



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

EVIDENCIA DE QUE AL ESTIMULAR A PROLIFERAR A FIBROBLASTOS Y CELULAS EPITELIALES MURINAS PRODUCEN EL INDUCTOR DE MACROFAGOS Y GRANULOCITOS (MGI). DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE ESTE FACTOR, ASI COMO DEL PRODUCIDO POR MACROFAGOS Y CELULAS MIELOIDES ESTIMULADAS POR EL MEDIO CONDICIONADO DE FIBROBLASTOS,

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A N

JORGE FLAVIO MENDOZA RINCON

JULIO ROBERTO CACÉRES CORTES



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

I INTRODUCCION pag 1-12

1 CULTIVO DE TEJIDOS

1.1 CULTIVO DE TEJIDOS HEMATOPOYETICO Y LINFOIDE

1.2 CULTIVO DE FIBROBLASTOS Y CELULAS EPITELIALES

1.3 ORIGEN DE LAS CELULAS HEMATOPOYETICAS Y LINFOIDES

1.4 ORIGEN DE FIBROBLASTOS Y CELULAS EPITELIALES

1.5 FACTORES DE CRECIMIENTO

1.6 FACTOR INDUCTOR DE MACROFAGOS Y GRANULOCITOS (MGI)

II MATERIAL Y METODO pag 13-19

III RESULTADOS pag 20-37

IV DICUSION pag 38-48

V APENDICES pag 49-51

VI BIBLIOGRAFIA pag 52-59

RESUMEN

Es conocido que el inductor fisiológico de la proliferación y la diferenciación a partir de precursores mieloides de la médula ósea en macrófagos y granulocitos (MGI), es producido por una gran variedad de tipos celulares. Asimismo, se ha encontrado que existe una gran heterogeneidad entre los pesos moleculares de éstos. Sin embargo, no se sabe qué célula y en qué circunstancias produce cada tipo de MGI. En este trabajo se presentan evidencias experimentales que indican que probablemente cualquier célula es capaz de producir este tipo de inductor. Con esta finalidad, se utilizaron fibroblastos de pulmón y células epiteliales de riñón murinas, para determinar si la producción de MGI estaba relacionada con el número de divisiones celulares efectuadas in vitro por estos tipos celulares. Los resultados obtenidos, indican que la producción de este factor se lleva a cabo exclusivamente durante el ciclo de la proliferación celular y que se detiene cuando dicha proliferación es inhibida. Asimismo, se encontró que cuando son estimuladas nuevamente a proliferar, ya sea por la acción de agentes físicos o biológicos, la secreción y producción de MGI vuelve nuevamente a ser detectada. Por otro lado, para colaborar con la hipótesis que establece que la diversidad molecular del MGI depende de la estirpe celular que lo produce, la última parte de este trabajo consistió en determinar el peso molecular del MGI producido tanto por fibroblastos de pulmón como por células epiteliales de riñón, por macrófagos inducidos a la cavidad peritoneal, y por células de médula ósea murinas para compararlos entre sí y con los pesos moleculares producidos por estirpes celulares similares. Los pesos moleculares obtenidos por cromatografía de exclusión molecular, demuestran que en efecto existen diferencias entre cada uno de ellos, pero una gran similitud entre estos y los reportados para estirpes semejantes. Finalmente, se discute un posible circuito celular mediante el cual durante un proceso infeccioso participan células epiteliales, fibroblastos, macrófagos y células de médula ósea. En este se producen factores biológicos que desencadenan la proliferación y diferenciación de macrófagos y granulocitos a partir de precursores hematopoiéticos, asegurando así un sistema permanente de defensa contra cuerpos extraños.

ABREVIATURAS

MGI	= Inductor de Macrófagos y Granulocitos.
CSF	= Factor estimulador de colonias.
CSA	= Actividad estimuladora de colonias.
MC	= Medio condicionado.
MCF	= Medio condicionado por fibroblastos.
MCCE	= Medio condicionado por células epiteliales.
MCO-LPS	= Medio condicionado por macrófagos residentes estimulados con lipopolisacárido bacterial.
FPF	= Factor de proliferación de fibroblastos.
EPF	= Factor de proliferación de epitelio.
CFU-c	= Unidad formadora de colonias.
CFU-s	= Unidad formadora de colonias formadora del bazo.
CFU-eo	= Unidad formadora de colonias de eosinófilos.
CFU-e	= Unidad formadora de colonias de eritrocitos.
CFU-m	= Unidad formadora de colonias de mastocitos.
ml	= microlitros.
mcg	= microgramos.

1 CULTIVO DE TEJIDOS

Desde que C. Bernard visualizó en 1878 la importancia del ambiente intracelular en la regulación de las actividades del tejido vivo, se hizo necesario un estudio funcional de las propiedades de las células y como éstas afectan, o son afectadas por su ambiente inmediato (1). Por esta razón, fué necesario separar a las células en sistemas artificiales en los cuales la influencia del ambiente sobre el organismo pudiera ser observada.

Uno de los primeros intentos en esta dirección fue realizado en 1866 por F. D. Recklinghausen (2), quien trabajó con células sanguíneas de anfibio bajo diversas condiciones por espacio de 35 días. Sin embargo, el primer experimento organizado de cultivo, lo realizó W. Roux en 1885 (3), quien transplantó placas neurales de embriones de pollo en desarrollo utilizando solución salina. Asimismo, fué el primero en demostrar que el cierre del tubo neural es primeramente una función de los constituyentes celulares y no, como se había supuesto, un efecto directo de la presión mecánica ejercida por las estructuras adyacentes. Dos años después, J. Arnold (4) utiliza fragmentos de médula en humor acuoso de rana y lo transplanta bajo la piel y en la cavidad peritoneal de éstas, donde tiempo después son invadidas por leucocitos. Posteriormente, remueve los fragmentos de médula y es capaz de estudiar las actividades de las células que migran hacia ellas. En 1898 C.A Ljunggren (5) realiza transplantes de piel humana y logra que sobrevivan por días y semanas en fluido

ascítico. Más aún, R.G Harrison en 1907 (6) desarrolla una ² técnica efectiva y simple que le permite transplantar tejidos que continúan creciendo y desarrollándose fuera del organismo. En este sentido, los experimentos de Harrison fueron los pioneros de las técnicas de cultivo in vitro, ya que hicieron posible transplantar tejidos vivos que fueran capaces de desarrollarse fuera del organismo. Sin embargo, estas técnicas de cultivo se habían desarrollado exclusivamente para material de anfibios, por eso M.T Burrows en 1910 (7) adapta las técnicas de este último a organismos de sangre caliente y descubre además la utilidad del plasma como medio de cultivo. Posteriormente, en asociación con A. Carrel (8,9,10), organiza el cultivo de tejidos utilizando diversos recursos. De esta manera, con el desarrollo de otros tipos celulares en diferentes laboratorios del mundo, la información acerca de la naturaleza y desarrollo de las células, así como de sus requerimientos específicos se ve incrementada fuertemente, permitiendo así, obtener poblaciones celulares homogéneas que pueden ser analizadas de forma relativamente fácil en ambientes diferentes y cuyas respuestas y propiedades pueden ser medidas con mayor precisión (11).

1.1 CULTIVO DE TEJIDOS HEMATOPOYETICO Y LINFOIDE

El cultivo de tejidos hematopoyético y linfóide se ha convertido en una herramienta metodológica muy importante para el estudio de los diversos mecanismos que controlan y regulan su histogénesis (12). Por mucho tiempo fue prácticamente imposible mantener explantes de estos tejidos con las técnicas anteriormente descritas ya que no conservan por largo tiempo su

capacidad de proliferacion fuera del organismo (12). No fué, sino³ con el desarrollo de nuevas técnicas de cultivo que se ha conseguido que estos tejidos conserven y manifiesten sus características biológicas in vitro. Así, el cultivo de tejidos hematopoyético y linfoide se ha convertido en un sistema simplificado en el cual se puede analizar sistemáticamente la acción de diferentes sustancias nutritivas, vitaminas y factores biológicamente activos importantes en la proliferación, diferenciación y regulación de estos tejidos. De esta manera, el cultivo de tejidos hematopoyético y linfoide es actualmente un modelo experimental bastante adecuado para el estudio de los procesos celulares que incluyen tanto la cinética celular como los procesos de la participación celular hematopoyética en las reacciones inmunitarias (12).

1.2 CULTIVO DE FIBROBLASTOS Y CELULAS EPITELIALES

El origen y evolución de los cultivos de fibroblastos y células epiteliales esta basado principalmente en experimentos realizados con líneas transformadas de fibroblastos y en menor grado con líneas de células epiteliales (13). Actualmente, estos cultivos se utilizan ampliamente no únicamente porque se conoce mucho mejor su comportamiento y evolución que el de otros tipos celulares, sino además porque proliferan relativamente mas fácil in vitro (13). Aunque estos cultivos tienen una característica en común (su habilidad para adherirse a substratos como el vidrio y ciertos plásticos) existen diferentes características morfológicas que los distinguen. Los cultivos de células epiteliales se caracterizan por formar láminas con células

