y T (Rosen -- thal and Shevach 1973), receptores C₃ y varios receptores Fc (Umanue 1972).

La formación de receptores Fc puede ser inducida por el MGI -

(Macrophage and Granulocyte Inducer, Sachs 1975) y constituye una herramienta potencial que pueda ser utilizada para distinguir las diferentes poblaciones de leucocitos en virtud de que aparecen según el grado de maduración y tipo celular, y pueden ser detectados mediante la formación de rosetas con Ea o con EAC (eritrocitos recubiertos de anticuerpo-complemento, Lotem and Sachs 1974, Sachs - 1975).

Los receptores Fc se han encontrado en células infectadas por virus herpes (Watkins 1964), en mastocitos (Tigelaar et al 1971) y en muchas células diferentes del tejido hematopoyético incluyendo linfocitos B y T, macrófagos, neutrófilos y células K, así como muchas células no involucradas en el sistema inmune (Heusser et al - 1977). El papel que estos receptores juegan en la fisiología de estas células no ha sido definido en todas las clases de células, pero para el macrófago y para el PMN este receptor funciona, al me--nos en parte, en el reconocimiento e ingestión de complejos inmu--nes (Unkeless 1977), clases específicas de receptores Fc pueden jugar un papel en la regulación de la síntesis de clases específicas de inmunoglobulinas (Arnaud-Battandier et al 1980), la región Fc - de la molécula de IgG humana se requiere para la fagocitosis efi--ciente de estafilococcus proteína M positiva (Fischette 1983). Existen también receptores Fc para la IgE en granulocitos basófilos y mastocitos (Ishizaka and Ishizaka 1978) en linfocitos y monocitos de sangre periférica humana (Molewicz et al 1982).

Son ahora muy conocidas clases específicas de receptores Fc - sobre células derivadas de varias poblaciones linfoides (Strober - et al 1978, Stafford and Fanger 1980). Por ejemplo, Arnaud-Battan-

dier et al (1980) demostraron que las células que transportan receptores IgA-Fc, son encontradas en todos los órganos linfoides -- con tejido linfoide asociado al intestino.

Otros estudios han demostrado diferencias en la especificidad para las subclases de IgG y el grado de polimerización de la inmunoglobulina capaz de enlazarse al receptor (Heusser et al 1977, Unkeless 1977). Por ejemplo, Anderson y Abraham (1980) reportaron -- que en monocitos normales de la línea U937, el receptor Fc, enlaza más fácilmente la IgG 1 e IgG 3, menos rápidamente la IgG 4 y menos todavía la IgG 2. Por su parte Alexander et al (1978), establece el mismo orden según la constante de asociación de la inmunoglobulina al receptor Fc de monocitos de sangre periférica de humano (IgG 1 IgG 3 IgG 4 IgG 2). Existen también diferencias en la sensibilidad a la tripsinización de los receptores de la membrana celular (Heusser et al 1977, Unkeless 1977) y diferentes susceptibilidades a la tripsinización en los receptores Fc para diferentes inmunoglobulinas, así por ejemplo Anderson y Spiegelberg (1981), -- encontraron que los receptores Fc para la IgE son más sensibles -- que los receptores para la IgG. Lo anterior pone en evidencia la -- existencia de varios receptores, tanto para diferentes inmunoglobulina, de este modo, se reporta la existencia de dos diferentes receptores Fc para la IgG (Anderson and Grey 1978, Haeffner-Cavai -- llon et al 1979), que incluso se han separado una de la otra por -- medio de sus afinidades cromatográficas y por gradientes de centri -- fugación de sacarosa, después de la solubilización de la membrana de la célula con detergente o zonificación (Anderson and Grey 1978).

El análisis de los receptores de membrana sobre leucocitos ha

sido de gran valor en la caracterización de los tipos de células involucrados en diferentes procesos inmunes. Los linfocitos por ejemplo han sido identificados y clasificados en base a sus marcadores de superficie y propiedades funcionales, de igual forma se han identificado leucocitos polimorfonucleares, monocitos, y macrófagos. Sin embargo una clara definición de los receptores sobre estas células se ha dificultado por los problemas de separación de poblaciones puras de neutrófilos, basófilos, eosinófilos y por el bajo número de monocitos en sangre periférica.

3. Lisozima.

En 1922, Alexander Fleming descubrió "un notable elemento bacteriostático en tejidos y secreciones" y lo llamó lisozima (muramidasa). Actualmente se sabe que los leucocitos, especialmente los PMN y los macrófagos elaboran esta enzima (Klockars and Reitamo 1975, Afzal Mir 1977).

Estudios recientes han establecido que la lisozima constituye el principal producto de secreción del macrófago (aproximadamente el 25% de toda su proteína extracelular), la cual es producida continuamente y a un grado notablemente constante por todos los tipos de macrófagos en cultivo (Gordon et al, 1974).

La lisozima del macrófago tiene las siguientes características: Es una enzima mucolítica con propiedades antibióticas, la cual hidroliza ciertos enlaces en las paredes celulares bacterianas (Imoto et al 1972), también actúa sobre la quitina. Esta proteína es básica, de bajo peso molecular (14 000 Daltones), estable a pH ácido, lábil a pH alcalino, con carga catiónica (Gordon et al

1974).

Las investigaciones de Gordon et al (1974) realizadas con lisozima de macrófagos peritoneales de ratón in vitro han revelado - que: La lisozima es una enzima constitutiva del macrófago (la secreción de esta enzima no es afectada por tratamientos que se saben activan a las células) mientras que otras enzimas son inducibles. La secreción de lisozima está asociada con una síntesis neta sustancial, una concentración intracelular relativamente constante, acumulación continuada en el medio (86% según Gee et al 1980) y es escasamente detectable dentro de las células. Existe una relación directamente proporcional entre el número de macrófagos por caja - petri y la cantidad de enzima secretada, por lo tanto el contenido de lisozima es una medida útil del número de macrófagos y la densidad celular no tiene efecto sobre su producción.

Resumiendo brevemente, las funciones de los macrófagos son -- (Friedman 1978):

in vivo

- Fagocitosis de partículas y/o sustancias solubles, complejos antígeno-anticuerpo, etc.
- Consumo, localización y procesamiento de antígenos.
- Degradación de partículas y antígenos.
- Síntesis y secreción de factores tales como sustancias inmunorreguladoras, enzimas, activadores de plasminógeno, quiniⁿas, interferón, etc.
- Actividad microbicida y bacteriostática.
- Protección y/o potenciación de infecciones por parásitos intracelulares.

in vitro

- Fagocitosis de antígenos particulados y sustancias, complejos antígeno-anticuerpo, etc.
- Consumo y degradación de antígenos.
- Citotoxicidad no específica.
- Actividad microbicida, tumoricida, bacteriostática.
- Citotoxicidad anticuerpo específica; síntesis y liberación de quininas, incluyendo inhibidores y estimuladores.
- Actividad alimentadora para otras células, especialmente linfocitos.
- Liberación de enzimas, incluyendo colagenasa, enzimas lisosomales, nucleasa, etc.

D. HETEROGENEIDAD FUNCIONAL DE LOS MACROFAGOS.

Los macrófagos son un grupo de monocitos funcionalmente heterogéneos involucrados en muchos papeles específicos y no específicos de la inmunidad (Friedman 1978). Estas células pueden ser renovadas y estimuladas a un alto grado de actividad metabólica (Hopper et al 1979), las actividades y modos de operar de éstas están influenciadas por factores tales como el estado de madurez o diferenciación, localización anatómica y del grado de activación (Cohn 1968, Hopper et al 1979).

La heterogeneidad funcional de este grupo de células varía de un sitio a otro y resulta de influencias locales, v. gr. pulmón, cavidad peritoneal, bazo, etc; o dentro de una misma población y surge debido a diferentes estados de diferenciación, maduración, -

activación o posiblemente a que provienen de distintas líneas celulares (Rice and Fishman 1974, Walker 1976, Hopper et al 1979, Lee et al 1981).

Existen varios órganos fuente de los macrófagos y los macrófagos obtenidos de cada una de estas presentan diferencias funcionales v.gr. los macrófagos alveolares y peritoneales difieren en muchas propiedades incluyendo metabolismo, los primeros tienen metabolismo por fosforilación oxidativa más que un metabolismo a base de glicólisis (Karnovsky et al 1970), las dos poblaciones son morfológicamente distintas (Bennett 1966), el contenido de enzimas lisosomales de los alveolares es generalmente más alto que el de los peritoneales (Pavillar 1963, Weissman and Dukon 1970) y de enzimas hidrolíticas cuyos niveles son altos para los alveolares y bajos en peritoneales (Leake et al 1964, Karnovsky et al 1970), existen diferencias en respuesta a estímulos quimiotácticos (Ward 1968, Sorkin et al 1970), difieren en receptores de membrana para la migración del factor de inhibición (Leu et al 1972). Los receptores Fc en los alveolares es bajo y en peritoneales alto (Rhodes 1975). Asimismo, la proporción de macrófagos que producen C_2 , C_4 y factor B, varía en diferentes órganos fuente, lo cual sugiere que estas diferencias en la capacidad de biosíntesis de C, caracteriza a los fagocitos mononucleares a diferentes estados de maduración, pues la secreción a tasas características difieren de su precursor celular común, el monocito de la sangre (Cole et al 1982a, Cole et al 1982b, Alpart et al 1983, Newell and Atkinson 1983).

Dentro de una misma población, los macrófagos difieren funcionalmente. Normalmente, los macrófagos de la cavidad peritoneal son

muy heterogéneos (Walker 1971, Rice and Fishman 1974, Walker 1974, Thomas and McCsween 1981), con respecto al tamaño celular (Rice and Fishman 1974), densidad de receptores Fc (Rhodes 1975), y habilidad fagocítica (Zembala and Asherson 1970, Rice and Fishman 1974).

Como se ha dicho, esta heterogeneidad local en mucho se debe al grado de actividad. La designación de macrófago activado, describe el estado de los macrófagos que tienen una incrementada habilidad para fagocitar microorganismos y ejercer una actividad antimicrobial (Karnovsky et al 1975, Karnovsky and Lazdins 1978, North 1978). Cabe resaltar que en realidad depende del grado y la naturaleza de la estimulación la capacidad antitumoral, antimicrobial y secretoria del macrófago (Hopper et al 1979).

Existen diferencias entre una célula normal y una activada, entre éstas destacan principalmente su morfología, química celular, atributos bioquímicos y atributos funcionales. Las células activadas tienen actividades incrementadas de ácido hidrolasa (Hard 1970) y manifiestan durante la fagocitosis gran actividad respiratoria (Karnovsky et al 1975), metabolizan la glucosa (Karnovsky et al 1975, Riisgaard et al 1977), a nivel de la membrana celular alto contenido de fosfolípidos (Kondo and Kanai 1977), mientras la ecto-5-nucleotidasa disminuye (Karnovsky et al 1975).

En resumen, las propiedades de los macrófagos activados son las siguientes:

Incrementos Morfológicos en:

Adhesividad, extendimiento

Gránulos citoplásmicos

Membrana ondulada

Incrementos Bioquímicos en:

Adenilciclasa

Oxidación de la glucosa

Afluencia de calcio

Toma de glucosa

Varios enzimas lisosomales

Liberación de enzimas lisosomales

Lisozima

Colagenasa

Elastasa

Producción de activador de plasminógeno

Producción de Prostaglandina

Incrementos Funcionales en:

Pinocitosis

Actividad microbial intracelular

Efectos citotóxicos sobre células tumorales

E. SEPARACION DE CELULAS EN SUBPOBLACIONES.

Dada la heterogeneidad funcional que se les atribuye a los macrófagos y habiéndose detectado la existencia de subpoblaciones -- funcionalmente distintas (Rice and Fishman 1974, Hopper et al 1979, Lee 1980, Lee et al 1981), en los últimos años, el principal impetu para diseñar procedimientos de separación de células ha sido debido a que el tejido hematopoyético y linfoide es una mezcla compleja de células, y los métodos de aislamiento son indispensables

cuando se desea estudiar una población individual o un tipo celular particular para poder:

- Conocer y desglosar el proceso de diferenciación celular, - en particular en el desarrollo de los elementos de la sangre (a partir de las células madre hematopoyéticas).
- Conocer los mecanismos de interrelaciones de los linfocitos B y T con el macrófago durante la respuesta inmune.
- Conocer el papel del macrófago dentro de la respuesta inmune.
- Hacer factible la caracterización morfológica, citológica y funcional de cada tipo celular.
- Definir nuevas clases funcionales de células.
- Crear líneas celulares puras que permitan obtener medios enriquecidos de factores solubles que elaboran en pequeñas cantidades, de modo que sea posible su caracterización bioquímica.
- Obtener preparaciones enriquecidas de células de la serie monocito-macrófago, dado que estas líneas representan una minoría del 'pool' de células mononucleares.
- En otros estudios el interés es el de obtener información - concerniente a parámetros bioquímicos asociados a funciones particulares de las células, como puede ser la quimiotaxis, fagocitosis, adherencia, citotoxicidad anticuerpo-dependiente, así como las actividades de varias enzimas intracelulares.

Se han propuesto varias técnicas para la fraccionación de los macrófagos, todas ellas tienen como finalidad la separación de po-

blaciones o subpoblaciones con alto grado de pureza, viables, con un mínimo de alteración funcional y morfológica, y con un elevado porcentaje de recuperación total.

Una propiedad de los macrófagos que ha sido aprovechada para la obtención de poblaciones homogéneas, es su capacidad de adherencia a las cajas petri de cultivo de vidrio y plástico (Edelson and Cohn 1976, Territo and Cline 1977, Ackerman and Douglas 1978, Kumagai et al 1979, Wood et al 1979, Treves et al 1980, Schonhegrad -- and Hold 1981, Winter et al 1981, Zanella et al 1981).

La purificación por adherencia implica que los monocitos tienen que ser separados antes de ser utilizados en varios ensayos. Se ha demostrado que los procedimientos de despegadura pueden alterar características de la superficie y propiedades funcionales de las células, por otro lado, estas técnicas tienen inconvenientes -- tales como recuperación y viabilidad de las células variable (Zanella et al 1981).

Otras técnicas comunmente empleadas son la electroforesis y -- la filtración (Brandt et al 1962, Rabinowitz 1964, Shortman 1966).

De los métodos desarrollados para hacer la separación de los distintos tipos de células, los más completos y que han conducido a mejores resultados son los que se han efectuado por centrifugación sobre gradientes de densidad, aprovechando el tamaño y densidad de las células. Las diferencias en la tasa de sedimentación de las distintas poblaciones de células se ha utilizado para fraccionarlas. Teóricamente esta tasa de sedimentación está regida por la ley de Stokes y es función tanto del tamaño como de la densidad ce

lular y forma (Shortman 1972, Hardin and Downs 1981), pero depende primordialmente del tamaño (Gorczyński et al 1970, Day 1972, Shortman 1972).

La expresión algebraica que describe la velocidad de sedimentación de las células en este caso es la siguiente:

$$v = \frac{r^2 (c - 1)}{18 Z} \times g,$$

donde r es el radio de la célula, c es la densidad de la célula, 1 la densidad del medio líquido, g la fuerza de la gravedad en el lugar y Z la viscosidad del líquido.

Por medio de los gradientes de densidad, se han separado, la diversidad de células de la sangre humana (Ordina et al 1973), linfocitos de la sangre periférica humana (Loos and Roos 1974, Schut et al 1978, Bont et al 1979, Ulmer and Flad 1979, Fiege et al 1982), células de exudado peritoneal (Gorczyński et al 1970, Zembla and Asherson 1970, McCarthy and MacVittie 1978), células formadoras de colonias de la médula ósea (McCarthy and MacVittie 1978), macrófagos de la sangre periférica humana (Bont et al 1979, Ulmer and Flad 1979, Fluks 1981, Ferrante and Thong 1982), granulocitos de sangre periférica humana (Day 1972, Ferrante and Thong 1982), etc.

Varios materiales se han utilizado para la producción de gradientes de densidad, tanto continuos como discontinuos, que permitan una fraccionación de las células y que aporten subpoblaciones homogéneas de manera que sea factible su caracterización morfológica, citológica y funcional; entre los materiales que más se han utilizado están la Goma Acacia (Kinoshita et al 1970), Renografin

(Grodina et al 1973), Albúmina (Möller and Hiesche 1970, Shortman - 1972, Williams et al 1972, Rice and Fishman 1974, Klinkert et al - 1982), Ficoll (Bach and Brashler 1970, Gorczynski et al 1970, Zem- bala and Asherson 1970, Walker 1974, Bont et al 1979, Nardiello -- et al 1981), y Ficoll Hypaque (Day 1972, Ferrante and Thong 1982). Sin embargo, ninguno de estos materiales está completamente fuera de desventajas, algunos de estos tienen muy alta viscosidad (Bach and Brashler 1970, Gorczynski et al 1970, Kinoshita et al 1970, -- Shortman 1972, Williams et al 1972), o causan agregación de las cé- lulas (Gorczynski et al 1970, Shortman 1972, Williams et al 1972), otros no son isotónicos en todas partes del gradiente (Bach and -- Brashler 1970, Gorczynski et al 1970, Grodina et al 1970), otros co- mo la Albúmina tienen amplia variación en su osmolaridad entre es- pecies diferentes y entre individuos de la misma especie (Shortman 1972, Williams et al 1972). Otras ventajas y desventajas de los ma- teriales se resumen en el Apéndice V.

La importancia de mantener condiciones adecuadas durante la - separación de las células, se demuestra fácilmente debido a los -- grandes cambios de la densidad de la célula por materiales no iso- tónicos (Williams et al 1972) o con gradientes de pH no fisiológi- co (Williams and Shortman 1972).

El Percoll es un material basado en sílica coloidal que por - sus propiedades fué seleccionado para la fraccionación de las célu- las en el presente trabajo:

- Es un medio de densidad inicial de 1.130 ± 0.005 g/ml, con propiedades químicas constantes entre lotes diferentes.
- No es tóxico (por estar recubierto de polivinilpirrolidone)

permitiendo la fraccionación de las células sin pérdida en la viabilidad.

- Tiene baja osmolaridad (20 mOs/Kg H₂O) que permite un ajuste preciso a condiciones fisiológicas sin interferencia significativa del medio.
- Baja viscosidad (10 ± 5 cP) permitiendo el uso de gradientes hasta 1.2 g/ml y también resultando en una formación rápida del gradiente.
- Impermeable a las membranas biológicas permitiendo una precisa determinación de la densidad, y eliminación fácil del medio para recuperar el material.
- Forma gradientes espontáneos durante la centrifugación debido a que hay un tamaño heterogeneo de las partículas de Percoll con diferentes tasas de sedimentación en un campo gravitacional.
- Por su pH de 8.8 ± 0.3 y su baja capacidad de amortiguamiento, el pH puede ser fácilmente ajustado entre 5 y 10, sin cambio en sus propiedades físicas.

A continuación se resumen brevemente algunos estudios realizados para obtener poblaciones celulares homogéneas y que brindan un panorama concreto sobre los avances logrados al respecto.

Wood et al (1979) demostró que las concentraciones bajas de EDTA (10^{-3} M) permiten la remoción de macrófagos peritoneales de la superficie de plástico, reportando un estado viable de las células. Este método proporcionó un rendimiento de aproximadamente un 31 a 34% con un grado de pureza de 99%.

Komagai et al (1979) en su experimento aislaron macrófagos mediante pretratamiento de las cajas Petri con 2 a 3 ml de suero fetal de becerro (FCS). Ellos utilizaron aproximadamente 4×10^6 células de exudado peritoneal de ratón o bien 1×10^7 de sangre periférica humana por caja. Las células adherentes fueron removidas con solución amortiguadora de fosfato (PBS) conteniendo 0.2% de EDTA y 5% de FCS. Se reporta un porcentaje de recuperación de 59% para macrófagos peritoneales de ratón pero no se indica su viabilidad, y un grado de pureza mayor al 95%.

Ackerman y Douglas (1978) purificaron monocitos de sangre periférica de humano mediante la adición alternada de medio y EDTA, encontrando que las células pueden soportar al menos tres ciclos de pegadura y despegadura. La incubación fué a 37°C durante 15 min en el EDTA (3ml), pero 10 min es suficiente. El porcentaje de recuperación de las células fué de 80% cuando 10×10^6 ó menos monocitos son aplicados a los frascos, y la viabilidad mayor de 95%.

Traves et al (1980) aislaron monocitos de sangre periférica humana aprovechando su capacidad de adherencia, las células adherentes contenían 1 a 4% de linfocitos y aproximadamente 95% de monocitos y fueron removidas con PBS libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} en tubos de polialómero, que fueron necesarios para evitar la adherencia de los monocitos. El porcentaje de recuperación de los monocitos tuvo un valor promedio de 81.9% con un rango de 60 a 100% del total de células monocíticas adherentes de los diferentes donadores. Las células aisladas fueron muy activas en varias pruebas.

Schon-Hegran y Holt (1981) en cajas Petri recubiertas durante

La noche con FCS inactivado a calor, cultivaron células de exudado peritoneal de ratón. Después de eliminar las células no adherentes por lavado, las células adherentes fueron separadas con 5 ml de solución salina libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} conteniendo 0.02% de EDTA e incubadas a 37°C durante 20 min, después del cual se removieron con una pipeta Pasteur resuspendiendo vigorosamente. Las células recuperadas fueron completamente viables y la población contenía mayor o igual al 82% de las células totales, las cuales fueron activamente fagocíticas, pinocíticas y esterasea positivas y parecen representar una población de macrófagos de alta pureza.

Zanella et al (1981) aprovechando también la propiedad de adherencia, aislaron monocitos de sangre periférica humana con linocaína, a pH de 6.7, y compararon sus resultados con los siguientes métodos desarrollados paralelamente por ellos mismos: raspado mecánico con gendarme de goma, superficies recubiertas con microexudado, y superficies pretratadas con FCS. Encontraron que los cuatro métodos dan resultados de viabilidad y porcentaje de recuperación similares, excepto que el raspado con gendarme resultó con una viabilidad no satisfactoria. Para el método de la linocaína el porcentaje de recuperación fué de 48 ± 35 y la viabilidad de $88 \pm 3.8\%$.