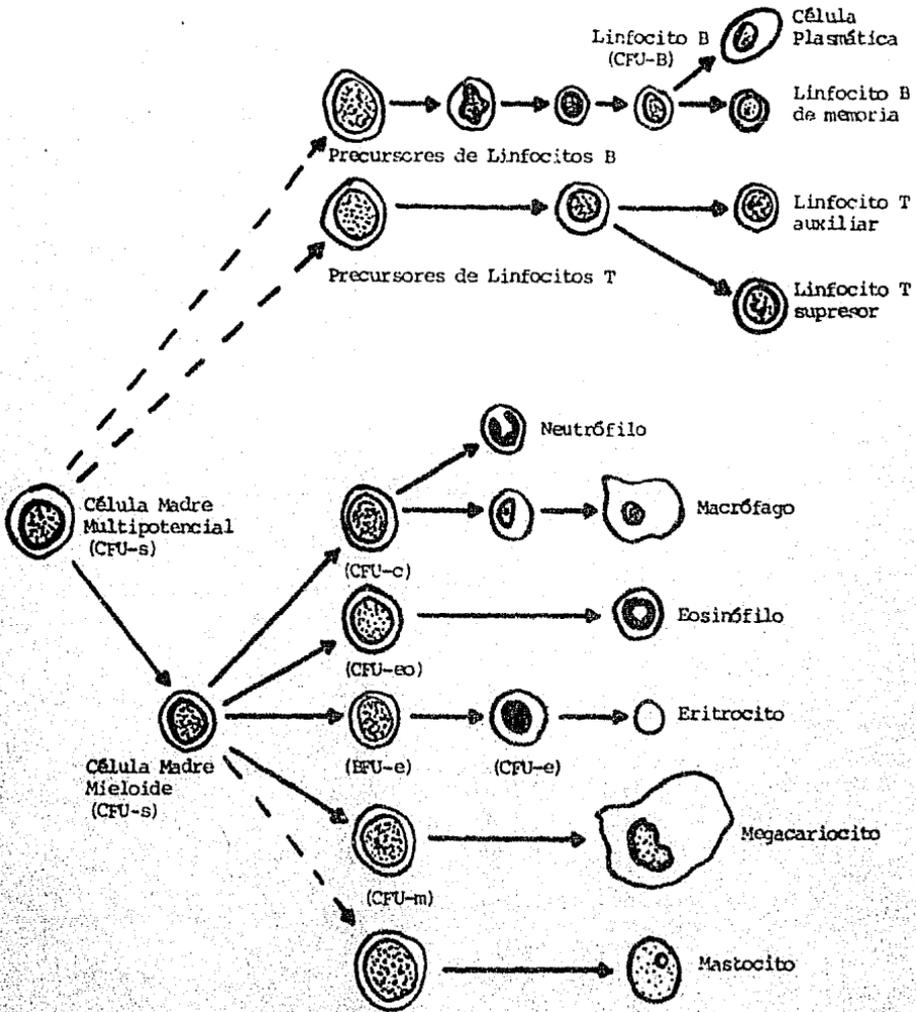


Diagrama 1.- Fases de maduración en el sistema hematolinfoide. Una célula precursora hematopoyética común puede originar a todos los elementos de la sangre y del sistema linfoide.

firmemente unidas unas con otras y éstas en el curso de su locomoción es difícil que se separen de la lámina (13). Por el contrario, los fibroblastos son incapaces de formar uniones tan estrechas como las células epiteliales, ya que por lo general ellos rompen fácilmente con las uniones célula-célula y se caracterizan porque se mueven individualmente. Existen varias fuentes para obtener cultivos primarios de fibroblastos y células epiteliales; los fibroblastos pueden ser obtenidos de tejidos mixtos de embriones o animales adultos, tejido conectivo subcutáneo, pulmón, bazo, médula ósea y sangre entre otros (13). Por su parte los cultivos de células epiteliales se obtienen de varios órganos, pero comúnmente de riñón, hígado y pulmón (14).

Actualmente, los cultivos de fibroblastos y células epiteliales se utilizan principalmente en la investigación de las transformaciones neoplásicas in vitro (13), en el estudio de potenciales de excitación a nivel de membrana (15) y en el estudio de la participación celular de estos tejidos con otros tipos celulares (16).

1.3 ORIGEN DE LAS CELULAS HEMATOPOYETICAS Y LINFOIDES

Las células hematopoyéticas y linfoides tienen un ancestro común o célula precursora, a partir de la cual se origina tanto el linaje mielóide como el linfóide (diagrama 1) (17).

La presencia de una célula precursora hematopoyética ha sido estudiada e identificada en el ratón por Till y Mc Culloch en 1961 (18,19), quienes irradiaron los tejidos hematopoyéticos ocasionando un abatimiento de los células endógenas de ese sistema. Posteriormente, al inyectar células hematopoyéticas

comprobaron que se restablecía el tejido hematoyético abatido y observaron además que se presentaba una migración de las células inyectadas al bazo. Al disectar el bazo observaron que se encontraban todas las células de la serie mieloide (granulocitos, macrófagos, células rojas y megacariocitos) así como linfocitos T y B. A partir de estos hechos designaron a esta célula pluripotente capaz de originar toda la serie linfoide y mieloide como unidad formadora de colonias del bazo CFU-S (por sus siglas en inglés unity forming colony-spleen). En el hombre existe una población de células mixtas CFC-MIX (por sus siglas en inglés the colony forming cell-mixed), que cuando es apropiadamente estimulada, puede formar en medio semisólido colonias que contienen todas las diferentes células de las líneas mieloides (20,21). Sin embargo, la presencia de una célula precursora con potencial para diferenciarse y automantenerse no ha sido confirmada completamente in vitro (22,23,24,25,26). Esto lo demuestran los ensayos realizados por otros investigadores en los que no se ha podido detectar a la célula precursora más primitiva (27,28). Se cree, sin embargo que los experimentos de repoblación serán claves para identificar a esta célula (29). A pesar de ello, el cultivo de estos tejidos in vitro ha permitido detectar la presencia de los diferentes linajes hematopoyéticos, así como también dilucidar la participación de algunos factores biológicos esenciales en la regulación, proliferación y diferenciación de estos tejidos in vivo.

1.4 ORIGEN DE FIBROBLASTOS Y CELULAS EPITELIALES.

El origen tanto de fibroblastos como de células epiteliales

comienza en una etapa muy temprana del desarrollo embrionario, cuando el citoplasma del huevo fecundado se divide desigualmente dando origen a células comprometidas que desencadenan la formación de los cuatro tejidos básicos y subtipos que se forman a partir de ellos (30). Los cuatro tejidos básicos son: el tejido epitelial, el tejido conectivo, el tejido muscular y el tejido nervioso, todos ellos se originan en una etapa del desarrollo embrionario a partir de lo que se llama las tres capas germinativas del embrión (30). La formación de estas capas germinativas comienza cuando el óvulo fecundado experimenta una serie de divisiones (segmentaciones) y se convierte en mórula (Fig. A y B Diagrama 2) (30). Las células de la mórula no tienen las mismas dimensiones pues, como mencionamos, la gran reserva de vitelo en el citoplasma del huevo fecundado está distribuido desigualmente al dividirse para formar las células de la mórula. Las células de la mitad inferior obtienen abundante vitelo, que las hace parecer más voluminosas que las de la mitad superior. En ésta etapa se dice que la mórula tiene dos polos; las células pequeñas que rodean al polo animal y las células vitelinas más voluminosas conglomeradas hacia el polo vegetativo (fig. C Diagrama 2). Poco después, las células de la pared más cercana al polo animal se tornan cada vez más pequeñas porque siguen dividiéndose más rápidamente que las cercanas al polo vegetativo, por lo cual esta parte de la blástula se adelgaza mucho y señala el origen del ectodermo (Fig D Diagrama 2) una de las tres capas germinativas. Posteriormente, la pared de la blástula cerca del polo vegetativo se invagina hacia el embrión en desarrollo y se convierte en un revestimiento interno de un tubo que llegará a ser el intestino (Fig. E diagrama 2). De esta manera, se origina

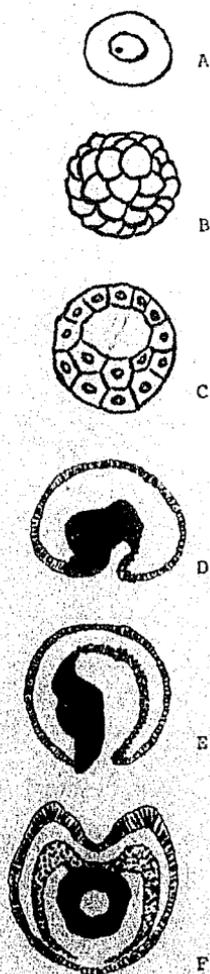


Diagrama 2.- Esquemas en los cuales se ilustra la formación de las tres capas germinativas en un embrión de rana. D y E son cortes longitudinales. F es corte transversal. Con súltense explicaciones en el texto.

el endodermo la segunda de las tres capas germinativas. Poco tiempo después, algunas células pequeñas del tipo del polo animal originan la tercera capa germinativa, el mesodermo (zona sombreada, Fig. F). En breve, el ectodermo y endodermo originan la mayor parte del tejido epitelial, pero no del todo, puesto que una parte proviene del mesodermo. Este último originará a la mayor parte del tejido conectivo (de uno de sus subtipos, del tejido conectivo laxo, provienen los fibroblastos). Finalmente, el tejido muscular deriva casi exclusivamente de mesodermo y algo de ectodermo y, por último, el tejido nervioso deriva exclusivamente de ectodermo (30).

1.5 FACTORES DE CRECIMIENTO

Los mecanismos de acción de varios factores que regulan el crecimiento y diferenciación en células eucarióticas son actualmente objetos de amplios estudios. Ya anteriormente se había demostrado que los linfocitos activados producen ciertas sustancias biológicamente activas llamadas linfocinas (31), entre las que se encuentran el factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF), el factor inhibidor de la migración de leucocitos (LIF), factores quimiotácticos (CTX), factores inductores a la proliferación de linfocitos (interleucina-2) y el inductor de macrófagos y granulocitos (MGI). Posteriormente, se demostró que no sólo las células hematopoyéticas eran capaces de producir sustancias biológicamente activas, sino también fibroblastos y células epiteliales, por lo cual Cohen en 1977 propuso el nombre de citocinas para todo aquel factor con actividad biológica producido por cualquier tipo de célula (32).

Actualmente, se conoce una gran cantidad de citocinas y se¹⁰ sabe que poseen una amplia multiplicidad en sus funciones biológicas; lo mismo participan en la motilidad celular, que en el crecimiento, la diferenciación y en las reacciones inmunitarias asociadas con procesos infecciosos y enfermedades inflamatorias.

1.6 FACTOR INDUCTOR DE LA FORMACION DE MACROFAGOS Y GRANULOCITOS.

El MGI inductor fisiológico de la proliferación y diferenciación de macrófagos y granulocitos (por sus siglas en inglés Macrophage and Granulocyte Inducer) es una citocina de particular interés. Estimula la proliferación y diferenciación de precursores hematopoyéticos a la formación de macrófagos y granulocitos tanto en el humano (33) como en el ratón (34,35,36). Se sabe, que el MGI es una proteína que exhibe una heterogeneidad molecular y funcional y que puede ser producido y secretado tanto por células normales (37) como por malignas (38). Su peso molecular es muy heterogéneo pero parece que todos derivan de una unidad básica de 23 000 daltones (39,40,41). Además se sabe, que estos inductores también pueden ser glicoproteínas aunque parece que la presencia de carbohidratos no es necesaria para su actividad biológica (42). Asimismo, se sabe que la producción de este factor puede ser modulada por diversos compuestos (43,44) y que existen algunas células que la producen constitutivamente (45,46,47,48,42). Por otro lado, se conocen algunos reguladores negativos de la producción de este factor (31) y se cree que esta molécula puede ser un regulador de la producción de macrófagos y granulocitos in vivo (49).

transformada es activada a proliferar también produce este factor¹² (61,62). Por lo anterior, suponemos que puede existir una relación muy firme entre proliferación celular y la producción del inductor de macrófagos y granulocitos (MGI). Es por ello, que en el presente trabajo se utilizaron fibroblastos de pulmón y células epiteliales de riñón de ratón para evaluar si existe alguna relación entre la producción de este factor y el número de divisiones celulares efectuadas in vitro por estos tipos celulares.

Finalmente, para explicar la elevada heterogeneidad molecular del MGI, se podría suponer que existe uno para cada situación fisiológica in vivo. Sin embargo, creemos que existe un MGI para cada estirpe celular y no para cada situación fisiológica, debido a que esto último estaría en contra de la economía energética del organismo. Es por ello, que la última parte de este trabajo se enfocó a determinar el peso molecular del MGI producido por fibroblastos de pulmón, células epiteliales de riñón, macrófagos inducidos a la cavidad peritoneal y células de médula ósea murinas, para compararlos con otros MGIs producidos in vivo e in vitro y corroborar de esta manera si existe o no dicha heterogeneidad molecular.

Por último, se discute un posible circuito celular de respuestas entre macrófagos, células epiteliales, fibroblastos y células de médula ósea.

II MATERIAL Y METODO

RATONES

Se usaron ratones de 6-8 semanas de edad de ambos sexos de la cepa CD-1 como donadores de células de médula ósea, de fibroblastos de pulmón y de células epiteliales de riñón respectivamente.

CONDICIONES DE CULTIVO

Las células de médula ósea fueron cultivadas en medio mínimo esencial de Eagle (ME) (Microlab, México) (Apendice 1), suplementado con 10% de suero de caballo (Microlab, México) previamente desactivado a 56°C durante media hora, mientras que los fibroblastos y las células epiteliales se cultivaron en forma análoga pero con 10% de suero fetal de bovino (Microlab, México).

Todos los cultivos se mantuvieron a un 10% de dióxido de carbono en la atmósfera, a 37°C y humedad saturante a punto de rocío. En forma rutinaria se adicionó al ME, 100 mcg/ml de estreptomizina, 100 U/ml de penicilina G y 3.7 g/l de bicarbonato de sodio. Para el ensayo de estimulación a la formación de colonias se utilizó Bacto agar (Difco Labs., Detroit, USA) y ME doblemente concentrado. Para estos ensayos se utilizaron cajas de

cultivo de tejidos de 60 x 15 mm (Pyrex, USA) (5 ml); para las pruebas en medio líquido se utilizaron cajas petri de plástico¹⁴ desechables (Crive, Durango Vela S.A. México) (5 ml) y para la obtención de los diferentes medios condicionados empleados en este trabajo se emplearon cajas de cultivo de tejidos de plástico 60 x 15 mm (Costar, USA) (5 ml).

CELULAS

Los animales siempre fueron sacrificados mediante dislocación médulo-encefálica. Para la obtención de células de médula ósea se utilizó una solución salina amortiguadora de fosfatos (SAF) (Apendice 2) para desalojar el tejido medular de cada fémur. Esto se consigue al hacer fluir SAF con una jeringa de un extremo a otro del fémur. Las células así obtenidas fueron lavadas 3 veces con SAF por centrifugación (500g durante 3 min), desechandose el sobrenadante para finalmente resuspenderles en ME con 10% de suero de caballo. Los cultivos se mantienen por un período de 4 días, para las pruebas en líquido y 7 días para los ensayos en agar. Para cada experimento se utilizó un lote de células proveniente de varios animales.

Para la obtención de fibroblastos de pulmón y de células epiteliales de riñón se humedece la piel con alcohol al 70% alrededor de la incisión y se extirpa el órgano utilizando pinzas y tijeras. Para fibroblastos, se hace una incisión ventral a nivel del tórax y se extirpa los pulmones. Posteriormente, el órgano es lavado en SAF para después ser cortado sin desgarramiento del tejido, en pequeños pedazos de 3 mm³ aproximadamente. Los pedazos de pulmón son sometidos a

disgregación enzimática mediante agitación continua en parrilla¹⁵ magnética, en un baño de agua a 37°C, en presencia de colagenasa (tipo IV, Sigma Chemical, Missouri, USA) a una concentración de 0.05% en SAF. Posteriormente, se retira la solución enzimática y se agrega colagenasa fresca a la misma concentración, se agita nuevamente a la misma temperatura por 10 min. Todo el contenido, se pasa a través de un filtro de nylon para eliminar el tejido no disgregado, las células así colectadas se colocan en un baño de hielo por 5 min, para desactivar a la enzima, se centrifuga esta solución y se siembra con ME suplementado con suero fetal de bovino (SFB) al 10% durante 5 días.

Para la obtención de las células epiteliales de riñón se hacen dos incisiones dorso-laterales, se cortan los riñones y se colocan en cajas petri con SAF a 37°C quitándoles la corteza. Se hacen múltiples cortes lo más pequeño posible tratando de no desgarrar, todo el macerado se resuspende en 10 ml de SAF y se pasa a un matraz Erlenmeyer agregando 50 ml de tripsina (Sigma Chemical, Missouri, USA) al 0.25% en SAF. Se agita en forma moderada utilizando parrilla magnética durante 10 min en un baño de agua a 37°C, se retira el sobrenadante con una pipeta para eliminar células sanguíneas y se agrega nueva solución enzimática durante 45 min. Posteriormente, se pasa el contenido a través de un filtro de nylon con la finalidad de separar el tejido no disgregado. El tubo se cubre y se deja reposar a 0°C durante 5 min para desactivar la enzima. Se elimina el sobrenadante después de centrifugar a 500 g durante 5 min y las células así obtenidas se siembran en ME suplementado con SFB al 10% durante 5 días.

En la obtención de macrófagos inducidos a la cavidad peritoneal, se inyecta intraperitonealmente 3 ml de caseinato de

sodio (Difco Labs., Michigan, USA) al 10% en SAF. Cuatro días después, se sacrifica el ratón y se hace una incisión en el abdomen sin dañar el peritoneo, las células de la cavidad peritoneal se obtienen, al inyectar 10 ml de SAF y extraer este volumen, esta operación se repite dos veces más, pero inyectando ahora 5 ml de SAF. Una vez obtenidas, las células se colocan en un tubo que ha sido previamente mantenido a temperatura de refrigerador (4° C) para evitar que las células fagocíticas se adhieran al plástico. Posteriormente, las células se lavan 3 veces con SAF mediante centrifugación a 500 g por 5 min. En general se siembran 6×10^6 células en ME suplementado con 10% de suero de caballo, se espera durante 1 hr y se eliminan a las células no adherentes al eliminar el sobrenadante de las cajas de cultivo. Se agrega nuevo ME con suero de caballo al 10% y se mantienen los cultivos por 4 días.

El procedimiento para la obtención de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal es el siguiente: primeramente se sacrifica el ratón y se hace una incisión en el abdomen sin dañar el peritoneo, posteriormente se inyectan 10 ml de SAF para extraer a las células, lo cual se consigue al remover este volumen de la cavidad peritoneal. Se repite esta operación dos veces más, pero utilizando ahora 5 ml de SAF. Las células así obtenidas se colocan en un tubo que previamente se ha mantenido a 4° C (para evitar la adherencia de las células fagocíticas al plástico), posteriormente se lavan 3 veces en SAF a 500 g por 5 min. Se siembran 6×10^6 células en ME suplementado con 10% de suero de caballo, se incuban a 37°C y se espera 1 hr para eliminar a las células no adherentes al retirar el sobrenadante de la caja de cultivo. Se agrega nuevo ME suplementado con 10% de suero de

caballo y 100 microlitros (mcl) de una solución de 1 microgramo (mcg) x ml de lipopolisacáridos de paredes bacterianas en SAF y se¹⁷ incuban por 4 días a 37°C.

MEDIOS CONDICIONADOS

Los medios condicionados utilizados como controles positivos en este trabajo se obtuvieron al coleccionar el medio de cultivo condicionado por 6 días, de cultivos tanto de fibroblastos como de células epiteliales en la resiembra uno (R1).

Por su parte, los medios condicionados tanto por macrófagos inducidos a la cavidad peritoneal como los condicionados por células de médula ósea en presencia de medio condicionado por fibroblastos (6 días R1), se obtuvieron al cultivar macrófagos y células de médula ósea por 5 días en presencia de 2 ml de medio condicionado por fibroblastos y coleccionar después de este período el medio de cultivo.