Kinoshita et al (1970) utilizando como medio de separación la Goma Acacia con gravedades específicas de 1.072, 1.068 y 1.064 del fondo del tubo a la superficie, respectivamente. La suspensión de las células fué puesta en el gradiente así formado y centrifugado a 3000 rpm (aproximadamente 2000 g) durante 15 min, obteniendo cuatro bandas formadas en las interfases y en el fondo del tubo, las bandas formadas en las interfases fueron clasificadas citológica-

mente como linfocitos grandes, medianos y pequeños, la fracción --
cuatro consistió en su mayoría de eritrocitos.

Ordina et al (1973) trabajaron con gradientes de Renografin -
logrando separar bandas relativamente puras de eritrocitos, granu-
locitos, y leucocitos no granulares. Las densidades a las cuales -
fueron detenidas las células son: monocitos 1.128 g/cc, linfocitos
1.129 g/cc, eritrocitos 1.151 g/cc, neutrófilos 1.161 g/cc, eosinó-
filos 1.169 g/cc y basófilos 1.173 g/cc. Las poblaciones de célu-
las recuperadas consistió de 1.4% de monocitos, 25% de linfocitos,
68.6% de neutrófilos, 3.7% de eosinófilos, 0.6% de basófilos y ---
0.7% de células no identificadas. Reportan células intactas des---
pués de la centrifugación a 10 000 rpm (aproximadamente 13 000 g)
y una recuperación del 85% del total de células. La viabilidad fué
constatada en azul de tripano, siendo superior o igual al 96%.

Müller and Hiesche (1970) por medio de gradientes de Albúmina
separaron células del bazo de ratón centrifugando a 20 000 g duran-
te 40 min. Los gradientes estuvieron formados por 1 ml. de cada con-
centración de Albúmina (29, 26, 23 y 10%) secuencialmente. Las cé-
lulas se retuvieron en la interfase de cada concentración y la dis-
tribución obtenida fué: células plasmáticas en la fracción 1 y 2,
linfocitos en todas las fracciones, granulocitos en las fracciones
2 a 4, eritrocitos en las 4 y 5 y blastocitos en las fracciones 1
a 4.

Gorczynski et al (1970) utilizaron el Ficoll en la elaboración
de un gradiente de densidad con pH de 7.2 para separar células del
bazo, centrifugando el conjunto a 3 800 g. En tales gradientes la

banda de células productoras de anticuerpos se localiza en un solo pico que se forma a una densidad de 1.070 g/cc. Encontraron que el pH y la creación de un gradiente inverso afecta el perfil de densidad. Si se abate el pH a 5.5, disminuye su densidad flotante a --- 1.062 g/cc y la variación de la osmolaridad es de 294 m-osmolal en superficie a 286 m-osmolal en el fondo dividiendo el pico único de células en tres distintos picos. No se reporta el porcentaje de recuperación pero sí células viables.

Zambala and Asherson (1970) purificaron macrófagos a partir de exudado peritoneal de ratón y obtuvieron las células con aproximadamente un 99% de pureza y un porcentaje de recuperación de 50% aproximadamente, a partir de 10^8 células, las cuales fueron resuspendidas en 4 ml de Ficoll al 25% en solución salina 'buffer'. Las células fueron puestas sobre el gradiente integrado por 6 ml al -- 21%, 5 ml al 16% y 4 ml al 12% de solución de Ficoll, centrifugado a 20 000 g máximo durante 70 min con refrigeración. Las células se retuvieron en las interfases y en la fracción de depósito, reportando 95% de viabilidad después de la centrifugación.

Bach and Brashler (1970) por medio de gradientes preformados de Ficoll, aislaron células linfocíticas de distintos órganos linfoides. Los gradientes se centrifugaron a 20 000 g (13 500 rpm) durante una hora. Para el caso del bazo obtuvieron hasta 30 subfracciones discretas de células, el número relativo de células en cada banda es una propiedad de las suspensiones preparadas, del tipo de tejido u órgano y de algunas ratas individuales. Los valores varían de animal a animal y de un tejido linfoide a otro en el mismo animal.

Walker (1974) trabajando con células adherentes de exudado peritoneal de conejo, libres de otros tipos de células excepto linfocitos, logró separarlas en cinco poblaciones en gradientes discontinuos de Ficoll, formados por sobreposición de capas de 10, 9, 8 y 5% de Ficoll. De las cinco subclases obtenidas, los macrófagos comprendieron más del 95% de las células en las dos subclases de densidad menor, más del 90% de las células en las subclases de densidad intermedia y aproximadamente 80% de las células en la subclase más densa. La contaminación para todos los casos estuvo representada por linfocitos. El porcentaje de recuperación fué de 68% y no se reporta la viabilidad de las células.

Day (1972) utilizó gradientes de Ficoll-Hypaque de una densidad de 1.065 g/cc a 20°C para separar leucocitos basófilos de sangre periférica de humano, la tasa de recuperación fué de 74% y con un grado de pureza de 95% y 95% de viabilidad. El número de células introducidas al gradiente fué no mayor de 2×10^8 y los gradientes se centrifugaron a 3 800 g durante 30 min. a 40°C.

Hardin and Downs (1981) aislaron monocitos de sangre periférica humana. Primero se aislaron las células mononucleares en gradientes de Ficoll-Hypaque, y después estos monocitos se purificaron por sedimentación durante 5 min a través de gradientes de Percoll reorientados. El método es reproducible y la recuperación fué de 50% de monocitos de la sangre inicial, con contaminación únicamente por linfocitos. Los monocitos recuperados son viables (95%) y funcionales, pues se adhirieron a las superficies de vidrio y plástico e ingirieron partículas de latex.

Schut et al. (1978) trabajaron con gradientes de densidad de Ficoll-Isopaque, para separar linfocitos humanos, logrando fraccionarlos en dos poblaciones cuyas densidades corresponden a menor de 1.067 g/cc y mayor de 1.067 g/cc. Su gradiente consistía en tres capas, de densidades de 1.095, 1.067 y 1.055 g/cc respectivamente, y la población de linfocitos estratificada fué no mayor de 12×10^6 . El gradiente se centrifugó a 2 200 g durante 10 min.

Bont et al. (1979) separaron en gradientes de Ficoll leucocitos mononucleares de una población inicial de 4 a 20×10^7 leucocitos. El promedio de recuperación fué de 85% y una viabilidad de más del 99%. Se obtuvieron 5 fracciones con proporciones variables de macrófagos-linfocitos, de las cuales, 3 estaban dominadas por linfocitos y 2 por macrófagos. La banda con mayor porcentaje de macrófagos contenía un 40% de éstas células.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Determinar experimentalmente si los macrófagos que migran a la cavidad peritoneal de ratón en respuesta a la inflamación inducida por inyección intraperitoneal de caseinato de sodio, pueden ser separados en subpoblaciones funcionalmente homogéneas, con un elevado grado de pureza, recuperación y viabilidad de las células, en base a sus características de adherencia y tasa de sedimentación.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.- Obtener la cinética de aparición de las células leucocíticas que migran a la cavidad peritoneal al inyectar un irritante.
- 2.- Idear un método que permita aislar subpoblaciones de macrófagos de las células obtenidas en la cavidad peritoneal.
- 3.- Caracterizar las subpoblaciones de macrófagos midiendo algunas de sus propiedades características (fagocitosis, producción de lisozima y capacidad para presentar receptores Fc en su membrana celular).

V. HIPOTESIS

Existe reportado en la literatura muchas evidencias de que los macrófagos son un tipo de células que desde el punto de vista funcional es muy heterogeneo, se reporta que estas diferen--cias funcionales se presentan tanto en la misma población como en células provenientes de distintos órganos fuente. Si los macrófagos son un conjunto de células funcionalmente heterogeneo compuesto por grupos de células con funciones específicas, en--tonces las funciones pueden ser separadas empleando métodos a--propiados, si es el mismo tipo de células, capaz de cumplir con todas las funciones que se les atribuyen, las funciones no se - pueden separar. Se propone separar a los macrófagos con propie--dades morfológicas y funcionales distintas, aprovechando su pro--piedad de adherencia, utilizando enzimas y quelantes o bien en base a su tasa de sedimentación, mediante centrifugación en gra--dientes de densidad, para finalmente caracterizar a las distin--tas fracciones obtenidas midiendo algunas de sus propiedades - más características.

VI. MATERIAL Y METODOS

A. DETERMINACION DE LA MEJOR RELACION TIEMPO-CONCENTRACION DE MACROFAGOS Y TIEMPO-CELULAS CULTIVADAS-CELULAS ADHERIDAS, EN RATONES ESTIMULADOS

Animales. Se utilizaron ratones machos de la cepa Wistar, de tres a cuatro meses de edad.

Obtención de las Células de la Cavidad Peritoneal. Para inducir el desarrollo de la respuesta inmunológica celular, a los animales les son inyectados en la cavidad peritoneal 3 ml de caseinato de sodio al 10% en solución amortiguadora de fosfato (PBS, ver Apéndice II) con una jeringa desechable de 5 ml. Los animales son sacrificados por dislocación cervical a diferentes tiempos (Tabla I) y las células son extraídas por lavado de la cavidad peritoneal con 15 ml de PBS. Las células son lavadas tres veces con PBS fresco y centrifugadas a 500 g durante 3 min. Finalmente se cuentan en un hemocitometro.

Preparación de los Frotis. Los frotis son preparados en citocentrífuga (Cytospin, Shandon Southern, U.S.A.), colocando con una pipeta Pasteur tres gotas de la suspensión de células y centrifugando a 1000 rpm durante 5 min. Las preparaciones secadas al aire son teñidas con May-Grünwald-Giemsa, y conteos diferenciales de células son entonces realizados.

A menos que se especifique lo contrario, siempre que se hable de tinciones en este trabajo, éstas se hacen con May-Grünwald-Giemsa.

Quantificación de las Células. Con la ayuda del microscopio compuesto, y con la lente 100 X, son identificados los distintos tipos de células en el frotis. Las proporciones de células aparecen registradas en la Tabla 1 y en la Gráfica 1.

Relación Células Cultivadas-Células Adheridas. Células extraídas a los 3, 4 y 5 días después de inyectado el irritante, se cultivan (ver Sec. VI B) con 1, 2, 4, 8, 16 y 32 X 10⁶ células/caja durante 24 hrs, después de las cuales se realiza un conteo de las células adheridas. Estos ensayos permitieron especificar el mejor tiempo (4 días) para efectuar la extracción de las células, y tener la mejor concentración células (8 X 10⁶ células/caja) en los experimentos posteriores (VI B y C). (Gráfica 2).

B. SEPARACION DE SUBPOBLACIONES DE MACROFAGOS POR ADHERENCIA

Cultivo de Células. Las células obtenidas de la cavidad peritoneal (Sec. VI A) son cultivadas utilizando como fuente de nutrientes el medio Eagle modificado, suplementado con 10% de suero de caballo, en cajas Petri de 5 ml a 37°C en un incubador Thelco de CO₂ con una atmósfera al 10% de CO₂ y 95% de humedad.

Preparación del Medio de Cultivo. El medio de cultivo seleccionado es el Eagle modificado (Gibco N. Y., N° Catalog. 430-2100 H-21 ver Apéndice I), y que se prepara en el laboratorio por disolución de un sobre en 950 ml de agua bidestilada, se añade 3.7 g de NaHCO₃, 3.8 g de glucosa (C₆H₁₂O₆), 100 000 U de penicilina G y 0.1 g de estreptomycin por recomendación de la Gibco; se afora a un litro y se almacena en refrigeración a 4°C hasta su uso. Antes

de ser almacenado, se aplica al medio una prueba de esterilidad --
adicionando seis gotas a un tubo de ensayo con 2 ml de caldo de so-
ya previamente esterilizado en autoclave. El medio Eagle así prepa-
rado es suplemento al momento de ser utilizado con 10% (v/v) de --
suero de caballo, inactivado en baño María a 56°C durante 30 min.

Obtención de las Células Adherentes. Cajas Patri con 8×10^6 --
células de la cavidad peritoneal son incubadas durante 24 hrs. Las
células no adherentes se remueven por medio de tres lavados sucesi-
vos con PBS. Las células adherentes así purificadas son sometidas
a alguno de los siguientes ensayos:

1. Tratamientos con Tripsina.

En el primer tratamiento, las células son incubadas en PBS --
normal, y 0.001 g de tripsina a 37°C simultáneamente a cajas con--
trol sin tripsina. Cuando se estima, mediante observación al mi --
croscopio, que al menos un 10% de las células se han separado de --
la superficie de la caja, se efectúa una primera separación, succio-
nando la suspensión de células con una pipeta y centrifugando a --
500 g. El líquido sobrenadante es decantado en la caja inicial pa-
ra continuar el proceso y efectuar las separaciones que sean posi-
bles. Las células separadas en cada caso, son lavadas y cultivadas
como se indicó más arriba. A continuación se presenta en forma de
cuadro los diferentes tratamientos realizados con tripsina, y en --
términos generales, se realizan en forma análoga al primer trata-
miento.

TRATAMIENTO	TEMPERATURA	SOLUCION	TRIPSINA (1 mg/caja)
1	37°	PBS normal	- +
2	37°	*PBS libre de Ca ⁺² y Mg ⁺²	- +
3	37°	Medio Eagle	- +
4	37°	Medio Eagle, con 10% suero	- +
5	25°	PBS normal	- +
6	25°	Medio Eagle	- +
7	25°	Medio Eagle, con 10% suero	- +
8	4°	PBS normal	- +
9	4°	Medio Eagle	- +
10	4°	Medio Eagle, con 10% suero	- +

- Sin tripsina

+ Con tripsina

* Bajo estas condiciones, se ensayaron además otras dos concentraciones de tripsina: 0.0005 y 0.00025 g.

2. Tratamientos con Colchicina.

Se realizó un ensayo preliminar para probar la citotoxicidad de la colchicina, añadiendo 5 $\mu\text{mol}/\text{caja}$ en PBS libre de Ca⁺² y Mg⁺² (Apéndice III), e incubando a 37°C. A los tiempos de 15 min, 1 hr, 2 hrs, 4hrs, 16hrs y 24 hrs, la colchicina es eliminada, y las células cultivadas durante 24 hrs para ser observado el grado de muerte celular en cada caso. Después de este ensayo preliminar se realizan los tratamientos especificados para el caso de la trip

sina, pero con colchicina, existiendo dos variantes: a) En el primer tratamiento se emplean, además de los 5 μmol de colchicina, -- 2 μmol /caja, y b) En el segundo tratamiento se adiciona simultaneamente tripsina, además de la colchicina, y por otro lado se adicionan no simultaneamente las dos sustancias (colchicina 5 μmol durante 1:15 hrs y 1 mg de tripsina durante 45 min.

3. Tratamientos con Proteasa.

Las células adherentes son incubadas a 37°C en PBS libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} y concentraciones variables de proteasa (0, 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} mg/caja). Observaciones al microscopio compuesto son hechas cada 15 min y registrado el estado de las células.

4. Tratamientos con Acido Etilendiamino Tetraacético (EDTA).

Se añade PBS libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} con 0.2% de EDTA a las cajas de cultivo con macrófagos adheridos. Las temperaturas empleadas son 37° , 27° y 4°C . Cada 20 min, durante 60 min, el EDTA es eliminado y las células cultivadas durante 24 hrs para ser observado el grado de muerte celular en cada caso.

5. Tratamientos con Temperaturas y Agitación.

Utilizando un baño de agitación mecánica (American Optical) y un recirculador de agua (tipo K2RD), las células en PBS libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} son mantenidas por 20 min a 3, 5, 10, 15 y 20°C , bajo agitación continua. Las cajas Petri se observan periódicamente al microscopio, registrando el porcentaje de células despegadas.

C. SEPARACION DE SUBPOBLACIONES DE MACROFAGOS POR GRADIENTE DE DENSIDAD

Preparación del Gradiente Discontinuo. La preparación de las diferentes densidades de Percoll se realiza como se muestra en el cuadro adjunto, siendo la solución final isotónica para todos los casos.

DENSIDAD (g/ml)	PERCOLL (%)	*SOLUCION SALINA (%)	AGUA (%)	+INDICE DE REFRACCION
1.125	90	10	0	1.3525
1.111	80	10	10	1.3505
1.095	70	10	20	1.3485
1.084	60	10	30	1.3460
1.070	50	10	40	1.3444
1.057	40	10	50	1.3425
1.043	30	10	60	1.3408
1.030	20	10	70	1.3388
1.017	10	10	80	1.3367

* Solución al 0.5% de NaCl

+ Medido a 20°C

El gradiente es preparado en tubos Corex de 15 ml, adicionando 1 ml de cada solución comenzando con la más densa (90% de Percoll) excepto la solución del 10%, que es adicionada en proporción duplicada y en la cual se suspenden las células. El gradiente así preparado se centrifuga a 500 g durante 20 min en una centrifuga - Beckman modelo TJ-6 con rotor TA-10.

Recolección de las Bandas de Células. Las subpoblaciones en la interfase de las diferentes densidades son obtenidas utilizando una micropipeta de 0.5 ml, diluidas en PBS y centrifugadas a 500 g. El sobrenadante es desechado y el resto resuspendido nuevamente en 10 ml de PBS y se centrifuga, todo esto con el objeto de eliminar

al Percoll. Las células son identificadas en una tinción, y el resto mantenidas en cultivo.

Preparación del Gradiente Continuo. En la preparación de este gradiente, se colocan en un tubo Corex de 15 ml, 10 ml de solución isotónica de Percoll al 40% y se centrifuga a 31 300 g durante 20 min a 4°C, en una centrífuga Beckman J-21 con rotor de ángulo fijo tipo JA-20. El gradiente continuo se forma espontáneamente a estas gravidades en virtud de que el Percoll está compuesto de partículas de diámetro variable, obediendo a la ley de Stock. Las células de la interfase 40-50% de Percoll son resuspendidas en 2 ml de PBS, se colocan sobre el gradiente preformado y se centrifugan a 500 g durante 15 min (centrifuga Beckman TJ-6 con rotor TA-10). Las bandas son recolectadas y tratadas como en el caso del gradiente discontinuo.

Caracterización de las Subpoblaciones. Las células de las distintas bandas son caracterizadas citológicamente mediante preparaciones teñidas y funcionalmente por medio de sus receptores Fc, capacidad fagocítica y secreción de lisozima al medio.

Fagocitosis. Las células de cada una de las bandas son incubadas (previa eliminación del Percoll con PBS) a 37°C en medio fresco durante 48 hrs. El medio es recuperado y centrifugado a 500 g por 3 min para eliminar restos de células y mantenido a -20°C para cuantificación de lisozima. Las células son incubadas nuevamente en medio fresco conteniendo esferas de latex de 1.09 μ de diámetro en una concentración de 1×10^6 esferas/ml durante 1 hr. Posteriormente dichas células son lavadas con PBS para eliminar las esferas

residuales, y teñidas para determinar el porcentaje de células fagocíticas con la ayuda del microscopio.

Lisozima. La cuantificación de la lisozima se realiza por espectrofotometría (Pye Unicam SP-8, de doble haz). La absorbancia es registrada, y el decremento de la turbidez de la mezcla de reacción (medio condicionado y Micrococcus lysodeikticus) se sigue a 540 nm durante los primeros 3 min y comparada con un estándar de lisozima.

Para medir la lisozima del medio condicionado (solución problema), es necesario mezclar en la celda del espectrofotometro 0.5 ml de solución de cloruro de sodio 0.3 M con 1.5 ml de suspensión de membranas de Micrococcus lysodeikticus (preparado como se indica en el Apéndice VI). A dicha mezcla se le adiciona entonces 1.0 ml de medio condicionado homogenizando rápidamente para tomar la lectura.

Receptores Fc. La cuantificación de los receptores Fc de las subpoblaciones se realiza mediante la formación de rosetas. Primero se prepara una solución de IgG (Cordis Lab., Miami, Fla.) en PBS (1:150 v/v). Para la formación de eritrocitos recubiertos con anticuerpo (EA), un volúmen de esta solución se mezcla con un volúmen igual de suspensión de eritrocitos de camero al 5% en PBS (v/v) y se incuban en baño maría a 37°C durante 30 min. Los EA son lavados tres veces con PBS y llevados a una concentración de 10^8 /ml en PBS. Antes de su uso, los EA son sometidos a un ensayo para observar su viabilidad y que no exista aglutinación. Las células de cada banda, mantenidas en cultivo durante 24 hrs son lavadas con -

PBS e incubadas nuevamente con 1 ml EA/caja a 37°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se lavan tres veces con PBS para eliminar los eritrocitos residuales. Se tiñen y se evalúa el porcentaje de rosetas con el microscopio compuesto.

VII. RESULTADOS

Del mismo modo que la metodología fué subdividida en los apartados A, B y C, los resultados son así mismo expresados.

A. Las producciones de células de exudados peritoneales de ratón a los cuatro días de la inyección, fueron en promedio de 35×10^6 células (Graf. 1), de las cuales aproximadamente el 70% son macrófagos, 20% son linfocitos y 10% granulocitos. En ratones no estimulados se encontró una población de 4.5×10^6 células en la cavidad peritoneal, de las cuales aproximadamente el 95% son granulocitos, el 4% son linfocitos y el porcentaje de macrófagos es muy bajo (menos de 1%) (Tabla 1).

En la Gráfica 1, se observa el incremento de la población de células de la cavidad peritoneal respecto al tiempo cuando los animales son estimulados. De los 4.5×10^6 que normalmente se encuentran, asciende hasta 37.5×10^6 células a los ocho días. El incremento de las células en la cavidad tiene lugar en dos etapas, la primera que se inicia a los 57 minutos, registrándose un máximo de 16×10^6 células a las cuatro horas de inyectado el irritante, a partir de este momento y hasta las 192 horas se registra una disminución en el incremento de células por unidad de tiempo respecto a la primer etapa.