El medio condicionado por macrófagos residentes de la cavidad peritoneal se obtuvo después de cultivar por 4 días macrófagos residentes con 100 mcl de una solución de 1 mcg x ml de lipopolisacáridos de paredes bacterianas.

Una vez obtenidos los medios condicionados se guardaron a -4°C hasta su utilización.

ENSAYO DE MBI

Para el ensayo de inducción a la formación de colonias se usó la técnica de doble capa en agar (64,65). Brevemente, en una caja de cultivo se sobreponen dos capas de agar, una primera capa al

0.6% en donde se adiciona el medio condicionado a ser evaluado y una segunda al 0.3% con aproximadamente 0.5×10^6 células de médula ósea. Después de 7 días de incubación, todas las agrupaciones celulares (colonias) de más de 20 células se contaron usando un microscopio invertido. 18

Para las pruebas en medio líquido se sembraron 8×10^4 células de médula ósea y después de 4 días de cultivo, las células se retiraron del sustrato después de lavar con SAF a 37°C y removerlas utilizando un gendarme. En los conteos se utilizó hemocitómetro y contadores digitales (Ambos de Clay-Adams, New York USA).

TECNICA BIOQUIMICA

Para la determinación de los pesos moleculares reportados en este trabajo, se utilizó la técnica de cromatografía de exclusión molecular (filtración en gel). Se empleo Sephadex G-100 (Sigma Chemical Co, Missouri USA) como matrix y Tris - HCL (pH 7.4) como eluyente. Dos ml de los medios condicionados por células epiteliales, fibroblastos, macrófagos inducidos y células de médula ósea se les hizo cromatografía por separado, utilizando una columna de 90×2.5 cm (Pharmacia fine chemical, Sweden). Se colectaron 100 fracciones de 4.5 ml en cada caso y para los ensayos biológicos (tanto en agar como en líquido) se utilizaron alícuotas de 0.5 ml de cada fracción.

Azul dextrano se utilizó para determinar el volumen de exclusión (421.78 ml) y transferrina (PM= 79 000 d), ovoalbúmina (PM= 43 000 d), media hemoglobina (PM= 32 000 d) y citocromo C (PM= 11 700 d) como proteínas de peso molecular conocido para la

curva patrón de calibración (Fig. 8b). El perfil de elución de proteínas fué siempre leído a 280 nm.

19

VARIOS

Todas las sustancias bioquímicas provinieron de Sigma Chemical Co. Missouri USA, a menos que se especifique otro origen. Todas las pruebas se realizaron por duplicado, en dos ensayos independientes de experimentos diferentes. Se incluyeron controles negativos (sin inductor) y positivos (con inductor) en todos los experimentos.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE LOS MEDIOS
CONDICIONADOS PARA LA INDUCCION A LA PROLIFERACION DE CELULAS DE
MEDULA OSEA.

Con la finalidad de determinar la concentración óptima posible productora de un efecto proliferativo en precursores mieloides de granulocitos y macrófagos, se utilizaron medios que fueron condicionados (MC) durante 6 días por células de cultivo en R1 tanto de fibroblastos como de células epiteliales. Al utilizar 12, 25, 50, 100, 200, 500 y 1000 microlitros (mcl) de estos medios para inducir a la proliferación a células de médula ósea tanto para las pruebas en agar como en líquido, se obtuvo que aunque pequeña, desde los 12 mcl había inducción a la proliferación (Fig. 1). Sin embargo el máximo de actividad se detectó a los 500 mcl, ya al que utilizar 1 ml la actividad era la misma.

DETERMINACION DE LA CINETICA DE PRODUCCION DE MGI TANTO DE
FIBROBLASTOS COMO DE CELULAS EPITELIALES.

Para conocer la cinética de producción de MGI durante la proliferación in vitro de fibroblastos y células epiteliales, se utilizaron cultivos en la resiembra número 2 (R2), pues supusimos que la población celular era más homogénea que en los cultivos primarios y menos alterada que en resembras posteriores (Fig. 2). Se sembraron 2.7×10^6 fibroblastos y se colectaron los medios

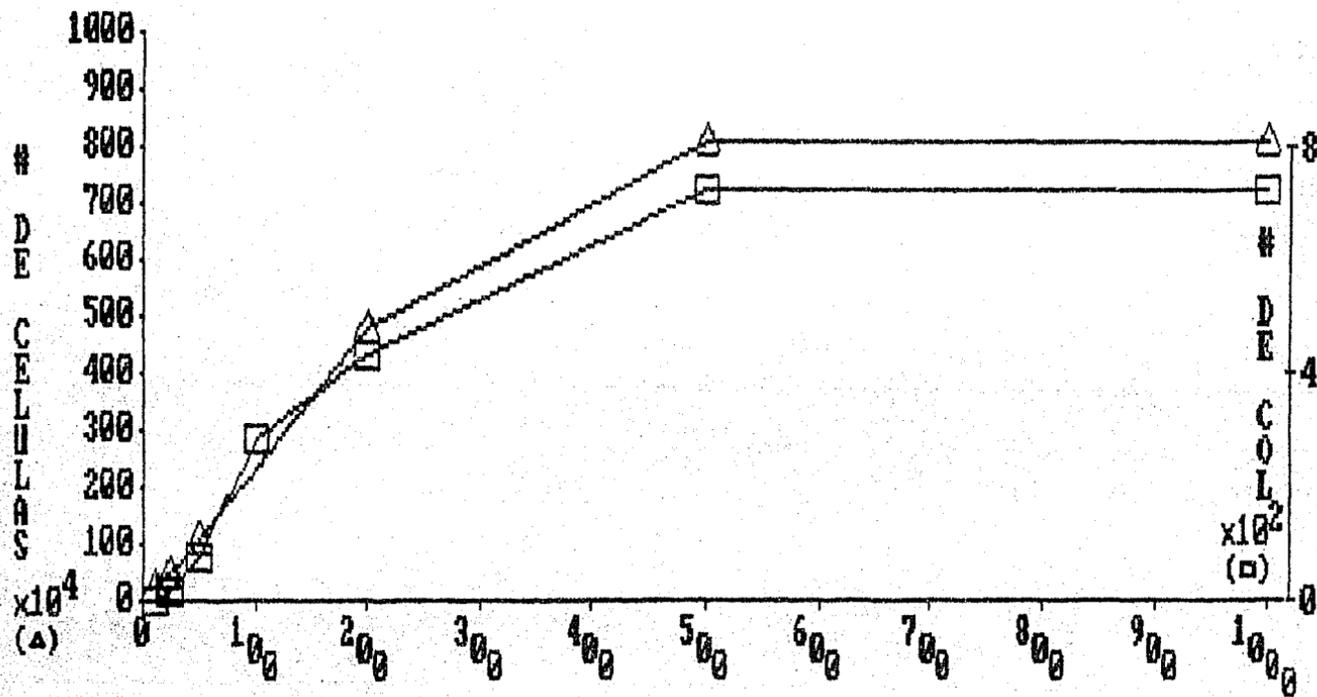


Fig. 1 Determinación de la concentración óptima 0.5 ml del MC por Fibroblastos en cultivo primario, para producir una proliferación máxima en medio líquido de 8×10^6 células de médula ósea y 7×10^2 colonias en agar.

VOLUMEN (ml)

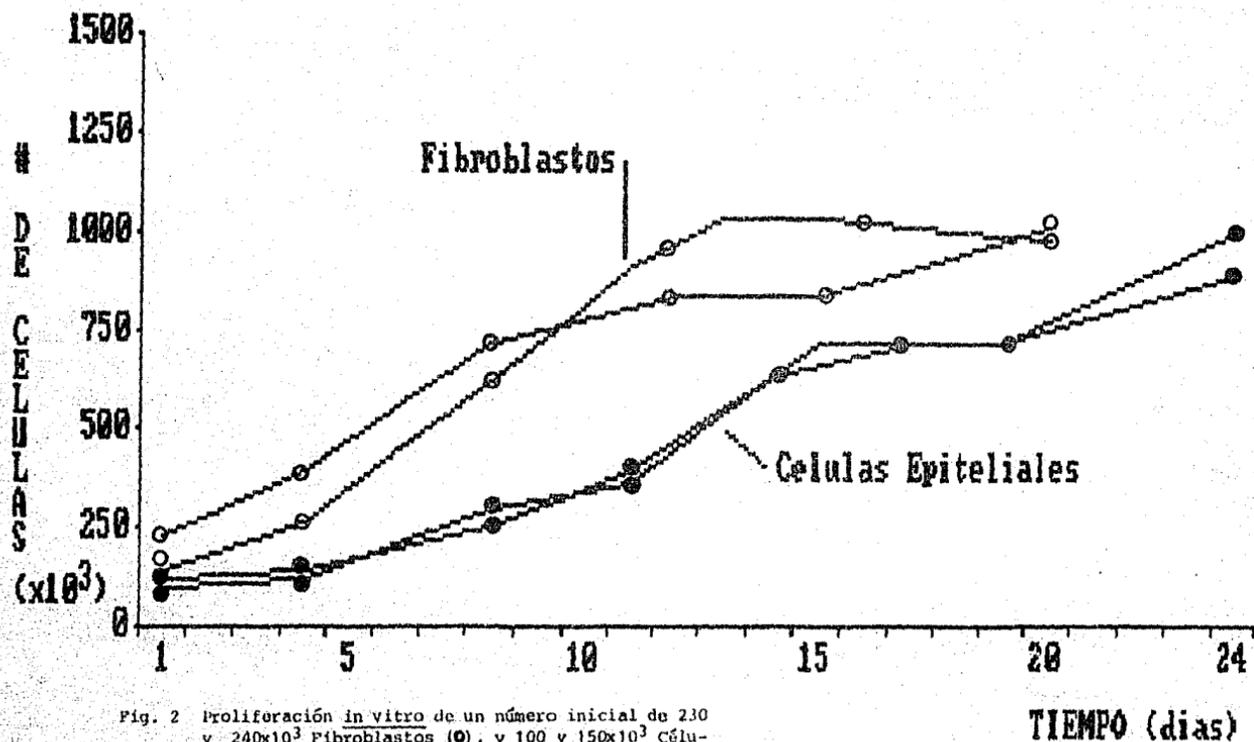


Fig. 2 Proliferación *in vitro* de un número inicial de 230 y 240x10³ Fibroblastos (○), y 100 y 150x10³ Células Epiteliales (●). Después de alcanzar el estado de saturación hay un aumento celular producido por el MCG-LPS.

TIEMPO (dias)

condicionados (MC) a los 1,4,8,12,14 y 16 días, análogamente se 23 sembraron 1.5×10^3 células epiteliales y se colectaron los MC, a los 1,4,8,11,14 y 17 días, como fuente de MGI. Aunque en los ensayos efectuados en agar con el MC por 1 día, se detectó una actividad de MGI, esta fué muy pequeña, y no fué sino hasta cuando se ensayó el MC por 4 días cuando se detectó una inducción más significativa, esta inducción aumento linealmente hasta el MC del día 14, manteniendose semejante cuando se utilizaron los MC de 16 y 17 días (Fig. 3 y 4). Por otro lado es interesante hacer notar que fué justamente en los días 12 y 14 cuando los fibroblastos y las células epiteliales respectivamente, llegaron a saturación.

Por otro lado, para evaluar el número de divisiones celulares necesarias para la producción suficiente de MGI para inducir la formación de una colonia in vitro, se utilizó la fórmula $N_{Dcol} = D_c / A = N_0 (\exp(Kt) - 1) / A$ (Tabla 1). Se encontró que era necesaria más del doble de divisiones de fibroblastos (5143) para producir la misma cantidad de MGI que el de células epiteliales (2394), lo cual indica que una célula epitelial es capaz de generar aproximadamente el doble de MGI que un fibroblasto. Además, encontramos que mientras los cultivos se acercan más a la saturación el número de divisiones celulares necesarias para producir una colonia aumenta considerablemente (3717 para células epiteliales y 8507 para fibroblastos).

EFFECTO PROLIFERANTE SOBRE FIBROBLASTOS Y CELULAS EPITELIALES DE MEDIOS CONDICIONADOS POR MACROFAGOS ESTIMULADOS CON LPS.

Una vez que se había determinado que tanto los fibroblastos

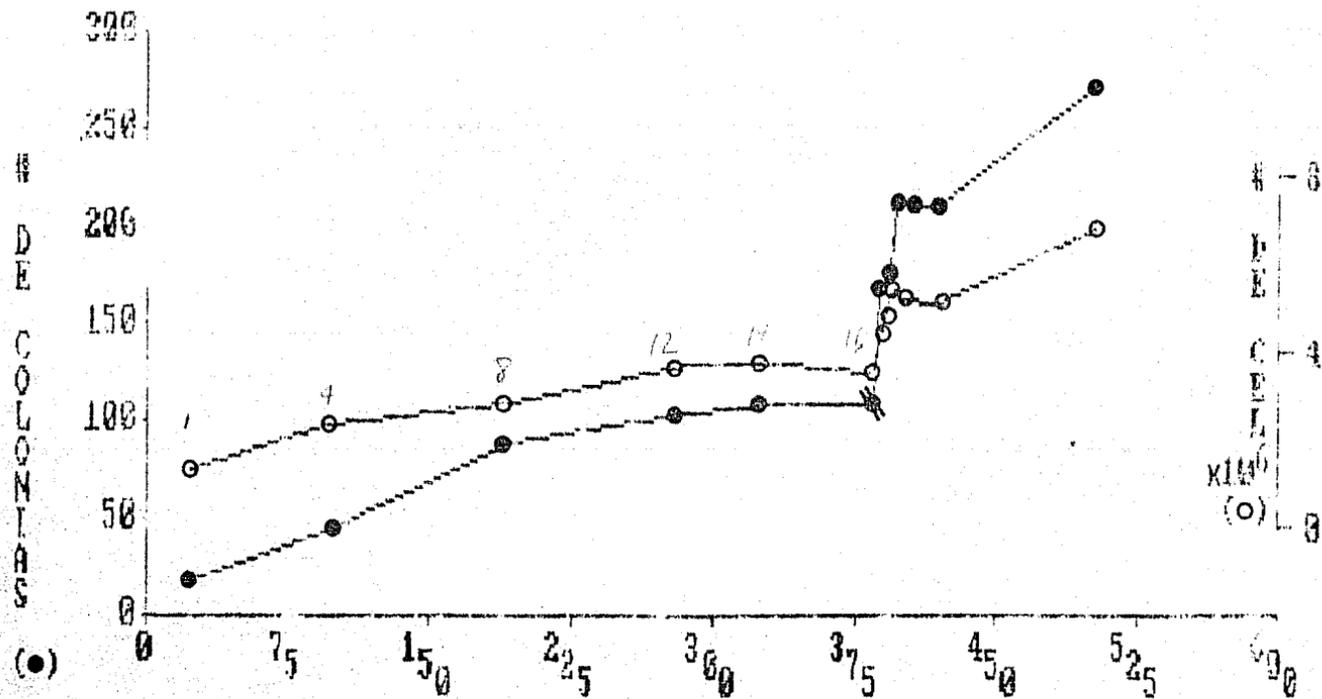


Fig. 3 Cinética de producción de MGI por Fibroblastos (1,4,8,12,14,16 días) y liberación del factor (3,6,9 hrs) después de la adición de MCG-LPS (W). Para el ensayo de inducción a la proliferación y formación de colonias de células de médula ósea en medios líquidos y agar, se sembraron 8×10^6 células/caja y 0.5×10^6 células/caja respectivamente.

TIEMPO (horas)

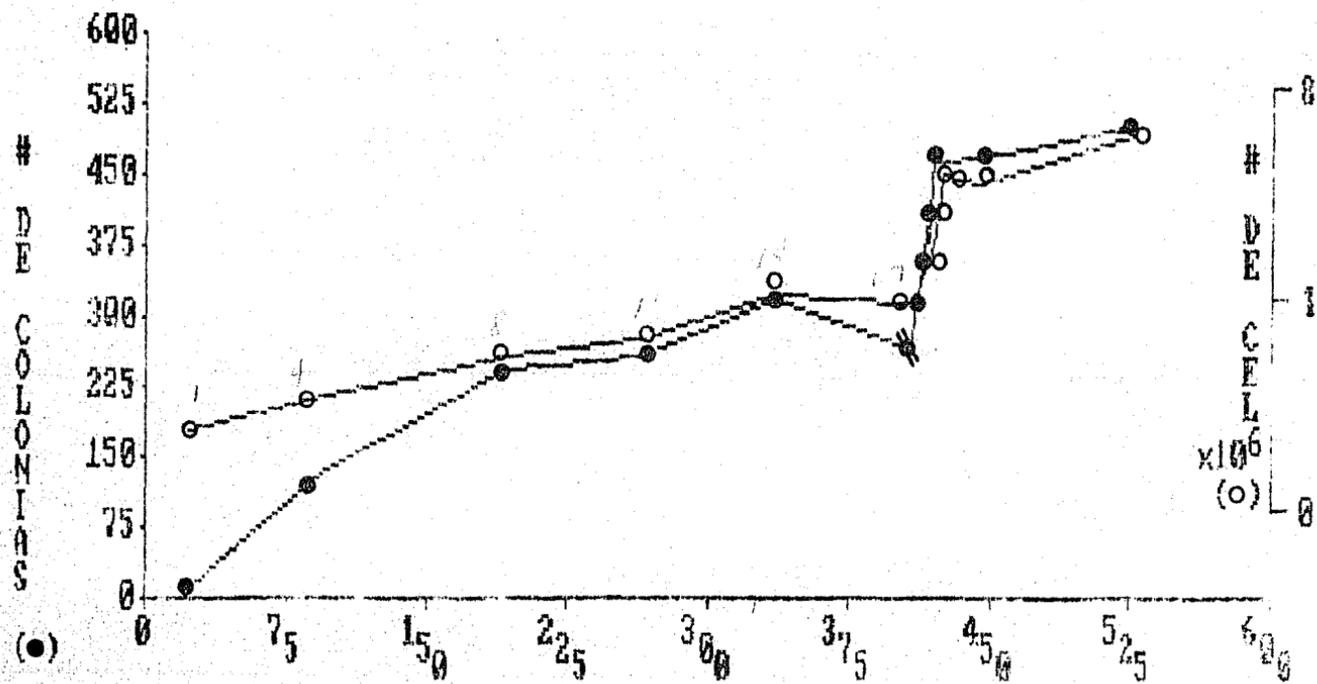


Fig. 4 Cinética de producción de MGI por Células Epiteliales (1,4,8,11,14,17 días) y liberación del factor (3,6,9,12 hrs) después de la adición de MCG-LPS (▲). Para el ensayo de inducción a la proliferación y formación de colonias de células de médula ósea en medios líquidos y agar, se sembraron 8×10^6 células/caja y 0.5×10^6 células/caja respectivamente.

TIEMPO (HORAS)

TABLA I

MCFp (dias)	A	Dc	NDcol	MCCER (dias)	A	Dc	NDcol
3	14	72	5143	8	71	170	2004
6	45	250	5555	11	126	303	2404
9	67	570	8507	15	156	530	3717

MCFp = Medio Condicionado por Fibroblastos de Pulmón.

A = Número de Colonias Inducidas.

MCCER = Medio Condicionado por Células Epiteliales de Riñón.

Dc = Divisiones Celulares Totales x 10³.