La Gráfica 2 representa la respuesta celular con respecto al tiempo después de la estimulación de los animales. Puede observarse en primer lugar que la población normal de leucocitos de la cavidad peritoneal está mayormente representada por los granulocitos (aproximadamente el 95% de la población normal). En segundo lugar, que -

en un principio la manifestación de la respuesta celular asociada a los monocitos se detecta después de las 8 horas posterior a la inyección del irritante. El aumento poblacional de estas células es exponencial durante los dos primeros días. Este incremento en el porcentaje de macrófagos es concomitante al decremento en el porcentaje de granulocitos. En tercer lugar, cabe mencionar que a los dos días se registra un incremento de linfocitos en la cavidad peritoneal, adquiriendo su máximo a los cuatro días. Por último a medida que aumenta el número de linfocitos más macrófagos, el número de granulocitos disminuye tal que el aumento es exponencial.

En la Gráfica 3 se observa la relación entre el número de células de la cavidad peritoneal de ratón cultivadas por caja (superficie de 981.8 mm^2) y el número de estas que se adhieren. Las tres curvas corresponden a células provenientes de diferentes tiempos (3, 4 y 5 días) después de provocada la reacción en el ratón.

Se observa que al cuarto día después de estimulado el ratón se encuentra la mejor relación entre las variables aquí estudiadas. Esta relación se mantiene hasta cuando son cultivados 16×10^6 en donde se adhieren 3.7×10^6 células, pero por la elevada densidad poblacional, se ve perjudicado el extendimiento de las mismas. Cuando se cultivan 8×10^6 células se encuentra una cantidad satisfactoria (1.8×10^6 células adheridas/caja), puesto que el extendimiento se ve favorecido y la caja Petri se encuentra saturada. Por debajo de esta concentración se observa un mejor extendimiento, pero existe el inconveniente del bajo porcentaje de células

las adherentes por caja.

Después de 24 horas de incubación, la existencia de células con capacidad adherente en el sobrenadante fué determinada por cultivo de la suspensión en nuevas cajas, y caracterizadas mediante preparaciones en citocentrífuga. Se registró la presencia de macrófagos en suspensión a partir de la concentración de 8×10^6 células, representados por un 5%, para las concentraciones de 16×10^6 fué de 10% y para 32×10^6 de 40% del total.

En la Gráfica 4 aparece representado la variación del número de células de cada linaje de leucocitos que se encontraron presentes en la cavidad peritoneal. Se observa que la población granulocítica es la primera que tiene un incremento en respuesta al antígeno, adquiriendo un máximo a las 16 horas, de 21.12×10^6 células, periodo a partir del cual, empiezan a declinar estos y a aumentar los macrófagos, observandose que a las 96 horas hay 25.6×10^6 macrófagos, mientras que solo 2.8×10^6 granulocitos. En cuanto a la Gráfica de los linfocitos, su máximo se observa a los 4 días con aproximadamente 6.65×10^6 bajando posteriormente a 3.76×10^6 a las 192 horas, tiempo en el cual los granulocitos no están presentes (Tabla 1).

B. A partir de observaciones directas se vió que en su gran mayoría los tratamientos con tripsina produjeron bajos rendimientos de células separadas del sustrato, sin embargo las células adquirieron una morfología redondeada, observandose inhibición del extendimiento. Este efecto perduro 60 minutos tiempo después del cual las células adquieren su morfología y estructura iniciales pero aumenta el grado de vacuolización y de extendimiento. Estas cé-

lulas que quedaron afectadas pues perdieron su viabilidad. Esta enzima en concentraciones de 1 mg ó menos por mililitro, separa una muy baja cantidad de células las que pierden su viabilidad pues no se adhirieron a las cajas de cultivo al ser recultivadas y posteriormente se desintegran antes de 24 horas después del tratamiento.

En resumen, el efecto causado por esta enzima proteolítica en los macrófagos no fué significativo, en cuanto a que no permitió la separación de las células del sustrato.

Se probó también la capacidad de la colchicina para separar en forma viable a las células del sustrato. Se encontró que la citotoxicidad de ésta indica que a una concentración de 5 μ mol/caja en PBS libre de Ca^{++} y Mg^{++} a 37°C, causa un 15% de muerte celular en una hora, 25% en 4 horas y 40% ó más a las 24 horas de exposición a este alcaloide. En virtud de que la muerte celular se ve incrementada con el tiempo de exposición, se decidió utilizar las células en las cuatro primeras horas del tratamiento.

Cuando la concentración de colchicina fué de 2 μ mol/caja, se registró una muerte celular de un 20% de la población total de macrófagos cuando el tiempo de exposición es de 4 horas a 37°C.

En un tratamiento que consistió en adicionar simultáneamente a las células 5 μ mol/caja de colchicina y 1 mg de tripsina en PBS libre de Ca^{++} y Mg^{++} y cultivando en cajas de plástico, se encontró que a 37°C existe muerte celular con o sin agitación mecánica (usando un baño American Optical Co., Scientific Instrument Division U.S.A.), encontrando mayor separación y proporcionalmente ma

por muerte celular cuando las células fueron agitadas. Este mismo tratamiento efectuado a 27°C produce muy baja separación de las células y se mejora cuando es acompañado con agitación suave con pipeta, pero no se obtienen buenos resultados en la viabilidad de las células.

Usando cajas de plástico nacionales (Durango Vela) y cultivando las células en PBS sin Ca^{++} y Mg^{++} a 37°C, se observó que se facilitaba la separación celular al resuspender con agitación suave con una pipeta, obteniéndose en este caso buenos resultados de viabilidad. Esto condujo a intentar la fraccionación de las células aprovechando su rapidez para adherirse a la superficie cuando son puestos en cultivo, haciendo separaciones de aquellas que se adhieren a las 2 horas, 2.5 horas, 3 horas y 24 horas, fraccionándolas de esta forma en 4 grupos. A nuestro juicio mediante caracterización morfológica resultaron ser grupos viables pero heterogéneos ya que se presentaban en todos los cultivos cantidad de células de forma esférica, de forma fusiforme y diversos tipos de plegamiento.

Análogamente se hizo una separación celular durante una exposición en colchicina (5 μmol /caja) de 90 minutos. Se obtuvieron tres fraccionaciones (una cada 30 minutos) de los macrófagos y en cada una de ellas al ser sembradas encontramos diferentes grados de extendimiento y vacuolización, además de una gran pérdida de viabilidad a las 24 horas. Resultados análogos se encontraron en el tratamiento con colchicina (1.15 horas), seguido de un tratamiento con 1 mg de tripsina/caja durante 45 minutos.

Las células tratadas con concentraciones variables de proteasa (Sigma Chemical Company U.S.A.) en PBS libre de Ca^{++} y Mg^{++} a 37°C , fueron observadas cada 15 minutos, encontrándose que la enzima afecta la viabilidad de las células a partir de una concentración de 10^{-4} , teniendo la máxima muerte celular (10%) a los 30 minutos de exposición. A los 60 minutos de incubación las células adheridas experimentan una recuperación rápida, manifestada por un extendimiento activo, lo que parece indicar una pérdida de actividad por parte de esta enzima; estos resultados concuerdan con los reportados por Rabinovitch y Destefano (1973). A las concentraciones de 10^{-5} y 10^{-6} , la enzima solo tiene efectos sobre el extendimiento, por lo que las células adquieren forma redondeada. Después de un tratamiento de 2.15 horas, todas las células fueron cultivadas, previa eliminación de la proteasa por lavado con PBS normal. En estos casos se observó que a las 24 horas, las células estaban según nuestro criterio viables.

Por ser el Ca^{++} y el Mg^{++} cationes implicados en la adherencia y extendimiento de los macrófagos (Rabinovitch y De Stefano, 1973) un procedimiento alternativo fué el uso de EDTA en PBS libre de estos cationes.

Una concentración del 2% de EDTA (Rabinovitch y De Stefano, 1976) fué empleada para separar a los macrófagos adheridos a cajas Petri de vidrio y plástico. Los resultados indican que a una temperatura de 4°C , las células no resultan ser afectadas por el EDTA al ser recultivadas in vitro, en tanto que cuando la separación se efectúa a 27°C estas resultaron ser más sencibles, ya que se registró un elevado grado de muerte celular, a 37°C las células

fueron expuestas al EDTA por una hora, encontrándose bajo estas -- condiciones mayor rendimiento de células separadas del recipiente, pero baja viabilidad (aproximadamente 10%). Cuando las células son tratadas con la solución de EDTA a 4°C, a los 20 minutos se notan cambios en su morfología llegando a adquirir una forma casi esférica, sin embargo, la acción del EDTA no es capaz de desprender las células de la superficie del recipiente, y es necesario agitar el medio, resuspendiendo vigorosamente con pipeta. Las células pudieron así fraccionarse e incubarse, encontrándose en este caso una muerte celular casi total (más del 90%). Se substituyó la agitación con pipeta por agitación con el baño de agitación mecánica, sin lograr la fraccionación de las células. Cabe agregar que los rendimientos de células separadas de la superficie por estas técnicas son bajos.

Como un intento más para fraccionar las células en subpoblaciones, fueron incubadas en PBS sin Ca^{++} y sin Mg^{++} a diferentes temperaturas mediante un recirculador de agua; en todos los casos se acompañó como fué descrito anteriormente con agitación mecánica constante. Cuando la temperatura fué de 20°C, las células no experimentaron cambios a los 20 minutos de este tratamiento; a 15°C el 60% de la población total tenía una forma esférica y no es sino -- hasta los 10°C una separación celular, mismas que al ser cultivadas presentaron muerte celular elevada a las 24 horas. Se efectuaron las mismas separaciones a 5 y 3°C, y los resultados fueron similares.

C. Dado que los procedimientos reportados anteriormente empleando la propiedad de adherencia celular probaron no ser los ²ade

cuados, se idearon otros métodos para separar a los macrófagos en diferentes subpoblaciones sobre la base de su densidad, utilizando para ello una centrifugación diferencial.

Se hizo un gradiente discontinuo de Percoll, diluyendo este con volúmenes variables de agua pero siempre agregando NaCl al 0.5% para obtener una solución final de 0.85% de NaCl (Gráfica 5).

Las células de exudado peritoneal al ser centrifugadas en este gradiente de Percoll, se repartieron en 7 bandas, designadas por los números sucesivos del 1 al 7 a partir de la superficie del tubo de centrifuga (Fotografía 1). Las células se repartieron en las interfases de cada densidad, cuyos índices de refracción corresponden a : 1.3365 a 1.3385, 1.3385 a 1.3405, 1.3405 a 1.3425, 1.3425 a 1.3445, 1.3445 a 1.3465, 1.3465 a 1.3485 y de 1.3485 a 1.3505, respectivamente. Se observó que las cuatro primeras bandas del gradiente discontinuo consistían casi exclusivamente de células de tipo macrofágico (Gráfica 6), Por ejemplo la banda 4 estaba integrada por el 95% de macrófagos y 5% de células no adherentes. Esta cuarta banda contenía el 49% del total de los macrófagos del exudado peritoneal y el 52% del recobrado en el gradiente. Las tres primeras bandas consisten unicamente de macrófagos, mientras que la banda 5 está principalmente compuesta de granulocitos (80%) y contiene solo 20% de macrófagos. La banda 6 está integrada por los granulocitos y por los linfocitos que en este caso representan aproximadamente el 5% de las células de la banda. Como la banda 7 consistía casi exclusivamente de eritrocitos, no se incluye cuando se habla del número total de células. Las células de cada banda fueron caracterizadas citológicamente y cuantificadas (Tabla-2).

Se encontró que la banda 4 es la más poblada, por encima y por debajo de la cual la cantidad de células de cada banda disminuye gradualmente. Por otra parte se observó que el grado de vacuolización de los macrófagos disminuye a medida que aumenta la densidad del medio en el cual son recuperadas.

Dado que los macrófagos son el tipo de célula de nuestro interés, los de la banda 5 fueron purificados aprovechando su propiedad de adherencia, y poder posteriormente efectuar su caracterización funcional, sin interferencia de otros tipos celulares.

Como ya se dijo, de la población total de células de la cavidad peritoneal, el 70% son macrófagos. Cuando las células son colocadas en el gradiente discontinuo, y centrifugadas, se tiene que la suma total de los porcentajes de macrófagos en las distintas bandas es solo del 61.73%, la diferencia es debida probablemente a la pérdida por adherencia a las paredes del tubo y por la muerte celular, evidenciado por un gran número de restos celulares detectados en las tinciones o que por su baja densidad no penetraron en el gradiente.

De la cantidad inicial de células colocadas en el gradiente, se recuperó aproximadamente un 80% (Gráfica 7), el 20% restante corresponde a la suma de los eritrocitos (banda 7), células adheridas al tubo y restos celulares.

Siendo la banda 4 del gradiente discontinuo en la que se detiene el mayor número de macrófagos, se decidió subdividirla por medio de un gradiente continuo preformado, preparado por ultracentrifugación. La centrifugación de las células colocadas sobre este gradiente dió lugar a 3 bandas bien definidas (Fotografía 2).

Se recuperaron 6 diferentes regiones del gradiente (Figura 2) correspondientes a las tres bandas y a las tres regiones entre -
ollas. Las densidades ópticas de estas variaron de 1.3355 hasta -
1.3455. De un total de 55×10^6 células que se centrifugaron, -
 49.79×10^6 fueron recuperadas en las 6 regiones obteniéndose un -
porcentaje de recuperación total de aproximadamente 90.5%. Las pri -
meras cuatro regiones de este gradiente contenían macrófagos con -
98% o más de pureza (Gráfica 9). En la región 4 se encontró el -
71.8% del total de células recuperadas (con índice de refracción -
de 1.3433). En esta región el 98% de las células son macrófagos y
el resto son granulocitos y células cebadas (Gráfica 9). La re--
gión 5 está integrada por 20% de macrófagos y el resto de las cé-
lulas son granulocitos y linfocitos grandes. En la región 6, con
índice de refracción de 1.3455, se encontraron los eritrocitos y
cantidades pequeñas de macrófagos (no más del 2%), (Tabla 3).

Los macrófagos de cada una de las bandas del gradiente dis-
continuo y de las fracciones del continuo fueron estudiadas con -
respecto a su habilidad para fagocitar esferas de latex y capaci-
dad para formar rosetas de EA (Tabla 4 y 5). Para el gradiente -
discontinuo los datos cuantitativos indican que la habilidad fago
cítica de los macrófagos de las distintas subpoblaciones se va in
crementando con la densidad encontrándose un máximo en la banda 3
con un 55.8% de las células que presentan dicha propiedad. A par
tir de esta banda se encuentra un desenso gradual hasta la banda
5. Similar comportamiento se presentó para el caso de receptores
Fc para EA en este gradiente. Cabe mencionar que la banda 4 fué
evaluada (para estas propiedades) a partir de los resultados del

gradiente continuo (Gráfica 11)

Las células obtenidas de las diferentes regiones del gradiente continuo presentaron un grado de fagocitosis variable. En la región 1 se encontró un 38% de células que fagocitan latex. Este porcentaje aumentó en las siguientes regiones hasta llegar a un 50% en la cuarta región, luego disminuyó a un 45% en la quinta región.

Análogamente al evaluar el porcentaje de células con receptores para Fc en las distintas regiones del gradiente continuo se observó un comportamiento muy similar al reportado para fagocitosis. Se obtuvieron 73% de rosetas para la región 1, llegando a un 100% en la región 4 y disminuyendo hasta 40% en la región 6 (Gráfica 13).

La intensidad de la fagocitosis así como de la capacidad para formar rosetado se evaluó como baja cuando había menos de 5 esferas de latex ingeridas, o 5 eritrocitos adheridos y fuerte cuando el número era mayor (Gráfica 10 y 12). Sin embargo se observó que mientras había mayor porcentaje de cualquiera de estas propiedades la intensidad de la respuesta era proporcionalmente mayor.

De los dos gradientes, en el discontinuo se registraron las mayores concentraciones de lisozima, siendo las células de la banda 2 las que mayor cantidad secretaron (2.14×10^{-5} μg). Se observó que las fracciones del gradiente continuo secretaron cantidades de lisozima que disminuyen con el aumento de la densidad de las células. No se observó una relación de las cantidades de lisozima secretada por las células de las distintas bandas del gradiente discontinuo (Tabla 6).

GRAFICAS, TABLAS

FIGURAS

Y

FOTOGRAFIAS

CONJUNTO DE CELULAS PRIMITIVAS TOTIPOTENCIALES

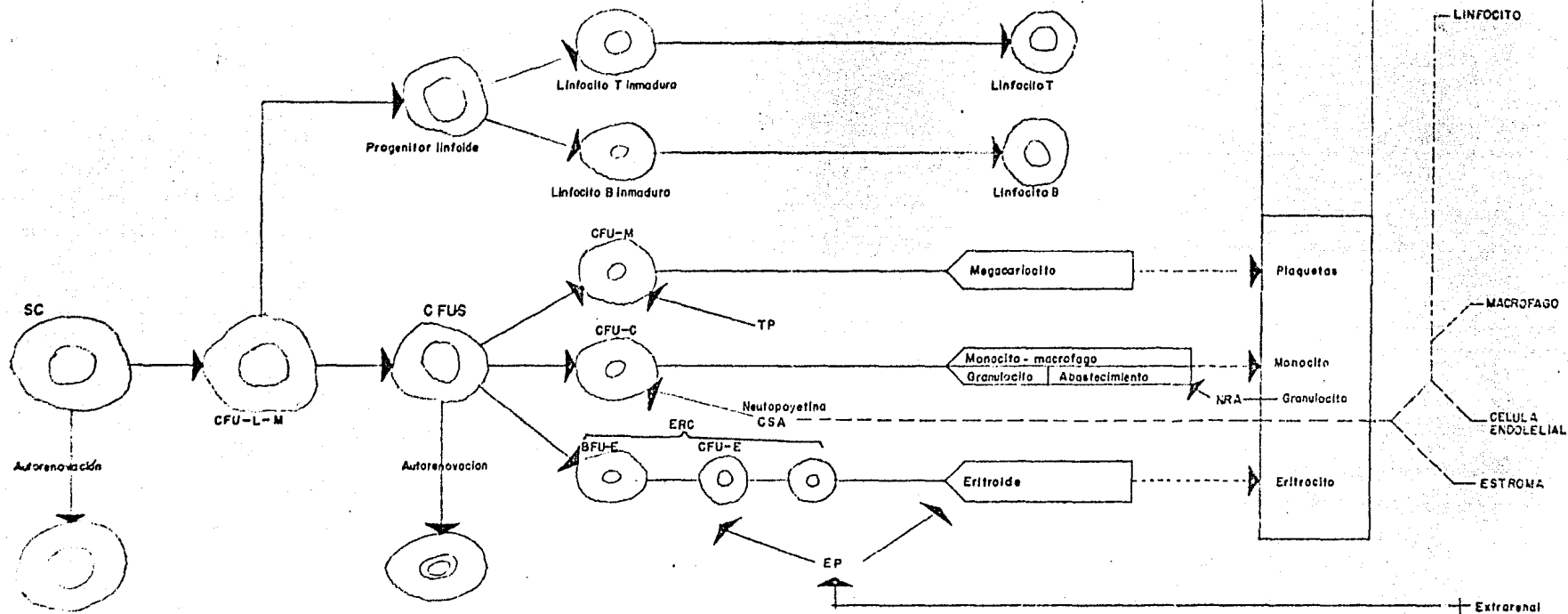
CONJUNTO DE CELULAS PRIMITIVAS PLURIPOTENCIALES

COMPROMETIDAS

DIFERENCIADAS

SANGRE PERIFERICA

TEJIDO



SC : CELULA MADRE (stem cell)

CFU-L-M: UNIDAD FORMADORA DE COLONIAS MIELOIDE LINFOIDE

CFU-S : UNIDAD FORMADORA DE COLONIAS DEL BAZO

CFU-M : UNIDAD FORMADORA DE COLONIAS DEL MEGACARIOCITO

CFU-C : UNIDAD FORMADORA DE COLONIAS DE CELULAS MADRE MONOCITO-MACROFAGO.

BFU-E: UNIDAD ERITROIDE DE PROLIFERACION RAPIDA

CFU-E: UNIDAD FORMADORA DE COLONIAS ERITROIDE

ERC : COMPORTAMIENTO DE CELULAS RESPONSABLES DE LA ERITROPOYETINA

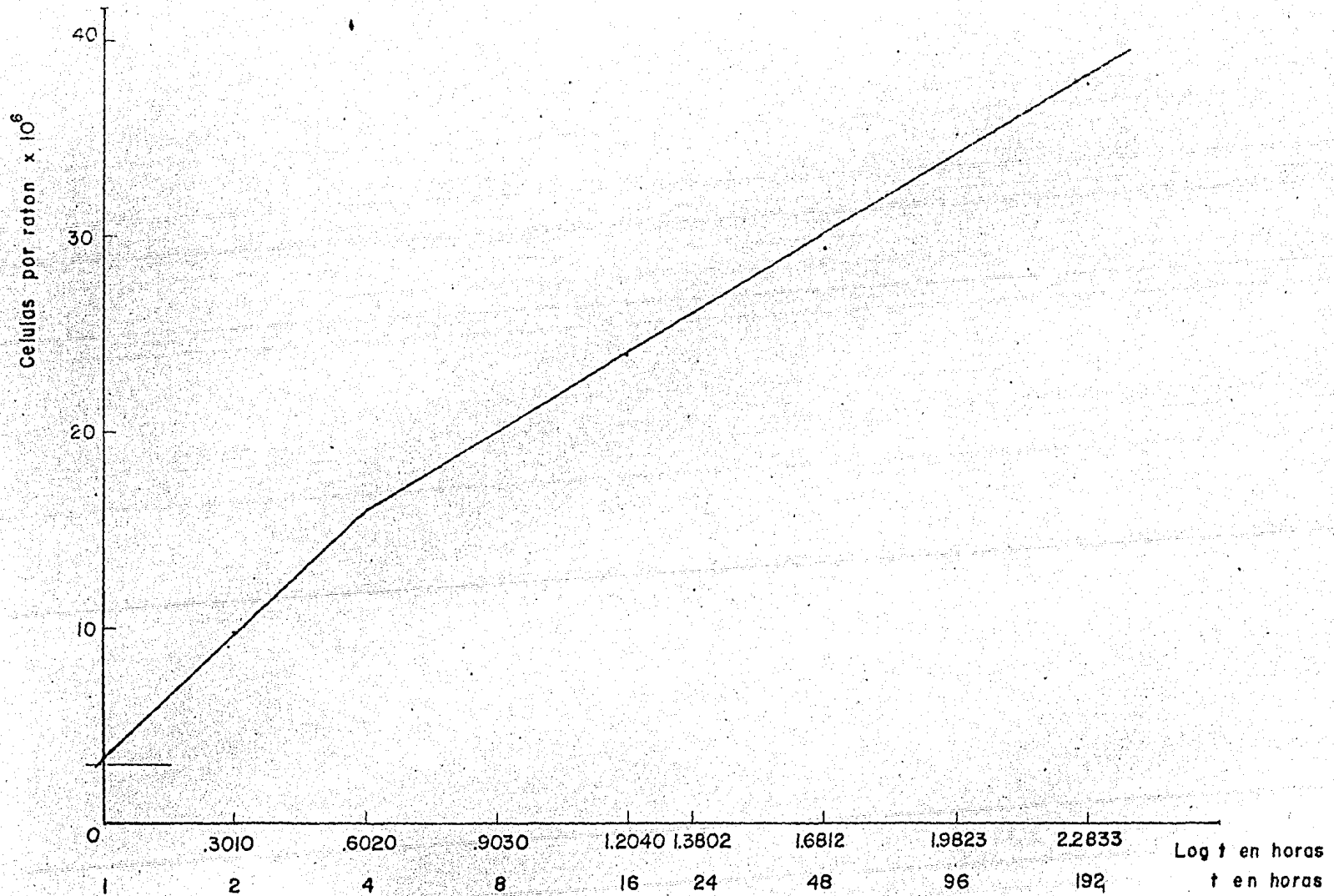
CSA : FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS

EP : ERITROPOYETINA

NRA : FACTOR DE LIBERACION DEL MACROFAGO

TP : TROMBOPOYETINA

FIGURA No. 1.- ORIGEN, INTERELACION Y DESARROLLO DE LAS CELULAS HEMATOPOYETICAS.

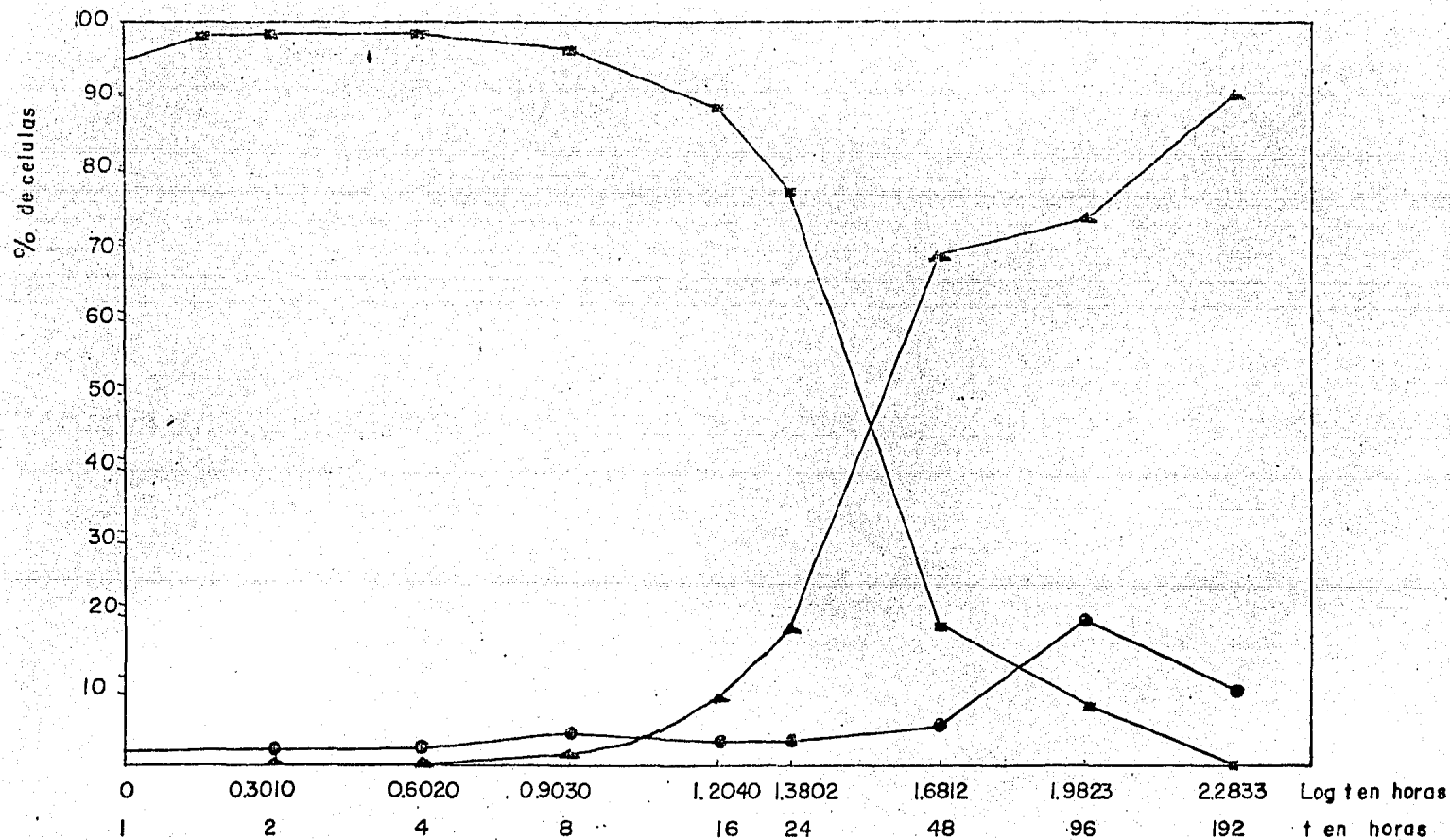


GRAFICA No. 1.-Variación en el tiempo del número de células que acuden a la cavidad peritoneal de ratones estimulados con un irritante.

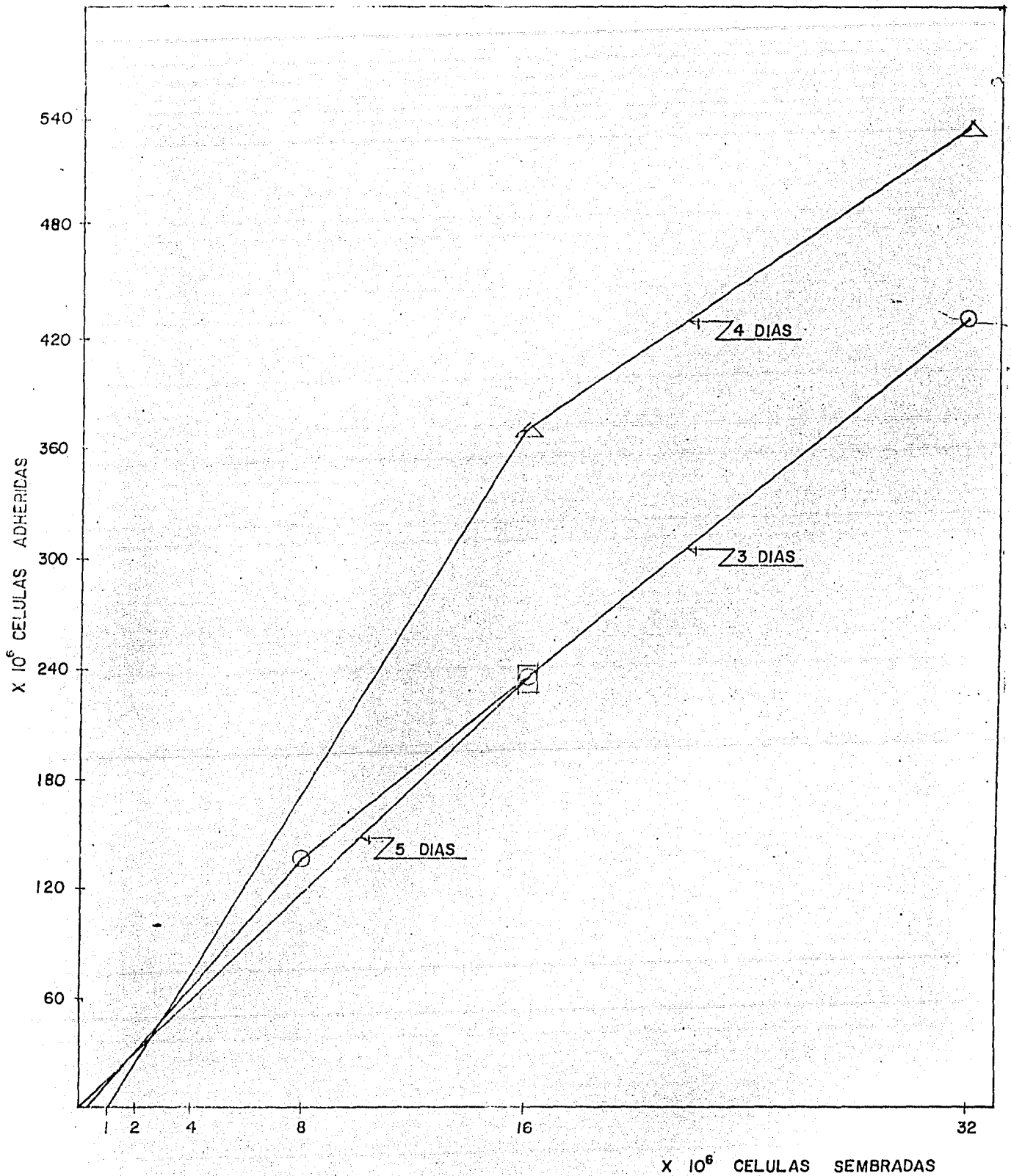
TABLA 1. Porcentaje y número de células de la cavidad peritoneal de ratones estimulados con caseinato de sodio.

	TIEMPO DESPUES DE ESTIMULACION (hrs)									
	0	1	2	4	8	16	24	48	96	192
Granulocitos (%)	99	96	98	98	96	88	77	19	8	0
Macrófagos (%)	0	0	0	0	0	9	18	67	73	90
Linfocitos (%)	4	2	2	2	4	3	3	5	19	10
Células indefinidas (%)	1	2	0	0	0	0	2	9	0	0
Células extraídas por ratón ($\times 10^6$)	3	3.3	9.7	16	-	24	26	29.3	35	37.6
Presencia de eritrocitos	+++	-	+++	-	-	-	+	++	-	+
Macrófagos ($\times 10^6$)	0	0	0	0	-	2.16	4.68	19.63	25.6	33.84
Granulocitos ($\times 10^6$)	2.88	3.17	9.5	15.7	-	21.12	20.24	5.6	2.8	0
Linfocitos ($\times 10^6$)	0.12	0.07	0.2	0.32	-	0.72	0.78	1.46	6.65	3.76

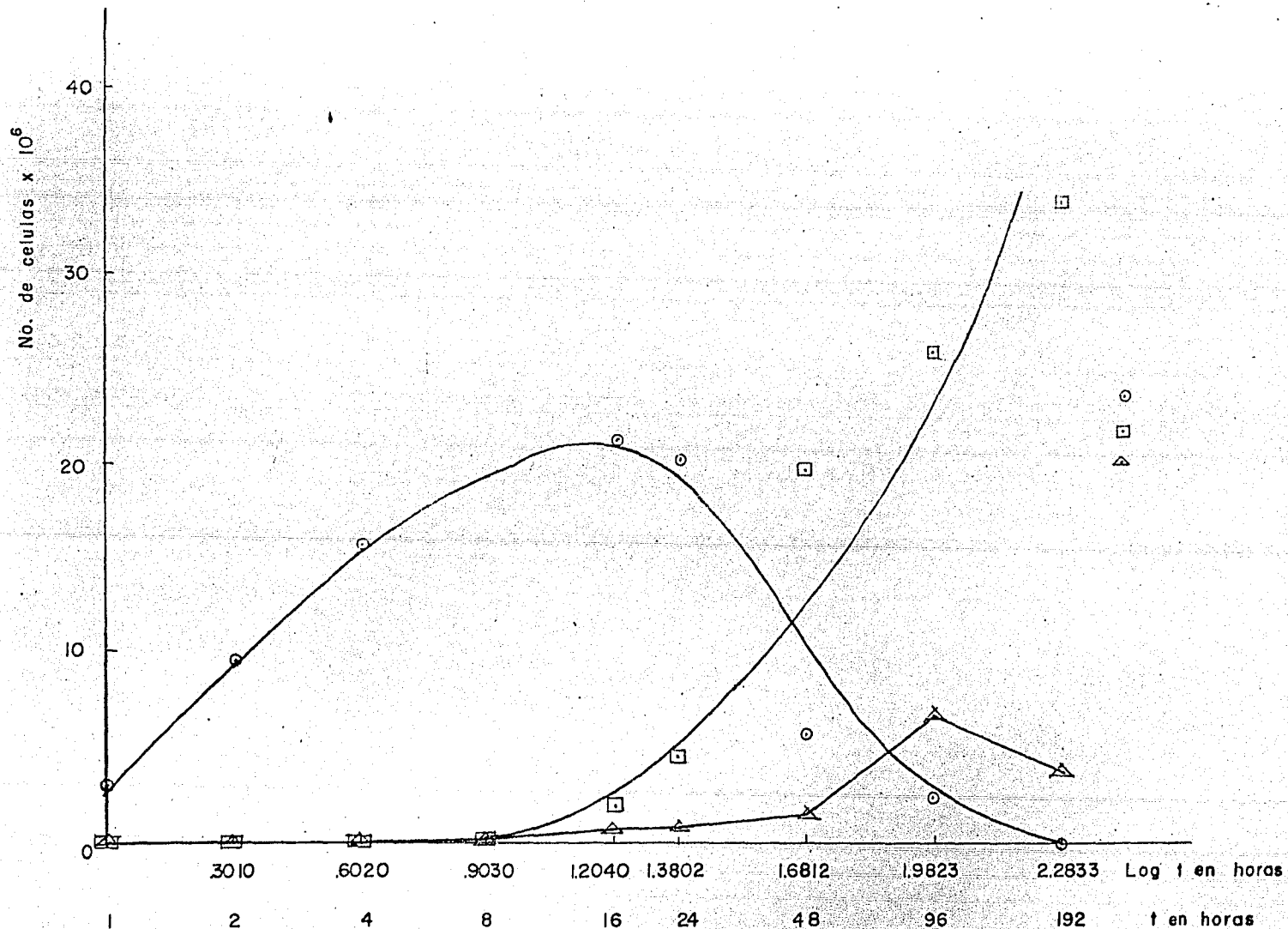
^g Se encontraron desde un número apreciable (+++), hasta ninguno (-).



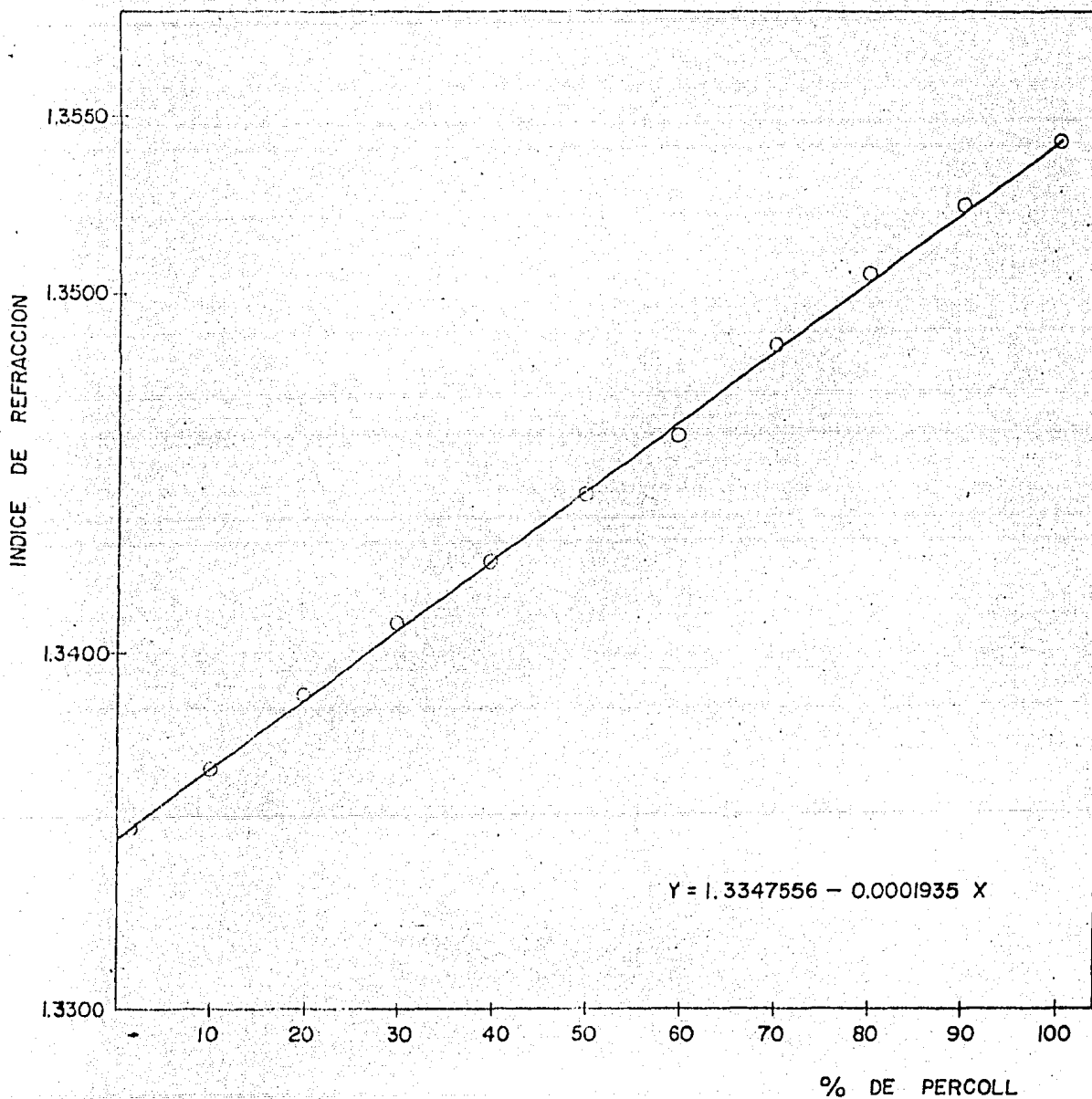
GRAFICA No. 2.- RESPUESTA CELULAR INMUNE EN EL TIEMPO EN RATONES A LOS QUE SE LES HA INYECTADO INTRAPERITONEALMENTE UN IRRITANTE.



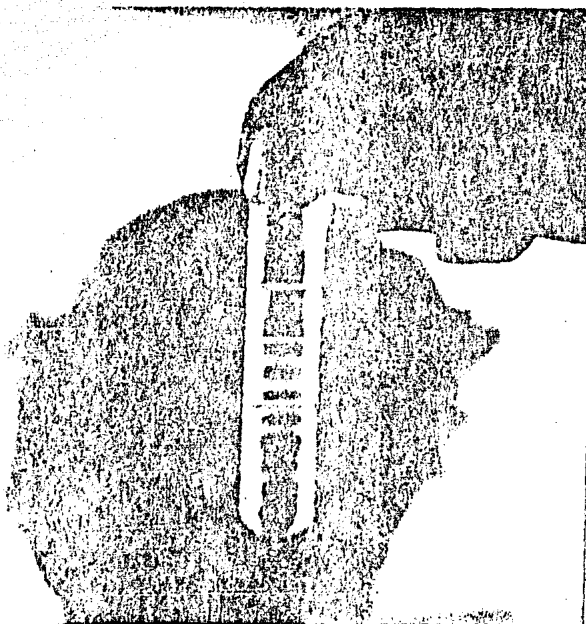
GRAFICA No. 3. RESPUESTA DE LA ADHERENCIA AL SER CULTIVADOS DIFERENTE NUMERO DE CELULAS DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATONES ESTIMULADOS - 72, 96, Y 120 HORAS DESPUES DE LA INYECCION DEL CASEINATO DE SODIO.



GRAFICA No. 4. CINETICA DE APARICION DE LOS LINAJES DE LEUCOCITOS EN LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATONES ESTIMULADOS. LAS CELULAS FUERON IDENTIFICADAS EN PREPARACIONES HECHAS EN CITOCENTRIFUGA Y TEÑIDAS CON MAY-GRUNWALD-GIEMSA.