NDcol = Número de Divisiones Celulares para inducir la formación de una Colonia in vitro.

como las células epiteliales eran capaces de producir un inductor de proliferación de macrófagos, se procedió a corroborar la observación de que, por su parte, los macrófagos son capaces de inducir a la proliferación de éste tipo de células. Para ello, se utilizaron lipopolisacáridos (LPS) que tienen la propiedad de estimular en general, la función secretora de los macrófagos, por lo cual se agregó LPS a una concentración final de 1 mcg/ml a monocapas de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal. El MC producido por ellos (MCOR-LPS) en 4 días se agregó en un 40% a cultivos saturados de fibroblastos y células epiteliales para evaluar el número de células 5 días después. Asimismo, se realizó una colecta de MCs a las 3,6,9,12,33 y 124 hrs con la finalidad de determinar posteriormente, si existía una nueva liberación de MGI por parte ^{de} estos. Observamos un incremento en el número de fibroblastos (20%) como de células epiteliales (25%) (Fig. 2), respecto al número de células existentes al momento de agregar el MCOR-LPS. Para determinar si este aumento era provocado por el MCOR-LPS o por el hecho de haber agregado nuevo medio de cultivo, se evaluó en las mismas condiciones, cultivos a los que se les cambio el 40% de su medio. Se encontró que aunque también provocó un aumento celular este fué significativamente menor al encontrado con el MCOR-LPS (10 y 12%).

DETERMINACION DEL TIEMPO QUE TARDA UNA CELULA EN INHIBICION POR CONTACTO PARA LIBERAR MGI AL SER ESTIMULADA A PROLIFERAR.

Para determinar si una célula en inhibición por contacto necesita de un proceso de síntesis de novo de MGI, o si este se

encuentra almacenado para su liberación, se procedió a efectuar una resiembra de fibroblastos a alta densidad (1×10^4) y coleccionar los MC a las 3, 6, 9, 12, 31 y 124 hrs. Se encontró que no era sino hasta cuando se utilizó el MC por 6 horas, tanto en cultivos en líquido como en agar de médula ósea, que se presentó una inducción a la proliferación celular. Esta inducción se mantuvo constante hasta cuando se utilizó el MC por 31 horas y no fué sino hasta que se utilizó el MC por 124 hrs cuando se detectó un aumento significativo de dicha actividad (Fig. 5). Dado que, se sabe que in vivo la máxima liberación de MGI ocurre a las 3 hrs después de un reto endotóxico y en nuestros resultados no se obtuvo sino hasta las 6 hrs supusimos que este retardo in vitro pudiese ser debido al tiempo que tardan las células en recuperarse del daño enzimático y de adherirse nuevamente al sustrato de cultivo, es por ello, que se evaluó la actividad de MGI en los MC coleccionados cuando se indujo a proliferar a fibroblastos mediante MCOR-LPS. Encontramos una importante inducción a la proliferación aún desde cuando se empleó el MC por 3 hrs, esta inducción se incrementó con el de 9 hrs en un 50%, permaneciendo constante hasta cuando se utilizó el de 31 hrs, para luego aumentar importantemente con el de 124 hrs (Fig. 3 y 4). En consecuencia, nuestros resultados indican que las células en reposo almacenan MGI el cual es liberado casi inmediatamente al momento de ser estimuladas a proliferar.

DETERMINACION DEL MGI INTRACELULAR DE CELULAS EPITELIALES EN CULTIVOS CONFLUENTES.

Una vez encontrado que las células provenientes de cultivos

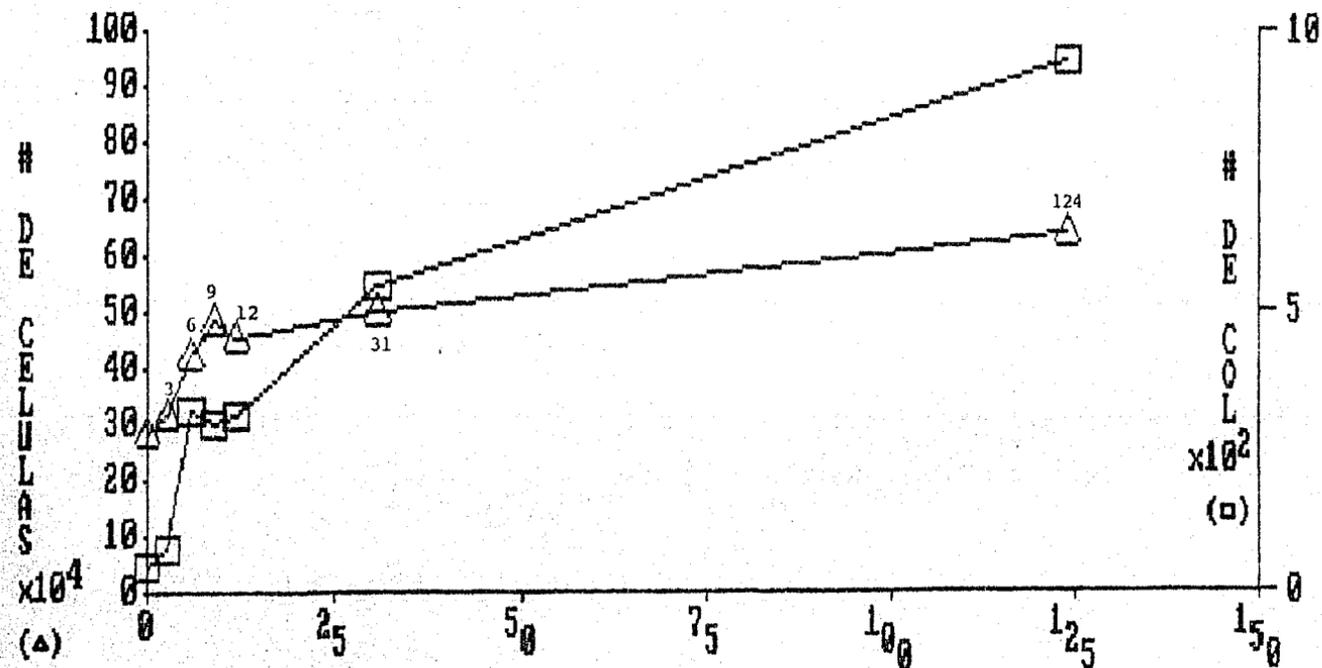


Fig. 5 Liberación de MGI por Fibroblastos en R2 después de resembrarlos a alta densidad (1×10^6 células). La liberación ocurre a las 6-9 hrs y hay un aumento posterior de MGI (124 hrs) debido a nuevas divisiones celulares efectuadas in vitro.

TIEMPO (horas)

confluentes son capaces de secretar MGI antes de 3 horas de haber sido estimuladas a proliferar, se procedió a determinar la presencia de MGI intracelular en cultivos confluentes en reposo. Para ello, se lisaron en 1.8 ml de ME, 1×10^6 células epiteliales de un cultivo en inhibición por contacto, mediante 2 períodos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido, seguido de 30 seg de agitación vigorosa en vortex, después de lo cual se congela la muestra así obtenida a -20°C hasta su uso. Se emplearon alícuotas de 200 y 500 mcl en los cultivos en agar y 400 mcl para los cultivos en medios líquidos. Encontramos actividad inductora a la formación de colonias en todos los lisados, al usar 200 mcl se obtuvieron 2 colonias/ 10^5 células mientras que 4 colonias/ 10^5 células para cuando se utilizaron 500 mcl. En medio líquido, en los cultivos con lisado se obtuvo una población de 3.7×10^4 células en comparación de sólo 2.8×10^4 en los cultivos control. Es interesante hacer notar que el resultado obtenido en medios líquidos, fué muy semejante al encontrado cuando se utilizó el MC durante 3 hrs después de la estimulación a la proliferación de células en saturación en un plato mantenido en las mismas condiciones de cultivo. Finalmente vale la pena mencionar que cuando utilizamos el lisado proveniente del cultivo obtenido 5 días después de adicionar el MCOR, se obtuvieron 27 colonias/ 10^5 células y 3.6×10^4 células. Las células epiteliales en esta segunda inhibición por contacto tenían 1×10^6 células en lugar de 8×10^6 de la primera inhibición.

INDUCCION A LA SECRECION DE MGI POR MACROFAGOS PERITONEALES RESIDENTES E INDUCIDOS, MEDIANTE EL MEDIO CONDICIONADO POR FIBROBLASTOS.

Tomando en consideración que los fibroblastos al ser estimulados a proliferar secretaban un MC rico en MGI, se procedió a activar a macrófagos peritoneales mediante este MC para determinar si eran capaces de secretar nuevo MGI. Para ello, se agregó un 40% de medio condicionado por fibroblastos (MCF) (6 días, R1) a monocapas de macrófagos, tanto inducidos como residentes por espacio de 5 días. Aunque estos medios registraron una actividad formadora de colonias mayor que el negativo y que los controles de macrófagos sin MCF, ésta no fue mayor que la encontrada en los cultivos en los cuales se utilizó MCF. En consecuencia, no se pudo determinar si el MCF indujo a la formación de MGI de macrófago, por tanto se creyó conveniente el realizar una cromatografía por peso molecular para determinar si aparte del MGI de fibroblastos existía también uno de macrófagos.

DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DEL MGI DE FIBROBLASTOS, DE CELULAS EPITELIALES, DE MACROFAGOS PERITONEALES INDUCIDOS Y DE CELULAS DE MEDULA OSEA.

Una vez establecido que una célula al ser estimulada a proliferar produce MGI, y con la finalidad de determinar si cada estirpe celular produce un solo tipo de este factor, se procedió a evaluar los pesos moleculares del MGI proveniente tanto de células epiteliales, como de fibroblastos. Por otro lado, para determinar si una célula mieloide al ser estimulada a proliferar con MGI produce un segundo MGI se obtuvieron los pesos moleculares tanto de macrófagos inducidos a la cavidad peritoneal, como de células de médula ósea, 4 días después de ser

cocultivados con MCF. Dos mililitros de cada MC fueron cromatografiados por tamizado molecular en una columna de 2.5 x 90 cm utilizando como eluyente Tris-HCl, pH 7.4 a 4°C en Sephadex G 100 como matriz, colectándose 100 fracciones de 4.5 ml. Para los ensayos biológicos, se usaron alícuotas de 0.5 ml de cada fracción tanto para la técnica de bicapa en agar como para la de proliferación de células de médula ósea en líquido.