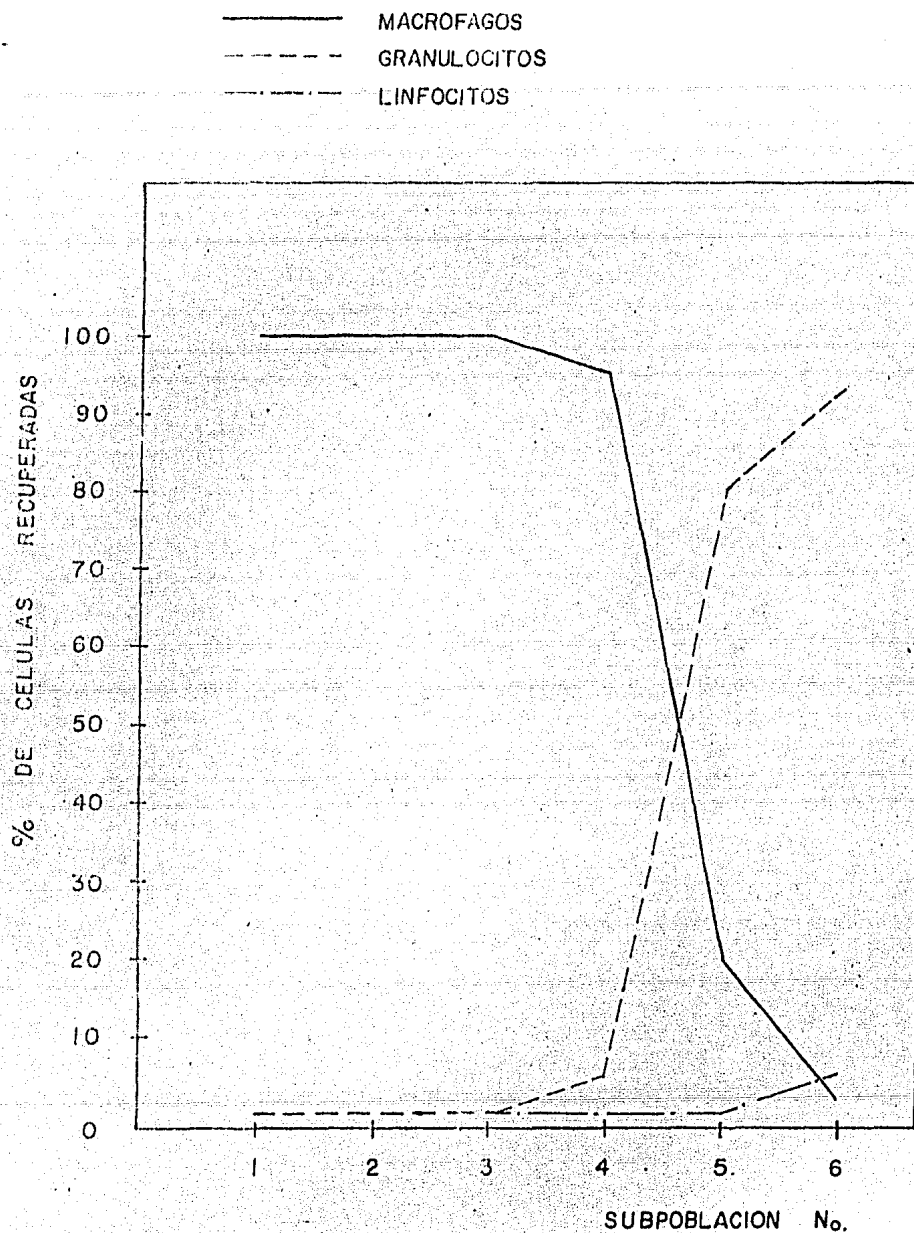


GRAFICA No. 5 RELACIONES ENTRE EL INDICE DE REFRACCION Y LA DILUCION DE LA SOLUCION ESTANDAR DE PERCOLL. LA SOLUCION DE PERCOLL FUE DILUIDA CON VOLUMENES VARIABLES DE SOLUCION SALINA DE NaCl 8.5 % Y EL INDICE DE REFRACCION MEDIDO A 20°C CON UN REFRACTOMETRO BAUSCH AND LOMB.



FOTOGRAFIA No. 1

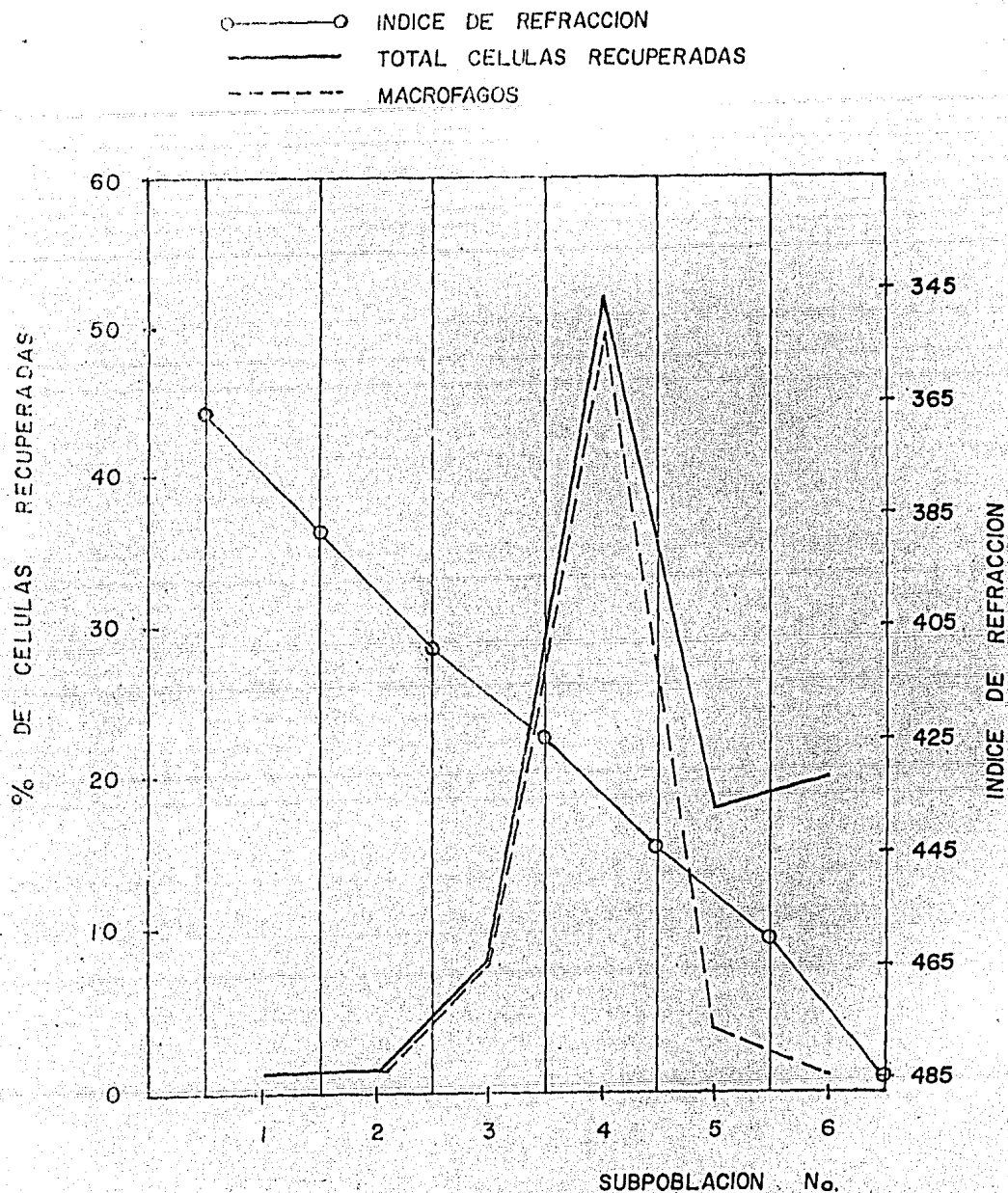
Un gradiente discontinuo de Percoll con células obtenidas de la cavidad peritoneal de ratones estimuladas intraperitonealmente con caseinato de sodio. La colecta de células se realizó 4 días después de la irritación. La centrifugación de las células a 500 g resultó en siete bandas.



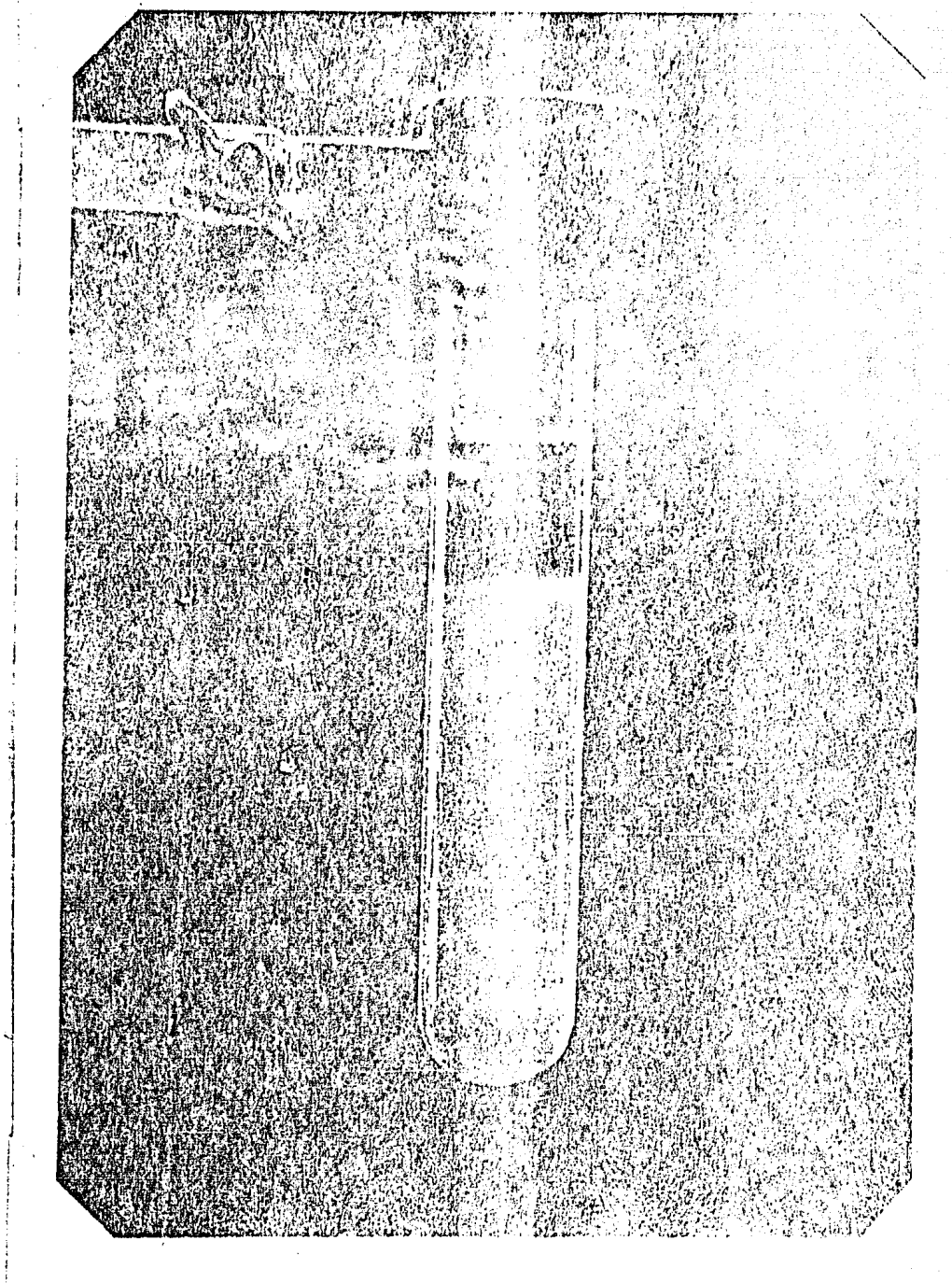
GRAFICA No. 6 PERFIL DE DISTRIBUCION DE LAS CELULAS DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATON DESPUES DE LA SEPARACION SOBRE GRADIENTES DISCONTINUOS DE PERCOLL. LOS RESULTADOS SON EXPRESADOS COMO UN PORCENTAJE DEL NUMERO TOTAL DE CELULAS EN CADA SUBPOBLACION.

TABLA 7. Distribución de las células en el gradiente discontinuo después de centrifugadas. Las células se detuvieron en las interfases de las densidades.

PERCOLL (%)	INDICE DE REFRACCION	CELULAS (%)	TIPO DE CELULA Y PORCENTAJE	MACROFAGOS (%)
10	1.3367	0.20	Macrófagos (100)	0.32
20	1.3388	0.62	Macrófagos (100)	1.00
30	1.3408	8.04	Macrófagos (100)	12.94
40	1.3425	52.05	Macrófagos (95) Otros (5)	79.61
50	1.3444	19.04	Macrófagos (20) Granulocitos (80)	6.13
60	1.3460	20.05	Granulocitos (95) Linfocitos (5)	0.0
70	1.3485	—	Eritrocitos (100)	—
80	1.3505			
90	1.3525			



GRAFICA No. 7. RECUPERACION DE LAS CELULAS DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATON DESPUES DE LA CENTRIFUGACION EN GRADIENTES DISCONTINUOS DE PERCOLL. LAS BANDAS SE DETUVIERON EN LAS INTERFASES Y EL PORCENTAJE DE CELULAS EN CADA UNA FUE CALCULADO EN BASE AL NUMERO INICIAL DE CELULAS. APROVECHANDO LA PROPIEDAD DE ADHERENCIA DE LOS MACROFAGOS SU PORCENTAJE FUE CALCULADO POR DIFERENCIA ENTRE EL NUMERO TOTAL DE LA FRACCION Y LAS CELULAS SOBRENADANTES.



FOTOGRAFIA N° 2

Un gradiente continuo de Percoll con células de la banda número cuatro del gradiente discontinuo. El gradiente de Percoll --
fue preformado por centrifugación a 13 000 g durante 30 minutos, --
las células fueron colocadas en este gradiente y centrifugadas --
500 g durante 15 min.

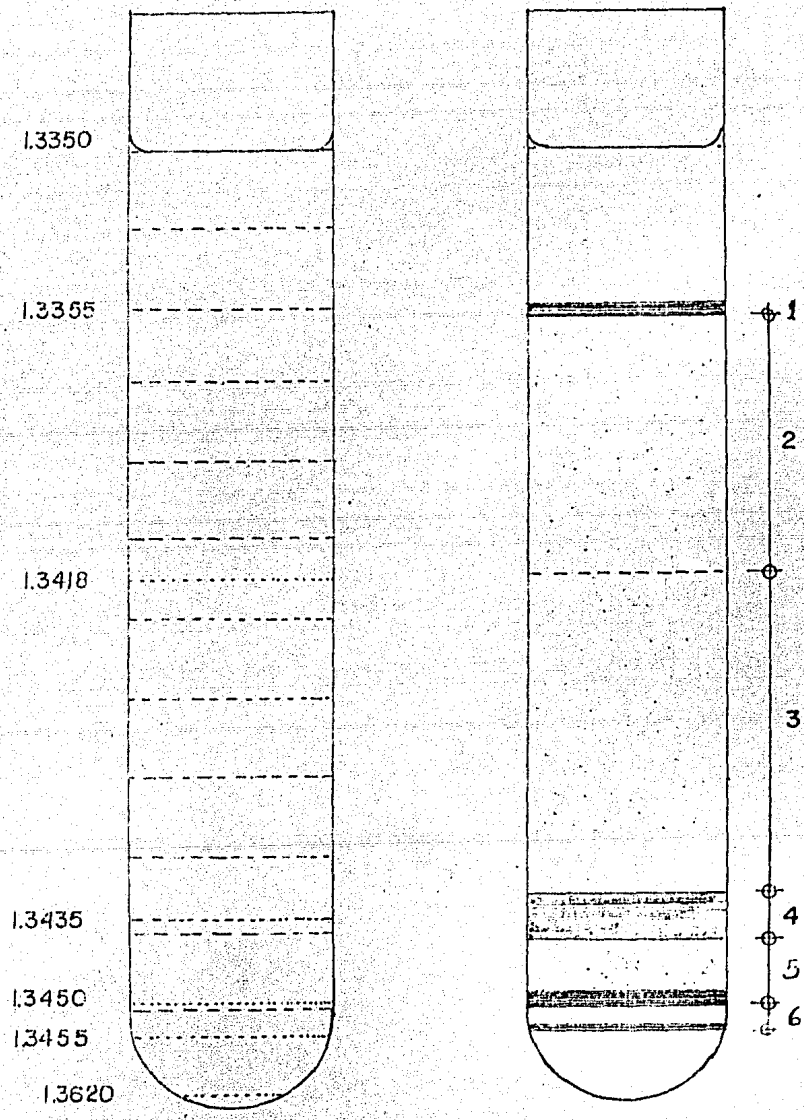
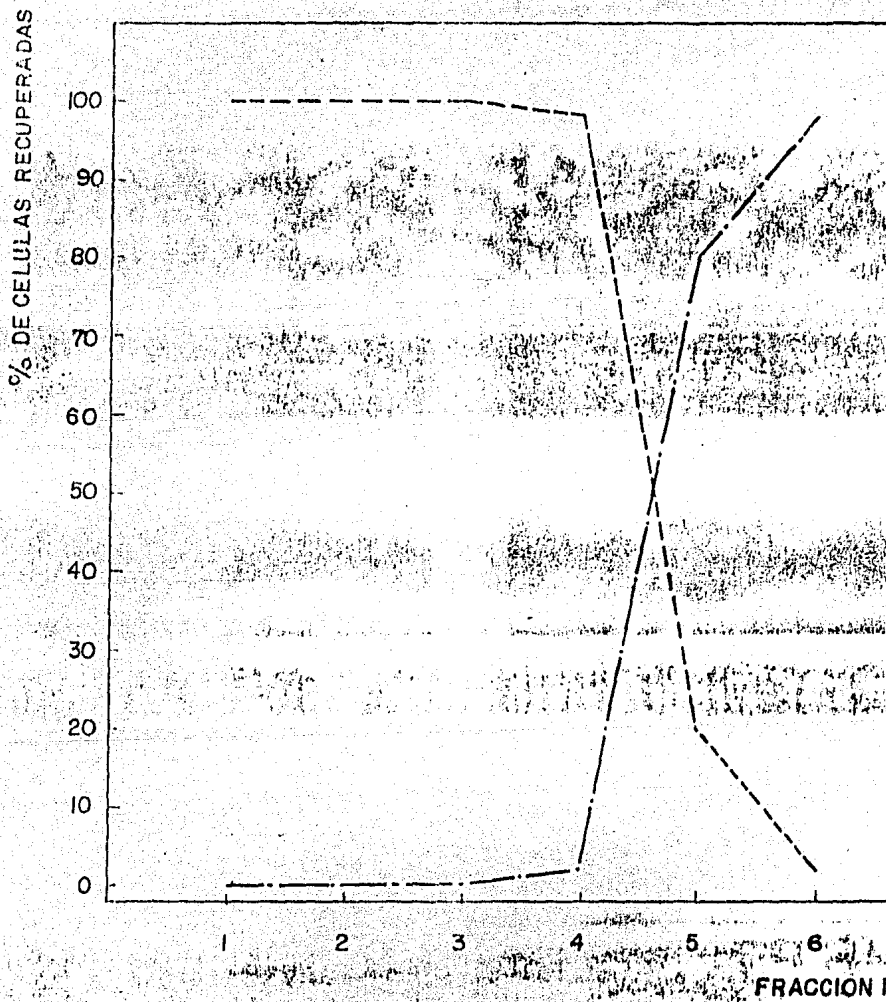
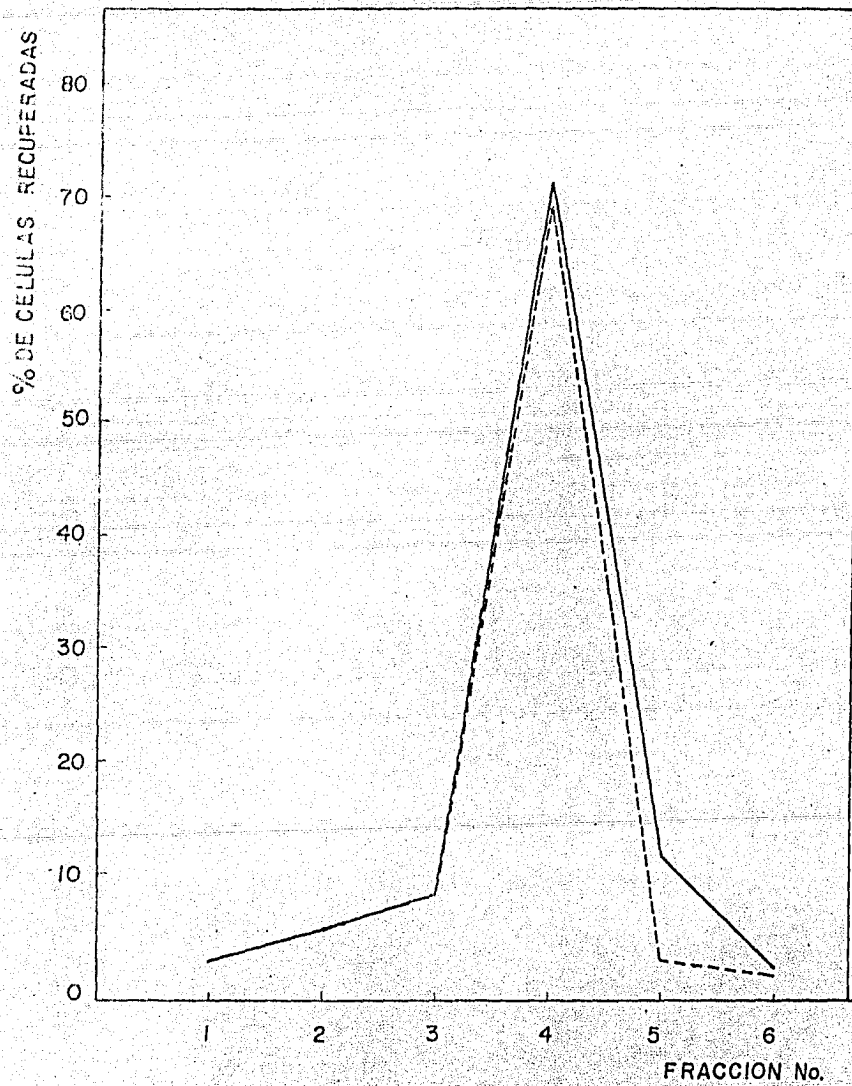


FIGURA No. 24. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA SEPARACION DE LAS CELULAS POR GRADIENTES DE DENSIDAD CONTINUOS (MIRCOLL).



GRAFICA NO. 8. PERFIL DE DISTRIBUCION DE LAS CELULAS DE LA BANDA 4 DEL GRADIENTE DISCONTINUO DESPUES DE LA SEPARACION SOBRE EL GRADIENTE CONTINUO DE PERCOLL.



GRÁFICA No. 9. RECUPERACION DE LAS CELULAS DE LA BANDA 4

DEL GRADIENTE DISCONTINUO DESPUES DE LA CENTRIFUGACION

DE LA BANDA 4 SOBRE EL GRADIENTE CONTINUO.

TABLA 3. Distribución de las células en el gradiente continuo después de centrifugadas. Las células de este gradiente corresponden a la banda 4 del gradiente discontinuo.

BANDA	INDICE DE REFRACCION	CELULAS (%)	TIPO DE CELULA Y PORCENTAJE	MACROFAGO (%)
1	1.3350- 1.3355	2.03	Macrófagos (100)	2.32
2	1.3355- 1.3418	4.99	Macrófagos (100)	5.71
3	1.3418- 1.3431	8.03	Macrófagos (100)	9.19
4	1.3431- 1.3435	71.30	Macrófagos (98) Células cebadas y Linfocitos (2)	80.01
5	1.3450	11.85	Macrófagos (20) Linfocitos y Granulocitos (80)	2.71
6	1.3455	1.80	Macrófagos (2) Eritrocitos (98)	0.04

TABLA 4. Fagocitosis y formación de rosetas por los macrófagos de las distintas bandas del gradiente discontinuo.

BANDA	DISTRIBUCION DE FAGOCITOSIS EN %	TOTAL DE FAGOCITOSIS %	DISTRIBUCION DE ROSETAS %	TOTAL ROSETAS %
1	+ 17.0	34.0	+ 65.0	83.5
	o 17.0		o 18.5	
	- 66.0		- 16.5	
2	+ 20.5	42.5	+ 81.0	91.0
	o 22.0		o 10.0	
	- 57.5		- 9.0	
3	+ 30.0	55.5	+ 91.0	94.5
	o 25.5		o 3.5	
	- 44.5		- 5.5	
4	+ 21.0	44.0	+ 75.5	87.0
	o 24.5		o 6.0	
	- 54.5		- 18.5	
5	+ 25.0	39.0	+ 85.0	90.0
	o 14.0		o 5.0	
	- 61.0		- 10.0	

+ significa 5 o más esferas de latex fagocitadas ó 5 o más eritrocitos sobre la superficie del macrófago.

o significa menos de 5 esferas fagocitadas ó menos de 5 eritrocitos sobre la membrana del macrófago.

- significa que no hay respuesta de fagocitosis y formación de rosetas.

TABLE 5. Fagocitosis y formación de rosetas de los macrófagos de las distintas bandas del gradiente continuo.

BANDA	DISTRIBUCION DE FAGOCITOSIS %	TOTAL DE FAGOCITOSIS %	DISTRIBUCION DE ROSETAS %	TOTAL ROSETAS %
1	+ 13.5	38.0	+ 65.0	72.5
	o 23.5		o 7.5	
	- 63.0		- 27.5	
2	+ 23.0	46.0	+ 82.5	92.0
	o 23.5		o 9.5	
	- 54.0		- 8.0	
3	+ 25.5	48.5	+ 90.0	95.0
	o 23.0		o 5.0	
	- 51.5		- 5.0	
4	+ 27.5	50.0	+ 100.0	100.0
	o 22.5		o 0.0	
	- 50.0		- 0.0	
5	+ 15.0	45.0	+ 86.0	91.0
	o 30.0		o 5.0	
	- 55.0		- 9.0	
6	NC —	NC —	+ 30.0	40.0
			o 10.0	

+ significa 5 o más esferas de latex fagocitadas ó 5 o más eritrocitos sobre la superficie del macrófago.

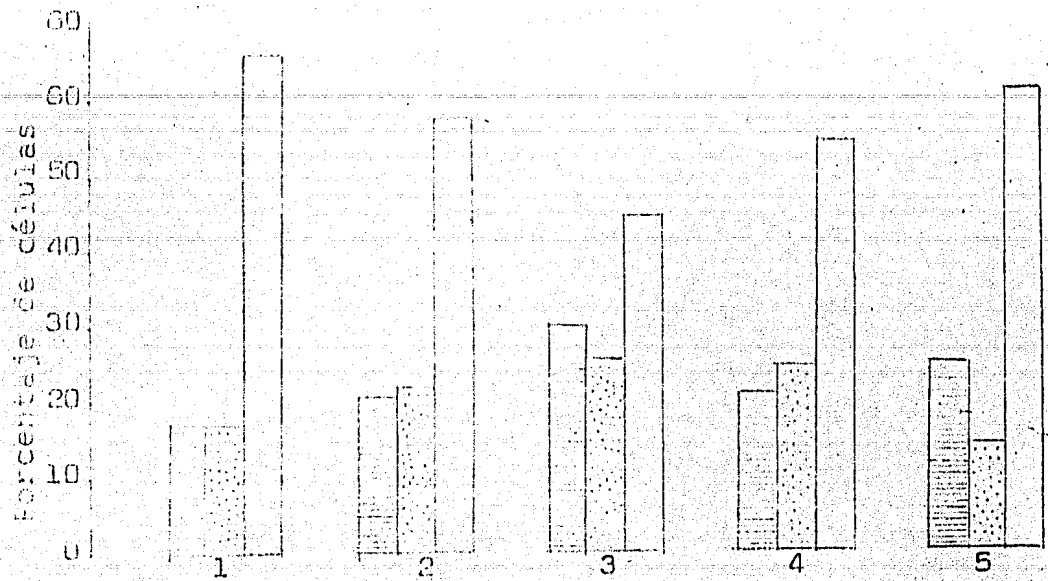
o significa menos de 5 esferas fagocitadas ó menos de 5 eritrocitos sobre la membrana del macrófago.

- significa que no hay respuesta de fagocitosis y formación de rosetas.

NC No se cuantificó por existir un muy bajo porcentaje de fagocitos.

TABLA 6. Cantidades de lisozima secretadas por células en cada banda o fracción. La cuantificación se realiza por espectrofotometría a 540 nm.

BANDA O FRACCION	μg Lisozima/cél.
1	1.34×10^{-5}
2	2.14×10^{-5}
3	1.09×10^{-5}
5	3.00×10^{-6}
1	23.30×10^{-7}
2	14.72×10^{-7}
3	10.35×10^{-7}
4	6.78×10^{-7}
5	1.41×10^{-7}
6	—



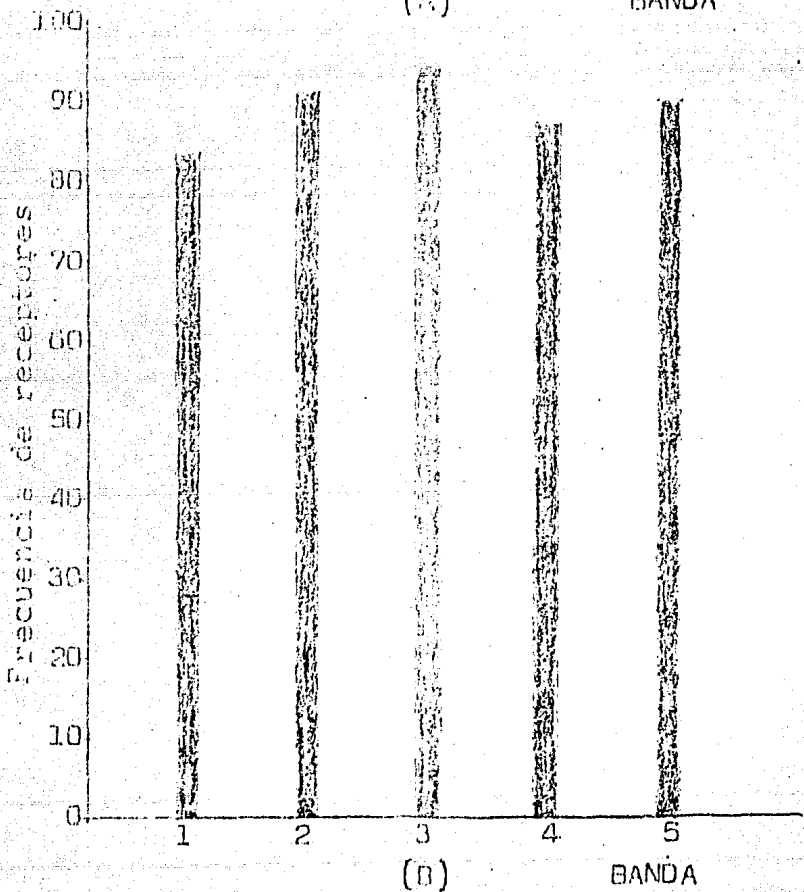
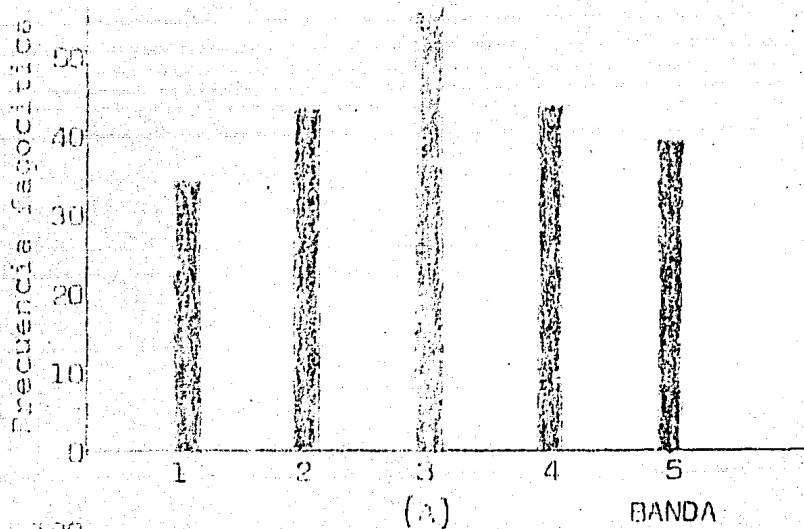
(A)



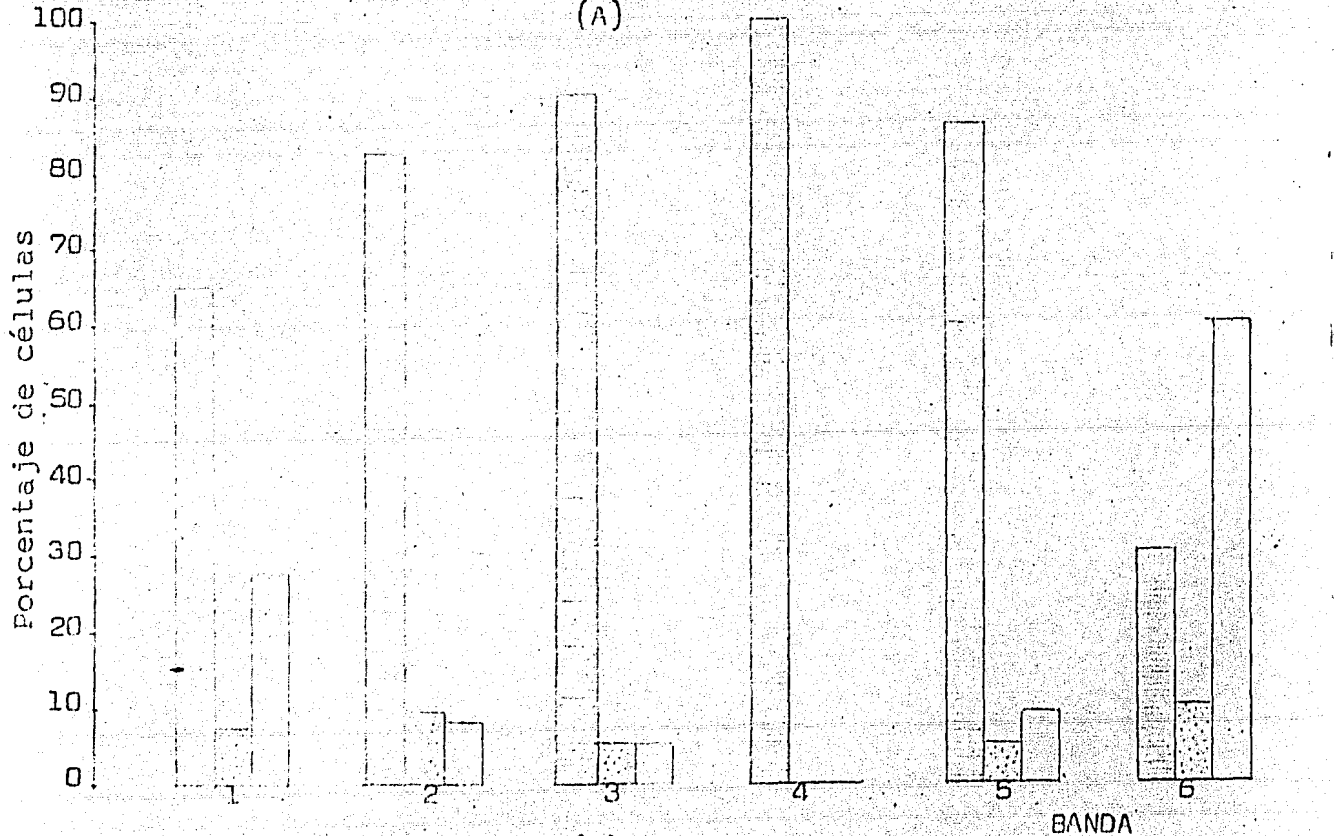
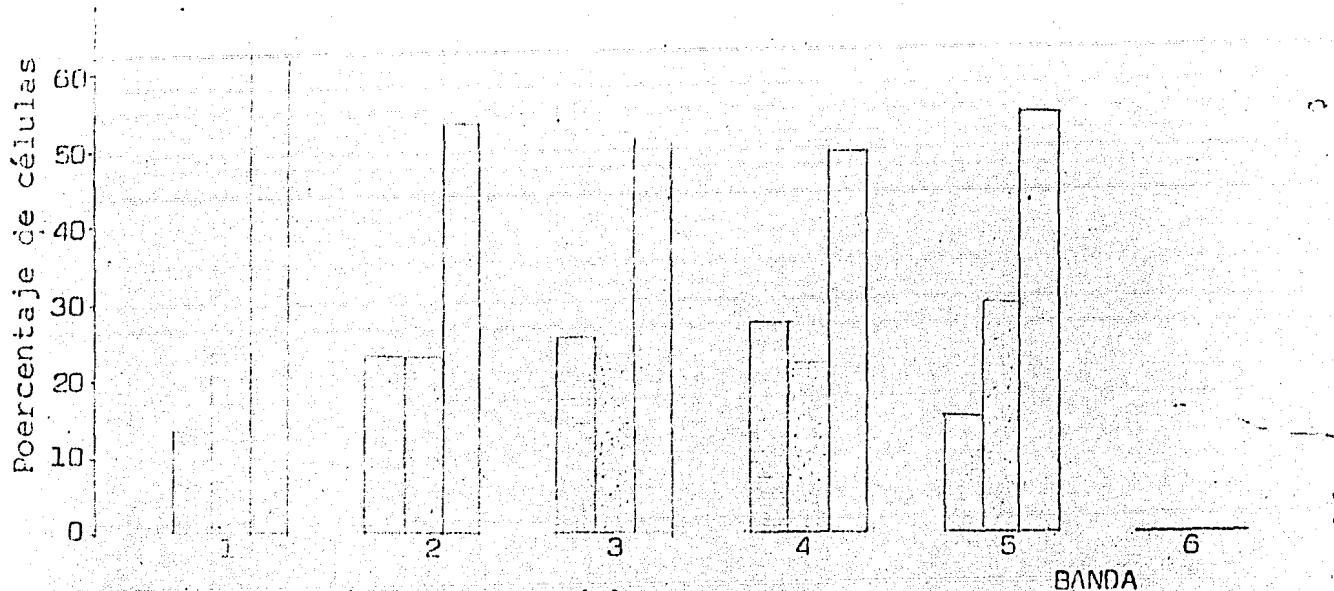
(B)

5 o más esferas ó eritrocitos
 menos de 5
 no hay respuesta

GRAFICA No. 10. RESPUESTA DE LAS CELULAS DE CADA UNA DE LAS BANDAS PARA EL GRADIENTE DISCONTINUO; (A). PARA LA PROPIEDAD FAGOCITICA; (B). PARA LA FORMACION DE ROSETAS. EA.

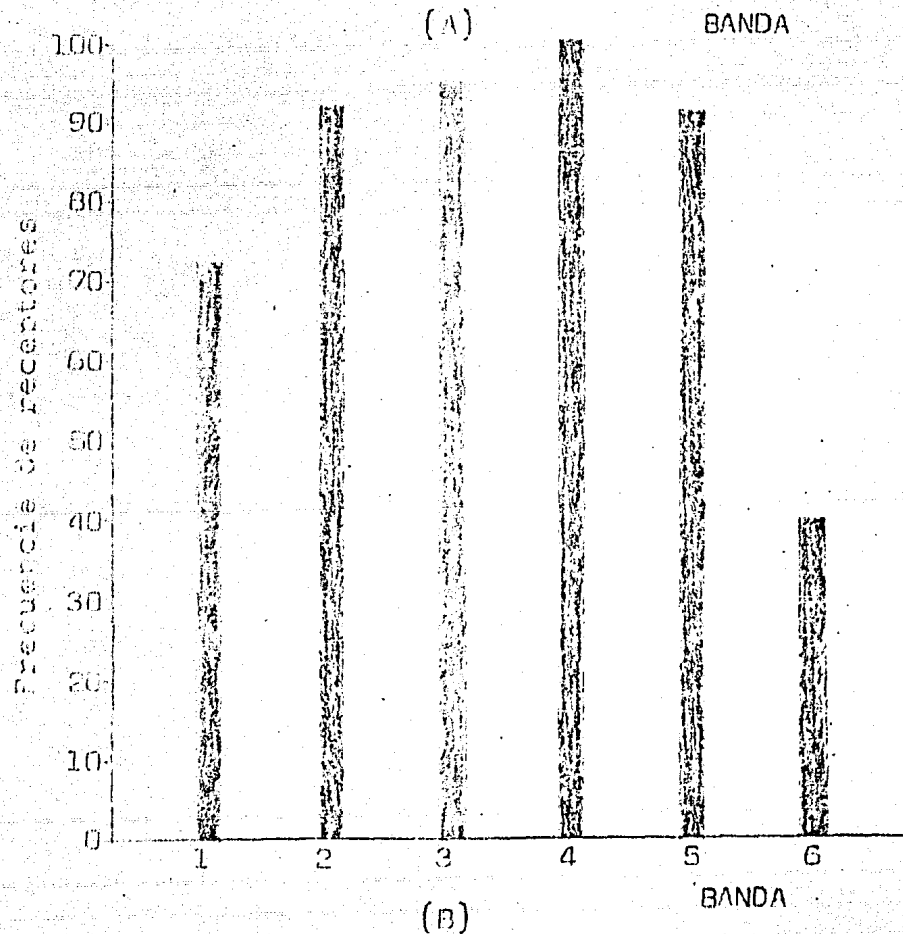
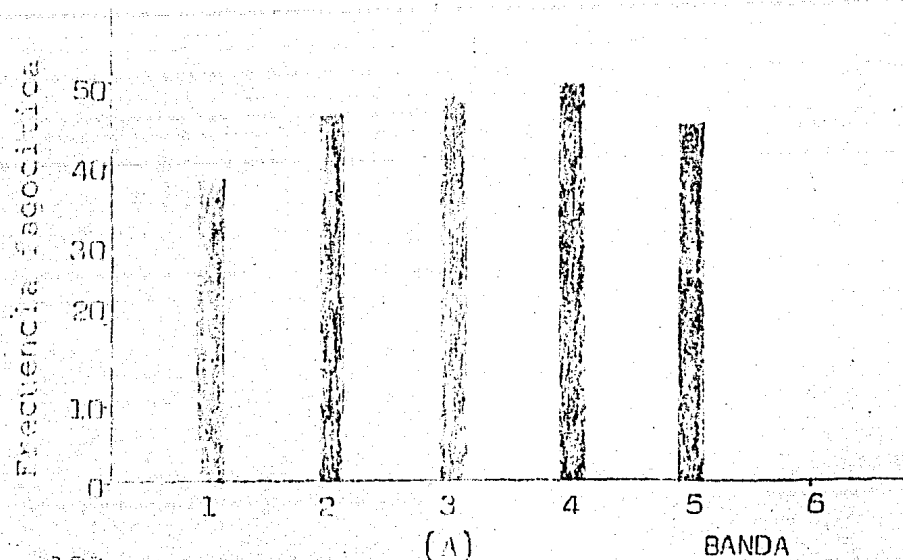


GRAFICA No. 11. RESPUESTA DE LAS CELULAS DE CADA UNA DE LAS BANDAS PARA EL GRADIENTE DISCONTINUO; (A). PARA LA PROPIEDAD FAGOCITICA; (B). PARA LA FORMACION DE ROSETAS CO EA.



5 o más esferas ó eritrocitos
 menos de 5
 no hay respuesta
 GRAFICA No. 12. RESPUESTA DE LAS CELULAS DE CADA UNA DE LAS BANDAS PA+

RA EL GRADIENTE CONTINUD; (A). PARA LA PROPIEDAD FAGOCITICA;
 (B). PARA LA FORMACION DE ROJETAS CON EA.



GRAFICA No. 13. RESPUESTA DE LAS CELULAS DE CADA UNA DE LAS BANDAS PARA EL GRADIENTE CONTINUO; (A). PARA LA PROPIEDAD FAGOCITICA. (B). PARA LA FORMACION DE ROSETAS CON EA.