Los picos de actividad correspondientes al los diferentes MGI's fueron de 72,000 daltones para fibroblastos (Fig. 6), 21,000 para células epiteliales (Fig. 7), 72,000 60,000 y 35,000 para MC por macrófagos inducidos (Fig. 8 a y b) y 72,000 47,000 y 21,000 para el MC por células de médula ósea (Fig. 9). Nuestros resultados indican que el MGI de fibroblastos es diferente al de células epiteliales y que al inducir a macrófagos a proliferar producen a su vez un MGI diferente al del inductor. Finalmente, se encontró que al estimular células de médula ósea a proliferar aparecía más de un MGI nuevo.

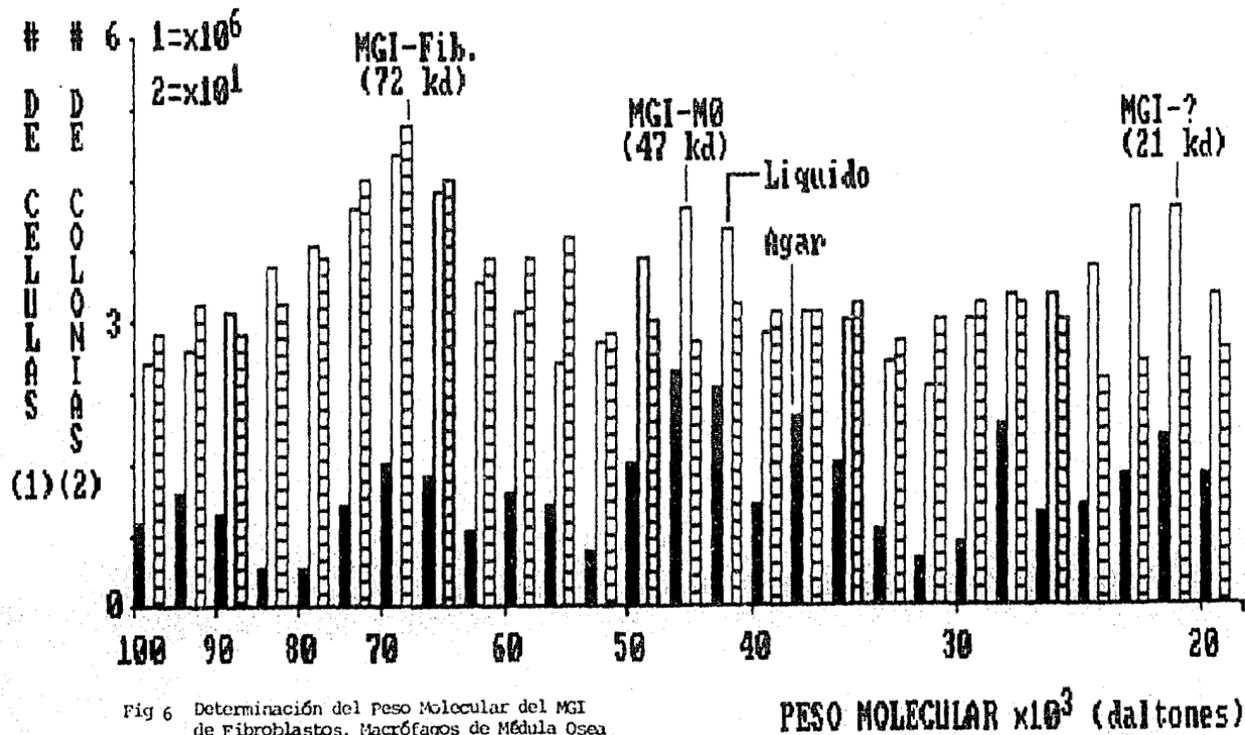


Fig 6 Determinación del Peso Molecular del MGI de Fibroblastos, Macrófagos de Médula Osea y Epitelio.

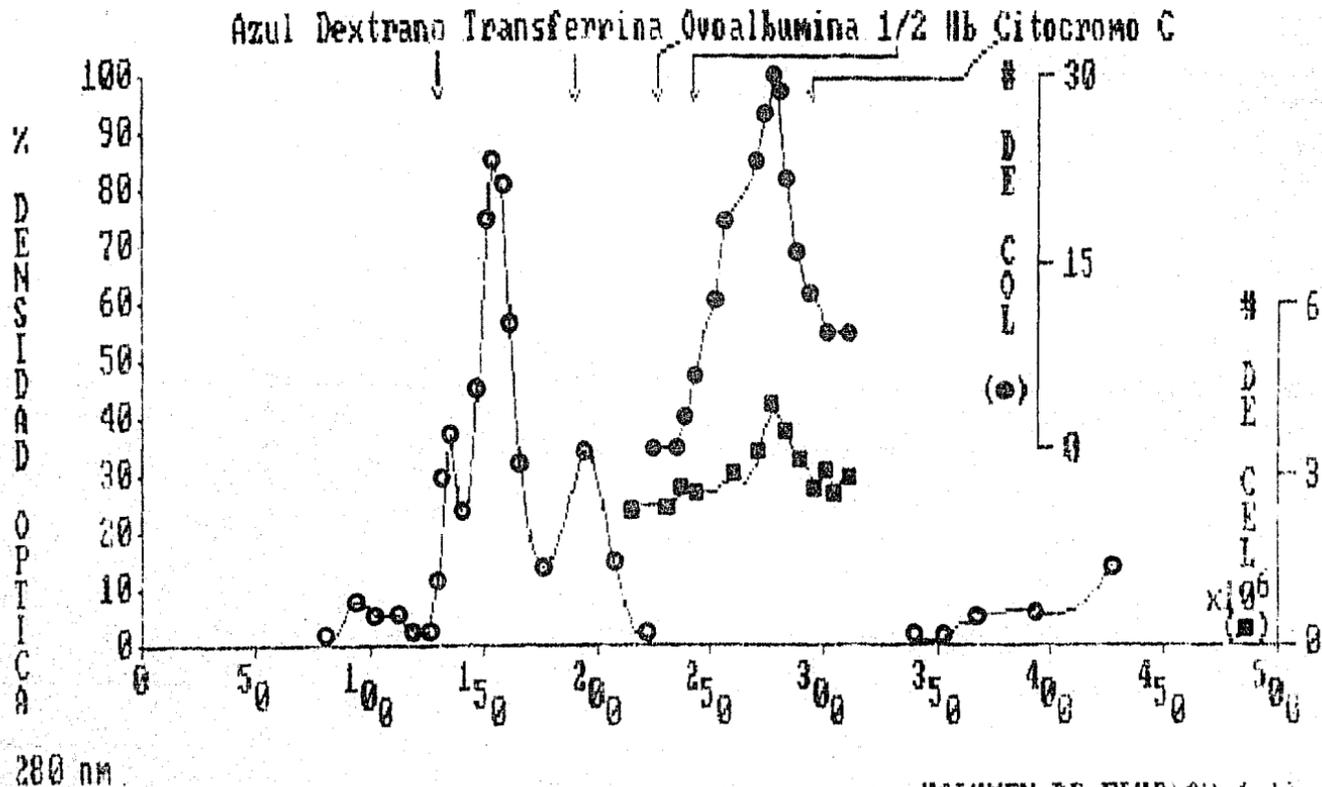
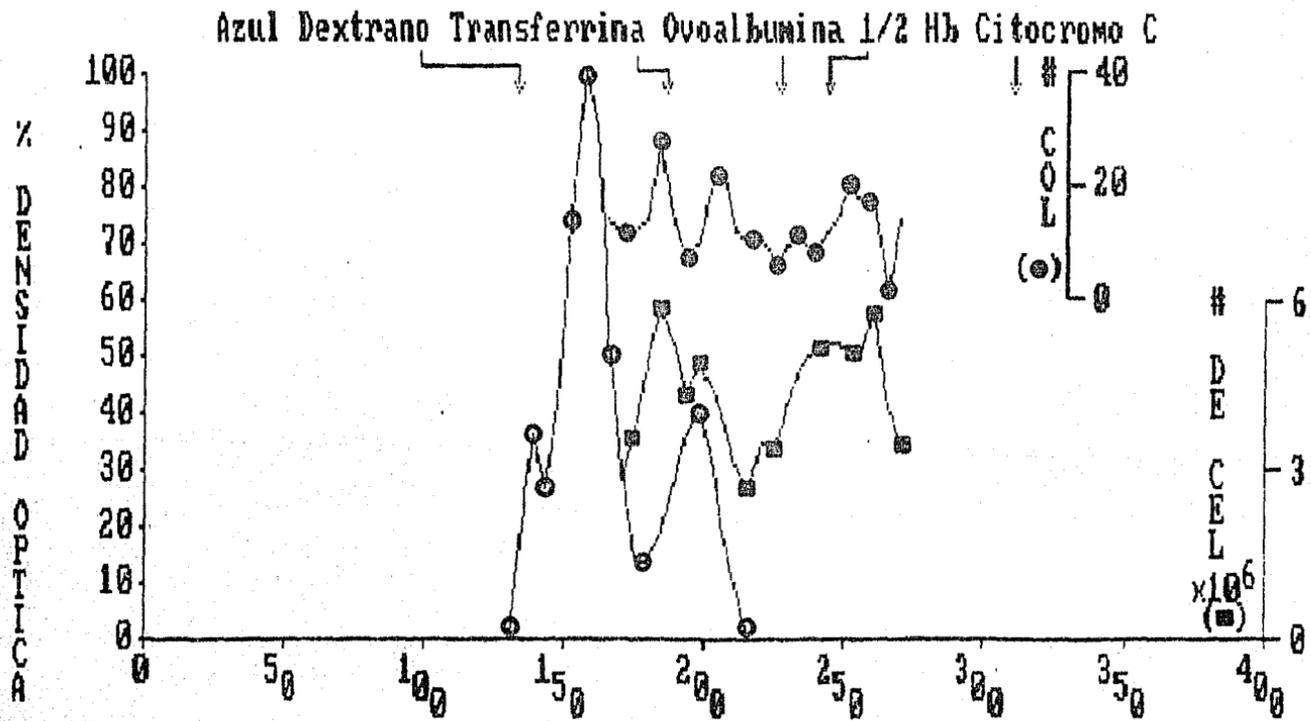


Fig. 7 Perfil de elución de Proteínas y MGI del MC por Células Epiteliales. La gráfica revela un pico máximo de actividad que corresponde tanto a las determinaciones en medio líquido (○) como en agar (●) con un peso molecular de 21 000 daltones.