VIII. DISCUSION

La técnica empleada para la obtención de las células de la cavidad peritoneal inducidas mediante una reacción inflamatoria con caseinato de sodio, en éste trabajo, proporcionó una metodología muy útil para la obtención de diferentes leucocitos con poca mezcla de otros tipos celulares, pues durante las primeras horas la colecta celular es casi exclusivamente de la línea granulocítica; en tanto que al cuarto día de inducción la población es sobre todo de fagocitos mononucleares. La mayoría de los fagocitos mononucleares son probablemente derivados de monocitos de sangre periférica que recientemente llegan a la cavidad peritoneal durante la reacción inflamatoria y no de macrófagos residentes, ya que estos últimos normalmente no pueden dividirse, esto garantiza una uniformidad en la población de células. El aumento detectado en la población de células linfoides puede deberse no solo al fenómeno de quimiotaxis, sino a la proliferación (Rosenthal et al 1978) y maduración inducida por macrófagos, a través del factor de diferenciación de timocitos (TDF) que por lo menos in vitro induce a la maduración funcional de los linfocitos T (Beller and Unanue 1977, Beller et al 1978). Para apoyar ésta suposición sería necesario estudiar si el incremento de linfocitos en éste proceso inflamatorio se debe exclusivamente a los linfocitos T. Por otra parte, es de importancia el hecho de que el porcentaje de macrófagos, del total que migra a la cavidad, presenta un aumento de tipo exponencial, similar al porcentaje de granulocitos que desaparece (gráfica 2), lo que sugiere la existencia de un mecanismo en el organismo que controla inversamente la proliferación de em

VIII. DISCUSION

La técnica empleada para la obtención de las células de la cavidad peritoneal inducidas mediante una reacción inflamatoria con caseinato de sodio, en éste trabajo, proporcionó una metodología muy útil para la obtención de diferentes leucocitos con poca mezcla de otros tipos celulares, pues durante las primeras horas la colecta celular es casi exclusivamente de la línea granulocítica; en tanto que al cuarto día de inducción la población es sobre todo de fagocitos mononucleares. La mayoría de los fagocitos mononucleares son probablemente derivados de monocitos de sangre periférica que recientemente llegan a la cavidad peritoneal durante la reacción inflamatoria y no de macrófagos residentes, ya que estos últimos normalmente no pueden dividirse, esto garantiza una uniformidad en la población de células. El aumento detectado en la población de células linfoides puede deberse no solo al fenómeno de quimiotaxis, sino a la proliferación (Rosenthal et al 1978) y maduración inducida por macrófagos, a través del factor de diferenciación de timocitos (TDF) que por lo menos in vitro induce a la maduración funcional de los linfocitos T (Beller and Unanue 1977, Beller et al 1978). Para apoyar ésta suposición sería necesario estudiar si el incremento de linfocitos en éste proceso inflamatorio se debe exclusivamente a los linfocitos T. Por otra parte, es de importancia el hecho de que el porcentaje de macrófagos, del total que migra a la cavidad, presenta un aumento de tipo exponencial, similar al porcentaje de granulocitos que desaparece (gráfica 2), lo que sugiere la existencia de un mecanismo en el organismo que controla inversamente la proliferación de am

dos tipos celulares; esto podría ser llevado a cabo por la proteina que induce a la proliferación de macrófagos y granulocitos conocida como MGI.

Por último dado que la población final de células (37.6×10^6) en la cavidad peritoneal de los ratones es mucho mayor que la inicial (3.3×10^6), esto indica que un tiempo después de la inducción, muchos de los leucocitos peritoneales que están presentes - al momento de la irrigación han sido reemplazados por células que recientemente acudieron a la cavidad, el arribo de la primera célula a la cavidad peritoneal tiene lugar a los 57 minutos aproximadamente (Gráfica 1).

Es bien sabido que la médula ósea es el sitio de rápida proliferación de las células sanguíneas, y que éstas van ocupando -- distintos compartimentos en la médula, siendo el último compartimento donde se almacenan las células que reemplazarán a las que - se encuentran en la sangre periférica en el momento que sea necesario. Según nuestros resultados, el número de células que se almacenan en el último compartimento es de 16×10^6 , mismo que se - duplica por proliferación activa en la médula aproximadamente a - las 67.5 horas .

Al intentar la separación de las células adheridas a las superficies de plástico y vidrio con agentes químicos, estos produjeron cambios morfológicos, con una pérdida de la adherencia, una disminución del grado de extendimiento, acompañada de una abundante muerte celular (más del 90% en muchos casos), esto sugiere que muchas de las funciones de las célula se vieron fuertemente alte-

radas al emplear procedimientos que implican la separación de las células del sustrato, lo cual puede interpretarse como evidencia de la importancia de la organización interna de las miofibrillas en los sitios de adhesión y en la organización general de la célula. Dicha organización se vió adversamente afectada por la colchicina al interferir con el citoesqueleto de la célula y por la ausencia de Ca^{++} y de Mg^{++} en el medio, y la acción complejante del EDTA al formar enlaces de coordinación con estos cationes divalentes presentes en la célula. El empleo de enzimas proteolíticas no mejora el rendimiento de células separadas, produciéndose solamente un incremento de vacuolización en las células adherentes, posiblemente como resultado de la ingestión de la enzima por parte de los fagocitos. Sin embargo, la muerte celular en éste caso fué más generalizada (más del 95%), lo cual puede interpretarse como daños en la organización interna, causados por la actividad proteolítica de la enzima que al ser ingerida alteró el funcionamiento normal de la célula, conduciéndola a su muerte.

Es importante señalar sin embargo, que la separación de las células tiene lugar a medida que se incrementa la dosis del agente examinado, y paralelamente a ésta separación se presenta el grado de muerte celular.

Esto permite obtener la siguiente conclusión: Toda célula que se separa del sustrato por los métodos aquí descritos tiene muy pocas probabilidades de sobrevivir, pues el proceso de separación produce alteraciones irreversibles en ellas, y por lo tanto no es recomendable utilizar éstas células en algún ensayo antes de 24 horas después del tratamiento.

Esta interpretación está apoyada por los resultados de numerosos tratamientos realizados en este trabajo que indican la pérdida de viabilidad y los bajos rendimientos de células separadas.

A diferencia de estos métodos la viabilidad de las células recuperadas de los gradientes continuos y discontinuos fué del 98% y del 95.5% respectivamente. Estos altos porcentajes indican la eficiencia de la técnica de separación celular por gradientes de densidad.

Las células obtenidas en cada densidad presentaron diferente grado de vacuolización, que disminuyó con la densidad del medio, lo que se explica por el hecho de que el contenido acuoso de las vacuolas es más diluido, y por tanto, menos denso que el citoplasma circundante, alterandose la densidad total de la célula, el mismo comportamiento de disminución en la actividad respecto a la densidad fué observado para la actividad fagocítica y para la capacidad de formación de rosetas EA, pudiendose concluir, en general que a mayor densidad de la célula menor es su actividad funcional.

Respecto a las dos propiedades antes descritas, el punto máximo de actividad para el gradiente continuo se observó en las células de la fracción 4, y en la banda 3 del discontinuo, ambos con densidad de 1.3435.

Si asociamos que mientras más maduros los macrófagos menor es su densidad y mayor su grado de fagocitosis y formación de rosetas EA, entonces la disminución de éstas propiedades funcionales, en los fagocitos de las bandas menos densas que la óptima en cada gradiente, se podría interpretar como que una gran cantidad

de membranas celulares fué interiorizada al formarse las vacuolas que aumentan en las densidades más bajas. Es posible que en nuestro caso las vacuolas correspondan a Percoll fagocitado.

Los resultados indican que los macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones estimulados no están formados por grupos funcionalmente distintos, es decir, que según los indicadores analizados en éste trabajo (grado de vacuolización, adherencia, intensidad de la respuesta fagocítica, receptores para Fc y secreción de lisozima) no existe en conjunto una diferencia funcional cualitativa entre los fagocitos encontrados con diferentes densidades, sino que más bien, una intensidad variable de éstas propiedades según la densidad. Esto es debido, a que los macrófagos de la cavidad peritoneal probablemente son una población funcionalmente homogénea con un conjunto de propiedades unitarias que las definen y en consecuencia las diferencias observadas, serían función del grado de maduración en el que se encuentren éstas células.

Si comparamos las técnicas de separación por gradientes de densidad para determinar cual es la mejor, observamos que la densidad de las células de la banda 4 del gradiente discontinuo se vio alterada al centrifugarse posteriormente en el gradiente continuo, produciéndose regiones de densidad igual o menor a la del gradiente discontinuo. Esto puede deberse a la mayor ingestión de Percoll y a la formación de un mayor número de vacuolas, lo cual indica ya sea que las células al estar activadas continúan fagocitando Percoll o que la separación efectuada con el gradiente discontinuo no haya sido eficaz.

En consecuencia los resultados muestran que el gradiente con

tínuo es superior pues permite hacer una separación de las células más fina, ya que la centrifugación del Percoll al 40% a altas velocidades generó espontáneamente un gradiente cuyos índices de refracción van desde 1.3355 en la parte superior del gradiente, hasta 1.3620 en la inferior, rango en el cual están contenidos los valores empleados en el gradiente discontinuo, pudo observarse además que la banda 4 del gradiente discontinuo en realidad tenía un 11.4% de otros tipos celulares distintos a los macrófagos y no un 5% como se evaluó inicialmente.

Por último siendo que al utilizar tanto los gradientes continuos como discontinuos se obtuvo en ambos casos aproximadamente el 30% de las células en la densidad de 1.3435, se puede considerar que es este valor de densidad el que deba de ser asociado con los macrófagos estimulados de la cavidad peritoneal, aunque no hay que perder de vista que en este trabajo se utilizó caseinato de sodio para atraer a los fagocitos a dicha cavidad y que al usarse otro irritante el valor aquí encontrado pudiese cambiar.

En resumen la literatura reporta que empleando la propiedad de adherencia, se obtienen rendimientos de hasta 80% de recuperación, elevada pureza (de 60 a 100%), viabilidad (95%) y actividad, demostrada por varias pruebas. Sin embargo éstas pruebas se realizan en tiempos que oscilan entre 30 minutos y 2 horas después de realizada la separación. En nuestro caso las separaciones de las células adheridas en las superficies de las cajas Petri por los distintos tratamientos mostraron según nuestro criterio un buen estado de viabilidad 30 minutos después de separadas, incrementándose la muerte celular a medida que transcurre el tiempo encan---

tranda que a las 24 horas el porcentaje de células viables es muy bajo (10% o menor), y no es recomendable usarlas para algún ensayo antes de dicho tiempo.

En este trabajo se encontró que la mejor técnica de separación es por gradientes de centrifugación de Percoll, aprovechando la tasa de sedimentación diferencial que presentan las células. Por medio de ésta técnica se obtienen altos porcentajes en la viabilidad de las células (85.5% para el gradiente discontinuo y 98% en el continuo), alta recuperación (80 y 90.5% respectivamente a los gradientes antes citados) y grados de pureza de 100% en varias bandas para ambos gradientes.

Se encontró que por medio de los gradientes de centrifugación de Percoll, es posible hacer la separación de las células de la cavidad peritoneal de ratones estimulados en fracciones de distinta densidad, cada fracción presentó una intensidad variable a la respuesta para fagocitar esferas de latex, en su capacidad para formar rosetas EA y secreción de lisozima, esto hace pensar en que los macrófagos de la cavidad son una población homogénea - cuyas diferencias en la intensidad a las propiedades medidas se debe a distinto grado de maduración o activación.

- Por lo tanto éste trabajo abre las posibilidades de estudio del mecanismo de la activación celular en éste tipo de células, - sin embargo no hay que perder de vista que in vivo éste tipo de células recibe influencias locales que influyen en su funcionalidad (Hopper et al 1979), por lo que es recomendable realizar éste tipo de estudios con macrófagos provenientes de distintos órganos fuente.

APENDICE I

COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO
EAGLE'S MODIFICADO

COMPUESTO	mg/lt
CaCl ₂ anhidro	200.00
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0.10
KCl	400.00
MgSO ₄ anhidro	97.67
NaCl	6400.00
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	125.00
Glucosa	4500.00
Rojo Fenol	15.00
L-Arginina HCl	84.00
L-Cistina 2HCl	62.57
L-Glutamina	584.00
Glicina	30.00
L-Histidina HCl·H ₂ O	42.00
L-Isoleucina	105.00
L-Leucina	105.00
L-Lisina HCl	146.00
L-Metionina	30.00
L-Fenilalanina	66.00
L-Serina	42.00
L-Treonina	95.00
L-Triptófano	16.00
L-Tirosina (sal disódica)	104.20
L-Valina	94.00
D-Pantotenato de Calcio	4.00
Cloruro de Colina	4.00
Acido fólico	4.00
L-Inositol	7.20
Nicotinamida	4.00
Piridoxal HCl	4.00
Riboflavina	0.40
Tiamina HCl	4.00

Nota: El pH de la solución se ajusta a 7.2 y se esteriliza por medio de un filtro Millipore de 0.22 μ .

APENDICE II

COMPOSICION DE LA SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATO
(PBS)

COMPUESTO	g/lit
Cloruro de sodio (NaCl)	8.00
Cloruro de potasio (KCl)	0.20
Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.10
Cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.10
Fosfato dibásico de sodio dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1.15
Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)	0.20
Fase gaseosa	aire

Nota: El pH de la solución se ajusta a 7.2 y se esteriliza por medio de un filtro Millipore de 0.22 μ .

APENDICE III

COMPOSICION DEL PBS LIBRE DE Ca^{+2} Y Mg^{+2}

COMPUESTO	g/lt
Cloruro de sodio (NaCl)	8.03418
Cloruro de potasio (KCl)	0.24361
Fosfato dibásico de sodio dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1.74173
Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)	0.20000
Fase gaseosa	aire

Nota: El pH de la solución se ajusta a 7.2 y se esteriliza por medio de un filtro Millipore de 0.22 μ .

APENDICE IV

PRODUCTOS SECRETADOS POR LOS FAGOCITOS MONONUCLEARES

ENZIMAS	METABOLITOS REACTIVOS DE OXIGENO
Lisozima	Superóxido
Proteasas neutrales	Peróxido de hidrógeno
Activador de plasminógeno	Radical hidroxilo
Colagenasa	Oxígeno 'Singlet'
Elastasa	LIPIDOS BIOACTIVOS
Angiotensina-convertasa	Metabolitos araquidonatos
Hidrolasas ácidas	Prostaglandina E ₂
Proteasas	6-ceto-Prostaglandina F ₁
Lipasas	Tromboxano
(desoxi) Ribonucleasas	Leucotrieno
Fosfatases	Acidos hidroxi-eicosatetraenoico
Glucosidasas	Factores activadores de plaquetas
Sulfatasas	FACTORES QUIMIOTACTICOS PARA NEUTROFILOS
Arginasa	FACTORES REGULADORES DE SINTESIS DE PRO-
COMPONENTES COMPLEMENTO	TEINAS POR OTRAS CELULAS
G ₁ - G ₅	Hepatocitos
Factor B	Amiloide A del suero
Factor D	Haptoglobina
Properdin	Células de la cubierta sinovial
Inactivador C 3b	Colagenasa
IH	FACTORES PROMOTORES DE REPLICACION DE:
INHIBIDORES DE ENZIMAS	Linfocitos (factores linfocito-activador)
Inhibidores de plasmina	Precursores mieloides (factores colonia-
2-Macroglobulina	estimuladores)
PROTEINAS DE ENLACE	Precursores eritroides
Transferrina	Fibroblastos
Transcobalamina II	Microvascularización
Fibrinectina	FACTORES INHIBIDORES DE REPLICACION DE:
NUCLEOSIDOS Y METABOLITOS	Linfocitos
Timidina	Células tumorales
Uracilo	Virus (interferon)
Acido úrico	<u>Listeria monocytogenes</u>
PIROGENOS ENDOGENOS	

Fuente: Nathan et al 1980

APENDICE V

CARACTERISTICAS DE LOS MATERIALES PARA LA ELABORACION DE GRADIENTES

RENODGRAFIN

Ventajas: Alta densidad y baja viscosidad, no es toxico, no produce agregación de las células, es estable, fácilmente obtenible en ampulas estériles y no es costoso.

Desventajas: Alta osmolaridad (1 500 mOs) por lo que las células -- centrifugadas en Renografin son reducidas en volumen y se incrementa su densidad.

ALBUMINA

Ventajas: Medio de viscosidad baja que ofrece un efecto protector a las células y reduce la agregación.

Desventajas: Difícil de preparar, costoso, susceptible de contaminarse, se desnaturaliza con relativa facilidad, osmolaridad variable entre organismos de la misma especie y entre especies diferentes.

FICOLL

Ventajas: Tratándose de un polímero de sacarosa, es estable, fácil de manejar y forma soluciones claras, es una molécula no cargada -- no enlaza iones de la solución y por tanto no afecta la osmolaridad del medio.

Desventajas: Alta viscosidad, las células se agregan y su osmolaridad es variable.

SILICA COLOIDAL

Ventajas: Baja viscosidad, bajo costo, sus propiedades se conservan en lotes diferentes.

Desventajas: Es tóxico para las células.

APENDICE VI

MEDICION DE LA LISOZIMA

Preparación de las soluciones A y B.

SOLUCION A.

3.68 g de fosfato diácido de sodio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) en 400 ml de agua bidestilada.

SOLUCION B.

3.78 g de fosfato monoácido de sodio (Na_2HPO_4) en 400 ml de agua bidestilada.

Solución A y B se mezclan en la siguiente proporción: tres volúmenes de A más uno de B se agitan y se ajusta el pH de la mezcla a un valor de 6.3, posteriormente, se adicionado 33.2 mg (por cada 100 ml) de polvo de Micrococcus lisodecticus por cada 100 ml de la mezcla y se deja reposar durante cuatro horas mínimo a una temperatura de 4°C.

SOLUCION C.

250 ml de solución de cloruro de sodio 0.3 M.

PRUEBA:

Se agregan con pipetas diferentes:

0.5 ml de cloruro de sodio.

1.5 ml de solución de bacterias.

1.0 ml de medio a probar.

Y se lee en el espectrofotometro a 540 nanometros una vez calibrado el aparato.

B I B L I O G R A F I A

- Abramson, S., R.G. Miller, and R.A. Phillips, 1977. The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *J. Exp. Med.* 145: 1567-1579.
- Ackerman, S.K., and S.D. Douglas, 1978. Purification of human monocytes on microexudate-coated surfaces. *J. Immunol.* 120: 1372-1374.
- Adams, D.O., and R. Snyderman, 1979. Do macrophages destroy nascent tumors?. *J. Natl. Cancer Inst.* 62: 1341-1345.
- Afzal Mir, M., 1977. Lysozyme: A brief review. *Postgrad. Med. J.* 53: 257-288.
- Alexander, M.D., J.A. Andrews, R.G.Q. Leslie, and N.J. Wood. 1978. The binding of human and Guinea-Pig IgG subclasses to homologous macrophage and monocyte Fc receptors. *Immunol.* 35: 115-123.
- Alpert, S.E., H.S. Averbach, F.S. Cole and H.R. Colten, 1983. Macrophage maturation: Differences in complement secretion by marrow, monocyte, and tissue macrophages detected with an improved hemolytic plaque assay. *J. Immunol.* 130: 102-107.
- Anderson, C.L. and G.N. Abraham, 1980. Characterization of the Fc receptor for IgG on the human macrophage cell line U 937. *J. Immunol.* 125: 2735-2741.

- Anderson, C.L. and H.M. Grey, 1978. Physicochemical separation of two distinct Fc receptors on murine macrophage-like cell lines. *J. Immunol.* 121: 648-652.
- Anderson, C.L. and H.L. Spiegelberg, 1981. Macrophage receptors - for IgE: Binding of IgE to specific IgE receptors on a human - macrophage cell line U 937. *J. Immunol.* 126: 2470-2473.
- Arnaud-Battandier, F., E.C. Laurence, R.M. Blaese, 1980. Lymphoid populations of mucosa in chickens. *Dig. Dis. Sci.* 25: 252-259.
- Bach, M.K., and J.R. Brashler, 1970. Isolation of subpopulations of lymphocytic cells by the use of isotonicly balanced solutions of Ficoll. I. Development of methods and demonstration - of the existence of a large but finite number of subpopulations. *Exp. Cell. Res.* 61: 387-396.
- Basten, A. and J. Mitchell, 1976. Role of macrophages in T cell - B cell collaboration in antibody production. In *Immunobiology of the macrophage*. Ed. D.S. Nelson, Academic Press New York, pp. 45-90.
- Backer, A. J., E.A. McCulloch, J.E. Till, 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature.* 197: 452-455.
- Begomann, R.K., 1974. *Hematologia Clínica*. Ed. Científico-Médico Barcelona. pp. 164-196.
- Beller, D.I., and E.R. Unanue, 1977. Thymic maturation in vitro by a secretory product from macrophages. *J. Immunol.* 118: 1780-1787.

- Galler, D.I., A.G. Farr., and E.R. Unanue, 1978. Regulation of lymphocyte proliferation and differentiation by macrophages. Fed. Proc. 37: 91-96.
- Biggar, W.D., J.M. Sturgess., 1977. Role of Lysosyme in the microbicidal activity of rat alveolar macrophages. Infect. Immunol. 16: 974-982.
- Binz, H. and H. Wigzell, 1981. T cell receptors with allo-major histocompatibility complex specificity from rat and mouse. J. Exp. Med. 154: 1261-1278.
- Bont, W.S., J.E. de Vries, M. Gall, A.V. Dongen, and H.A. Loos, 1979. Separation of human lymphocytes and monocytes by velocity sedimentation at unit gravity. J. Immunol Meth. 29: 1-16.
- Bradley, T.R. and D. Metcalf, 1966. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 44: 287-300.
- Brandt, L., J. Børgeson, A. Norden, and I. Olsson, 1962. Separation of lymphocytes from peripheral blood by means of a glass wool column. Acta Med. Scand. 172: 459-462.
- Cohn, Z.A., 1968. The differentiation of macrophages. In Differentiation and Immunology. Ed. K.D. Warren New York and London - Academic Press. pp. 78-96.

- Cohn, Z.A., 1978. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future. *J. Immunol.* **121**: 813-816.
- Cline, M.J., N.L. Warner and D. Metcalf, 1972. Identification of the bone marrow colony mononuclear phagocyte as a macrophage. *Blood.* **39**: 326-330.
- Cole, F.S., E.E. Schneeberger, N.A. Lichtenberg, and H.R. Colten, 1982. Complement biosynthesis in human breast-milk macrophages and blood monocytes. *Immunol.* **46**: 429-437.
- Cole, F.S., T.H. Rossing, W.J. Matthews, D.J. Gash, N.L. Shtela, and J.E. Pennington, 1982. Complement biosynthesis in human - tissue macrophages. *Fed. Proc.* **41**: 732-732.
- Curry, J.L., J.J. Trentin, U. Cheng, 1967. Hematopoietic 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.
- Davies, D. and Allison A., 1976. Secretion of macrophages enzymes in relation to the pathogenesis of chronic inflammation. In: *Immunobiology of the macrophage.* In Ed. D.S. Nelson, Academic Press New York. pp. 427-461.
- Day, R.P., 1972. Basophil leucocyte separation from human peripheral blood a technique for their isolation in high purity and - high yield. *Clin. Allergy.* **2**: 205-212.
- Dexter, T.H. and N.G. Testa, 1980. In vitro methods in haemopoiesis and lymphopoiesis. *J. Immunol. Meth.* **38**: 177-190.

- Edelson, P.J., and Z.A. Cohn, 1976. In vitro methods in cell-mediated and tumor immunity. Eds. D.R. Bloom and J.R. David, Academic Press, New York p. 333.
- Edwards, G.E., R.G. Miller, and R.A. Phillips, 1970. Differentiation of rosette-forming cells from myeloid stem cells. *J. Immunol.* 105:719-729.
- Evans, R., and P. Alexander, 1976. Mechanism of extracellular killing of nucleated cells by macrophages. In *Immunobiology of the macrophage*. Ed. D.S. Nelson, Academic Press New York. pp. 535-555.
- Fleige, U., B. Overwien, and C. Sorg, 1982. Purification of human blood monocytes by hypotonic density gradient centrifugation in Percoll. *J. Immunol. Meth.* 54:309-315.
- Ferrante, A., and Y.H. Thong, 1982. Separation of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the one-step-Hypaque-Ficoll method is dependent on blood column height. *J. Immunol. Meth.* 48:81-85.
- Fischette, V.A., 1983. Requirements for the opsonic activity of human IgG directed to type N° 6 group A Streptococci: Net basic charge and intact Fc region. *J. Immunol.* 130:896-902.
- Fuks, A.J., 1981. Three-step isolation of human blood monocytes using discontinuous density gradients of Percoll. *J. Immunol. Meth.* 41:225-233.

- Fox, H.A., D.S. Gregory, and J.D. Falman, 1974. Macrophage receptor for migration inhibitory factor (MIF), migration stimulatory factor (MSF), and agglutinating factor. *J. Immunol.* 112:1867-1872.
- Friedman H., 1978. Macrophages in immunity--concluding remarks and general summary. *Fed. Proc.* 37:102-103.
- Fulop, G., J. Gordon, and D.R. Osmond, 1983. Regulation of lymphocyte production in the bone marrow. I. Turnover of small lymphocytes in mice depleted of B lymphocyte by treatment with anti-IgM Antibodies. *J. Immunol.* 130: 644-648.
- Gee, J.B.L., C.A. Stevens and L.M. Hinman, 1980. Inhibition by rifampin of clastose and lysozyme secretion in mouse peritoneal macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 29: 3039-3042.
- Gorczynski, R.M., R.G. Miller and R.A. Phillips, 1970. Homogeneity of antibody-producing cells as analysed by their bouyant density in gradients of ficoll. *Immunol.* 19: 817-829.
- Gordon, S., J. Todd and Z.A. Cohn, 1974. In vitro synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 139: 1228-1248.
- Gordon, S., J.C. Unkeless, Z.A. Cohn, 1975. In The macrophage as a secretory cell. *Immune recognition*. Ed. Rosenthal, Academic Press, New York. pp. 598-614.
- Grdina, D.J., L. Milas, R.R. Hewitt and H.R. Withers, 1973. Bouyant density separation of human blood cells in renografin gradients. *Exp. Cell. Res.* 81: 250-254.

- Haefliger-Cavillon, N., M. Klein and K.J. Dorrington, 1979. Studies on the Fc receptor of the murine macrophage-like line -- P 388 D₁. I. The binding of homologous and heterologous immunoglobulin G. *J. Immunol.* 123: 1905-1913.
- Hard, G.C., 1970. Some biochemical aspects of the immune macrophage. *J. Exp. Pathol.* 51: 97-105.
- Hardin, J.A. and J.T. Downs, 1981. Isolation of human monocytes -- on reorienting gradients of Percoll. *J. Immunol. Meth.* 40:1-6.
- Hartmann, D.W., M.A. Entringer, W.A. Robinson, M.L. Vasil, G.J. -- Drebing, N.J. Morton and L. True, 1981. Regulation of granulopoiesis and distribution of granulocytes in early phase of bacterial infection. *J. Cell. Physiol.* 109: 17-24.
- Heusser, C.H., G.L. Anderson and H.M. Grey, 1977. Receptors for -- IgG: subclass specificity of receptors of different mouse cell types and the differentiation of two distinct receptors on a macrophage cell line. *J. Exp. Med.* 145: 1316-1327.
- Holland, P., N.H. Holland and Z.A. Cohn, 1972. The selective inhibition of macrophage phagocytic receptors by anti-membrane antibodies. *J. Exp. Med.* 135: 458-475.
- Hopper, K.E., P.R. Wood and D.S. Nelson, 1979. Macrophage heterogeneity. *Vox Sanguinis*, 36: 257-274.
- Imoto, T., L.N. Johnson, A.C.T. North, D.C. Phillips and J.A. -- Hupley, 1972. In *Vertebrate lysozymes*. Ed. P.D. Boyer. Academic Press, New York, 3rd Ed. 7: 665-868.

Ishizaka, T., and K. Ishizaka, 1978. Triggering of histamine release from rat mast cells by divalent antibodies against IgE-Receptors. *J. Immunol.* 120: 800-805.

Kuplan, A.M., J. Brown, J.M. Collins, P.S. Morahan and M.J. Snodgrass, 1978. Mechanism of macrophage-mediated tumor cells cytotoxicity. *J. Immunol.* 121: 1781-1789.

Kornovsky, M.L., S. Simmons, E.A. Glass, A.W. Shafer and P.D. Hart, 1978. Metabolism of macrophages. In *Mononuclear phagocytes*. Ed. Van Furth, Blackwell Scientific Publications, Oxford Edinburgh, and Melbourne. pp. 103-120.

Kornovsky, M.L., J. Lazdins and S.R. Simmons, 1975. Metabolism of activated mononuclear phagocytes at rest and during phagocytosis. In *mononuclear phagocytes in immunity*. In *Infection and pathology*. Ed. Van Furth, Blackwell Scientific Publications Oxford, Edinburgh, and Melbourne. pp. 423-435.

Kornovsky, M.L., J. Lazdins, D. Drath and A. Harper, 1975. Biochemical Characteristics of activated macrophages. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 256: 266-274.

Kornovsky, M.L. and J.K. Lazdins, 1979. Biochemical criteria for activated macrophages. *J. Immunol.* 121: 809-813.

Keller, R., 1976. Cytostatic and cytotoxic effects of activated macrophages. *Immunobiology of the macrophage*. Ed. D.S. Nelson, Academic Press, New York. pp. 487-508.

- Kinoshita, Y., S. Kimura, T. Takeshita, E. Kimura, M. Yukioka and M.S. Morisawa, 1970. Isolation of Heterogeneous lymphocytes - According to their cellular densities by multilayer centrifuga- tion and detection of the separated fraction containing the im- munological memory cells. *Exp. Cell. Res.* 59: 299-306.
- Klinkert, W.E.F., J.H. LaBadie and W.E. Bowers, 1982. Accessory - and stimulating properties of dendritic cells and macrophages isolated from various rat tissues. *J. Exp. Med.* 156: 1-19.
- Klockars, M. and Reitamo S., 1975. Tissue distribution of lysozyme in man. *J. Histochem. Cytochem.* 23: 932-940.
- Kondo, E. and K. Kanai, 1977. Phospholipid distribution pattern in uninduced (resident) and casein-induced mouse peritoneal -- cells. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* 30: 269-273.
- Kumagai, K., K. Itoh, S. Hinuma and M. Tada, 1979. Pretreatment - of plastic petri dishes with fetal calf serum. A simple method for macrophage isolation. *J. Immunol. Meth.* 29: 17-25.
- Larrick, J.W., D.G. Fischer, S.J. Anderson, H.S. Koran, 1980. Cha- racterization of a human macrophage-like cell-line stimulated in vitro: a model of macrophage functions. *J. Immunol.* 126: 6-12.
- Lenke, E.S., O. Gonzalez-Ojeda and Q.N. Myrvik, 1964. Enzymatic differences between normal alveolar macrophages and Oil-in -- Fluenced peritoneal macrophages obtained in the rabbits. *Exp. Cell. Res.* 33: 553-561.

- Lee, K.C., and D. Berry, 1977. Functional heterogeneity in macrophages activated by corynebacterium parvum: Characterization of subpopulations with different activities in promoting immune response and suppressing tumor cell Growth. *J. Immunol.* - **118**: 1530-1540.
- Lee, K.C., 1980. On the origin and mode of action of functionally distinct macrophage subpopulations. *Mol. Cell Biochem.* - **30**: 39-55.
- Lee, K.C., M. Wong and D. McIntyre, 1981. Characterization of macrophage subpopulation responsive to activation by endotoxin and lymphokinesis. *J. Immunol.* **126**: 2474-2479.
- Leibovich, S.J. and R. Roos, 1975. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am. J. Path.* **78**: 71-100.
- Leu, R.W., A.L.W.F. Eddleston, J.W. Hadden and R.A. Good, 1972. Mechanism of action of migration inhibitory factor (MIF). I. Evidence for a receptor for MIF present on the peritoneal macrophage but not on the alveolar macrophage. *J. Exp. Med.* - **136**: 569-583.
- Lohmann-Matthes M.L., H. Lang and D. Sun, 1982. Macrophage as cytotoxic effector cell. *Immunobiol.* **161**: 401-407.
- Loos, J.A. and D. Roos, 1974. Ficoll-Isopaque gradients for the determination of density distributions of human blood lymphocytes and other reticulo-endothelial cells. *Exp. Cell. Res.* **86**: 333-341.

- Lotem, J. and L. Sachs, 1974. Different blocks in the differentiation of myeloid leukemic cell. Proc. Natl. Acad. Sci. 71: 3507-3511.
- Marino, P.A., G.C. Whisnant and D.O. Adams, 1981. Binding of bacillus calmette-guerin-activated macrophages to tumor targets. Selective inhibition by membrane preparation from homologous and heterologous neoplastic cell. J. Exp. Med. 154: 77-87.
- McCarthy K.F. and T.J. MacVittie, 1978. Velocity sedimentation studies on monocyte-macrophage colony-forming cells. from Marrow, Spleen, Blood and Peritoneal Exudate. J. Reticuloendothelial Soc. 24: 263-269.
- McDonal, H.R., G.P. Bonnard, B. Sordat and S.A. Zarvodnik, 1975. Antibody-Dependent cell-mediated cytotoxicity: heterogeneity of effector cells in human peripheral blood. Scand. J. Immunol. 4: 487-497.
- Melawicz, F.M., J.M. Plummer and H.L. Spiegelberg, 1982. Comparison of the Fc receptors for IgG on human lymphocytes and monocytes. J. Immunol. 129: 563-569.
- Micklem, H.S., N. Anderson and E. Ross, 1975. Limited potential of circulating haemopoietic stem cells. Nature. 256: 41-43.
- Moller, G. and K. Hiesche, 1970. Fractionation of immunocompetent spleen cells by albumin density gradient centrifugation. Immunol. 18: 585-594.

- Mandiello, G., T. Pizzella, M. Russo and B. Galanti, 1981. Esterase staining of monocytes in suspensions of ficoll-paque -- isolated mononuclear cells. *J. Immunol. Meth.* 52: 111-114.
- Nathan, R., L. Brukner, G. Kaplan, J. Orkeles and Z. Gohn, 1980. Role of activated macrophages in antibody- dependent lysis of tumor cells. *J. Exp. Med.* 152: 183-197.
- Nowell, S.L. and J.P. Atkinson, 1983. Biosynthesis of C4 by mouse peritoneal macrophages II. Comparison of C4 synthesis by -- resident and elicited cell populations. *J. Immunol.* 130: -- 834-838.
- Norris, D.A., R.M. Morris, R.J. Sanderson and P.F. Kohler, 1979. Isolation of functional subsets of human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 123: 166-172.
- North, G.J., 1978. The concept of the activated macrophage. *J. Immunol.* 121: 806-809.
- Nowell, P.C., E.E. Hirsch, D.H. Fox and D.B. Wilson, 1970. Evidence for the existence of multipotential lymphohematopoietic stem cells in the adult rat. *J. Cell. Physiol.* 75: 151-158.
- Oppenheim, J. and R.C. Seeger, 1976. The role of macrophages in the induction of cell-mediated immunity in vitro. In *Immunobiology of the macrophage*. Ed. D.S. Nelson. Academic Press -- New York. pp. 111-130.
- Pavillady, E.R.J., 1963. In vitro phagocytic and bactericidal -- ability of alveolar and peritoneal macrophages of normal rats. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 41: 265-274.

- Pierce, C.W. and J.A. Kapp, 1976. The role of macrophages in antibody responses in vitro. In Immunobiology of the macrophage. - Ed. O.S. Nelson Academic Press, New York. pp. 1-33.
- Pierce, C.W. and J.A. Kapp, 1978. Functions of macrophages in antibody responses in vitro. Fed. Proc. 37: 86-90.
- Pitt, B.L. and W.A. Robinson, 1970. Human bone marrow colony growth in agar-gel. J. Cell. Physiol. 76: 77-84.
- Quisenberry, P. and L. Levitt, 1979. Hematopoietic stem cells. -- New. Engl. J. Med. 301: 755-760, 819-823, 868-872.
- Rabelino, E.M. and D. Metcalf, 1975. Receptors for C3 and IgG on macrophage, neutrophil and eosinophil colony cells grown in vitro. J. Immunol. 115: 688-692.
- Rabinowitz, Y., 1964. Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leucocytes and monocytes on glass columns, including tissue culture observations. Blood. 23: 811-828.
- Rhodes, J., 1976. Macrophages heterogeneity in receptor activity: The activation of macrophage Fc receptor in vivo and in vitro. J. Immunol. 114: 976-981.
- Rice, S.G. and M. Fishman, 1974. Functional and morphological heterogeneity among rabbit peritoneal macrophages. Cell. Immunol 11: 130-145.
- Risgaard, S., J. Bennedson and J.M. Rhodes, 1977. In vitro studies on normal, stimulated and immunologically activated mouse macrophages. I. Oxidation of 1-¹⁴C-glucose by macrophages - In monolayer cultures. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. C. 85: 233-246.

- Rosendaal, M., G.S. Hodson, and T.R. Bradley, 1976. Haemopoietic - stem cells are organised for use on the basis of their generation-age. *Nature*. 264: 68-69.
- Rosenthal, A.S. and E.M. Shevach, 1973. Function as macrophages - in antigen recognition by Guinea-Pig T lymphocyte. I. Requirement for histocompatible macrophage and lymphocytes. *J. Exp. Med.* 138: 1194-1212.
- Rosenthal, A.S., P.E. Lipsky and E.M. Shevach, 1975. Macrophage-lymphocyte interaction and antigen recognition. *Fed. Proc.* 34: 1743-1748.
- Rosenthal, A.S., M.A. Barcinski and L.J. Rosenwasser, 1978. Function of macrophages in genetic control of immune responsive - -ness. *Fed. Proc.* 37: 79-85.
- Russell, S.W., W.F. Doe and A.T. McIntosh, 1977. Functional characterization of a stable noncytolytic stage of macrophage activation in tumors. *J. Exp. Med.* 146: 1511-1520.
- Sachs L., 1975. Control of normal cell differentiation of leukemic cells. *Comparative leukemia research. Bibl. Haemat. Ed. J. Clemmensen and D.S. Yohn. Rehovot.* 43: 6-9.
- Schon-hegrad, M.A. and P.G. Hold, 1981. Improved method for the isolation of purified mouse peritoneal-macrophages. *J. Immunol. Meth.* 43: 169-173.
- Schut, B.J.Th., H.A. Loos, M.Th.L. Roos, T. Pinkster, W.P. Zeijlmaaker and P.Th.A. Schellekens, 1978. Transformation capacity -

- of human blood lymphocytes in relation to their specific gravity; another heterogeneity of lymphocyte reactivity. *Eur. J. Immunol.* 8: 386-395.
- Shortman, R., 1968. The separation of different cell classes from lymphoid organs. I. the use of glass bead columns to separate small lymphocytes, remove damaged cells and fractionate cell suspensions. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 44: 271-289.
- Shortman, R., 1972. Physical procedures for the separation of animal cells. *Annu. Rev. Biophys. Bioengin.* 1: 93-130.
- Snyderman, R., H.S. Shin and M.H. Hausman, 1971. A chemotactic factor for mononuclear leukocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 138: 387-390.
- Sorkin, S., J.F. Borel and V.J. Stecher. 1970. Chemotaxis of mononuclear and polymorphonuclear phagocytes. In *Mononuclear phagocytes*. Ed. R. Van Furth Oxford, Blackwell Scient. Publ. pp. 397-418.
- Stafford H.A. and M.W. Fanger, 1980. Receptors for IgA on rabbit lymphocytes. *J. Immunol.* 125: 2461-2466.
- Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, 1972. The interaction as particulate horse sera dish peroxidase (HAP)-anti-HAP immune complexed with mouse peritoneal macrophage in vitro. *J. Cell. Biol.* 55: 616-634.
- Stobo, J.D., 1977. Immunosuppression in man. Suppression by macrophages can be mediated by interactions with regulatory T cells. *J. Immunol.* 119: 918-924.

- Stout, R.D. and M. Fisher, 1983. Suppression of lymphocyte proliferative responses: demonstration of two stages occurring in the in vitro generation of suppressor macrophages. *J. Immunol.* 130: 1900-1906.
- Tarrito, M., and M.J. Cline, 1976. Macrophages and their disorders in man. In *Immunobiology of the macrophage*. Ed. D.S. Nelson, Academic Press, New York, pp. 593-616.
- Tarrito, M.C., and M.J. Cline, 1977. Monocyte function in man, *J. Immunol.* 118: 187-192.
- Thomas, M.A., and R.N.M. MacIsaac, 1981. Heterogeneity of rat peritoneal and alveolar macrophage population: Characterization of their surface antigens by antisera. *Brit. J. Exp. Path.* 62: 68-71.
- Tigelaar, S.A., N.M. Vaz, and Z. Ovary, 1971. Immunoglobulin receptors on mouse mast cells. *J. Immunol.* 106: 661-672.
- Trevas, A.J., D. Yagoda, A. Heimovitz, N. Ramu, D. Rachmilewitz, and Z. Fiks, 1980. The isolation and purification of human peripheral blood monocytes in cell suspension. *J. Immunol. Meth.* 39: 21-30.
- Uranio, A.R., and J.C. Gerrotini, 1970. The immunogenicity of antigen bound to the plasma membrane of macrophage. *J. Exp. Med.* 131: 711-725.
- Uranio, E.R., 1972. The regulatory role as macrophage in antigenic stimulation. *Advan. Immunol.* In F.J. Dixon and Jhenry G. Kunkel Academic Press, New York, 15: 95-165.

- Unanue, E.R., and J. Calderon, 1975. Evaluation of the role of macrophages in immune induction. *Fed. Proc.* 34:1737-1742.
- Unanue, E.R., 1978. Macrophage Functions in immunity. *Fed. Proc.* 37:77-79.
- Unkeloss, J.C., 1977. The presence of two Fc receptors on mouse macrophages: Evidence from a variant cell line and differential trypsin sensitivity. *J. Exp. Med.* 145:931-947.
- Ulmer, A.J., and H.D. Flad, 1979. Discontinuous density gradient separation of human mononuclear leucocytes using Percoll as gradient medium. *J. Immunol. Meth.* 30:1-10.
- Waldron, J.A., R.G. Horn, and A.S. Rosenthal, 1973. Antigen-Induced proliferation of guinea pig lymphocytes in vitro: Obligatory role of macrophages in the recognition of antigen by immune T lymphocytes. *J. Immunol.* 111:58-64.
- Walker, W.S., 1971. Macrophage functional heterogeneity in the in vitro induced immune response. *Nature New Biol.* 229:211-212.
- Walker, W.S., 1974. Functional heterogeneity of macrophages: subclasses of peritoneal macrophages with different antigen-binding activities and immune complex receptors. *Immunol.* 26:1025-1037.
- Walker, W.S., 1976. Functional heterogeneity of macrophages in the induction and expression of acquired immunity. *J. Reticuloendothel. Soc.* 20:57-65.
- Ward, P.A., 1968. Chemotaxis of mononuclear cells. *J. Exp. Med.* 128:1201-1221.

- Watkins, J.F., 1964. Adsorption of sensitized sheep erythrocytes to hela cells infected with Herpes Simplex Virus. *Nature*. 202: 1364-1365.
- Weissman, R. and Dukor, P., 1970. The role of lysosomes in immune responses *advan. Immunol.* 12: 283-331.
- Williams, N., N. Kraft and K. Shortman, 1972. The separation of different cell classes from lymphoid organs. VI. The effect of osmolarity of gradient media on the density distribution of cells. *Immunol.* 22: 885-899.
- Wilson, C.B., J.E. Hass and W.M. Weaver, 1983. Isolation, purification and characteristics of mononuclear phagocytes from human placentas. *J. Immunol. Meth.* 56: 305-317.
- Winter H.S., L. Huffer, F.S. Cole, P.J. Edelson, 1981. Isolation and characterization of human intestinal macrophages *gastroenterol.* 80: 1317-1317.
- Wintrobe, M.M., R.E. Lee, D.N. Boogs, T. Bithell, J.W. Athenas -- and J. Foerster, 1981. *Clinical hematology* 8th. edition Lea and Febiger, Philadelphia. Cap. 2, 6, 8 y 42.
- Wood, P.R., R.J. Simes and D.S. Nelson, 1979. Activity of mouse macrophages purified by adherence to, and removal from, a plastic surface. *J. Immunol. Meth.* 28: 117-124.
- Wu, A.M., J.E. Till, L. Siminovitch and E.A. McCulloch, 1967. A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells. *J. Cell. Physiol.* 67: 177-183.

Wu, A.M., J.E. Till, L. Siminovitch and E.A. McCulloch, 1968. Cytological evidence for a relationship between normal and hemopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system. *J. Exp. Med.* **127**: 455-463.

Zanella, A., A. Mantovani, M. Mariani, C. Silvani, G. Peri and F. Tedesco, 1981. A modified low pH lignocaine method to isolate human-monocytes. A comparison with other separation procedures. *J. Immunol. Meth.* **41**: 279-288.

Zembala, M., and G.L. Asherson, 1970. The rapid purification of peritoneal exudate macrophages by ficoll (polysucrose) density gradient centrifugation. *Immunol.* **19**: 677-681.

Fe de erratas

En la pagina 55 en el segundo parrafo, en el renglon 8 dice: no es sino hasta los 10°C una separación celular y debe decir: no es sino hasta los 10°C cuando se observa una separación celular.