VOLUMEN DE ELUCION (ml)



280 nm
(○)

Fig. 8a Perfil de elución de Proteínas y MGI del MC por Macrófagos Inducidos en presencia de MC por Fibroblastos. La gráfica-revela 3 picos de actividad casi correspondientes tanto en medios líquidos (●) como en agar (■) con pesos moleculares de 72 000, 60 000 y 35 000 daltones respectivamente.

VOLUMEN DE ELUCION (ml)

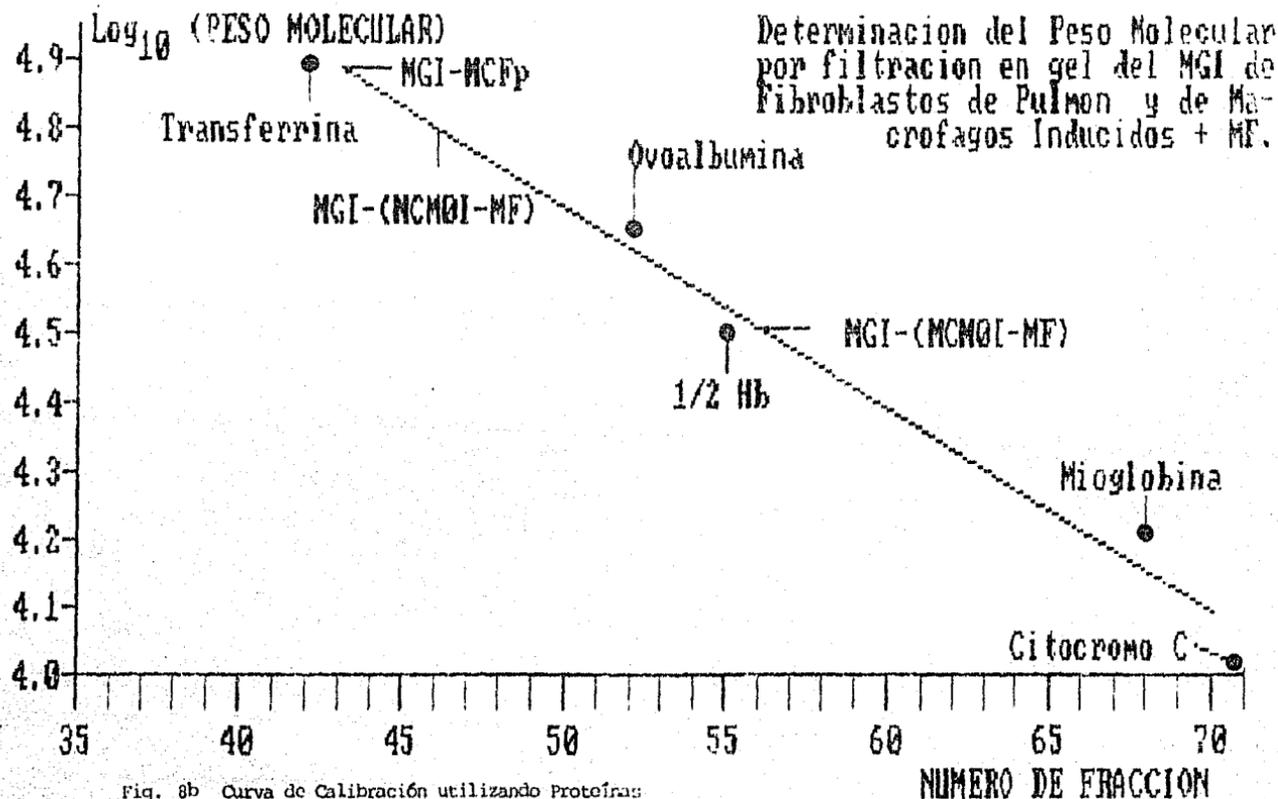


Fig. 8b Curva de Calibración utilizando Proteínas de Peso Molecular conocido.

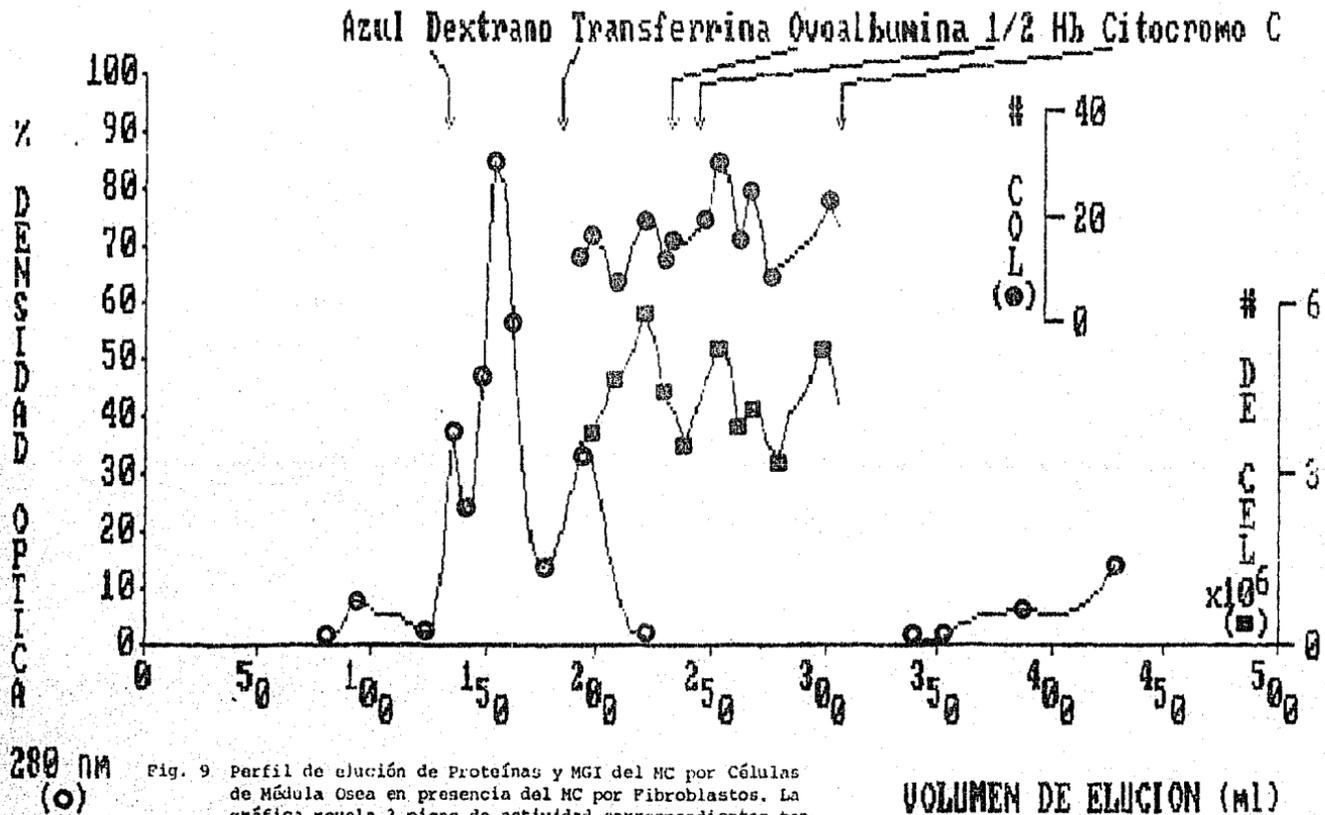


Fig. 9 Perfil de elución de Proteínas y MGI del MC por Células de Médula Osea en presencia del MC por Fibroblastos. La gráfica revela 3 picos de actividad correspondientes tanto en medios líquidos (■) como en agar (○) con pesos moleculares de 72 000, 47 000 y 21 000 daltonas respectivamente.

280 NM
(○)

VOLUMEN DE ELUCION (ml)

IV D I S C U S I O N

El inductor de macrófagos y granulocitos (MGI), o factor de formación de colonias (CSF), es un factor ampliamente estudiado entre los que regulan la producción de células blancas en el organismo. En este trabajo, presentamos evidencias de que el fenómeno de proliferación celular va íntimamente ligado a la producción de MGI, puesto que siempre que existía una división celular se detectaba secreción de MGI en el medio de cultivo.

Hasta ahora, otras investigaciones habían arrojado un panorama muy heterogéneo en cuanto al tipo de célula que produce MGI, pues se encontró que algunas líneas celulares como ciertos órganos producen este factor, mientras que otros no. En consecuencia, no se sabía con certeza que tipos de células y en que condiciones producían MGI. Nuestro trabajo pretende contribuir a esclarecer este punto al dar datos que indican que cualquier célula es capaz de producir este factor, siempre y cuando se encuentre en proliferación activa. Creemos pues, que la falla de algunos autores para detectar MGI en sus experimentos, se debió únicamente a que las células estudiadas no se encontraban en proliferación. Es evidente que, más tipos de células se tendrán que cultivar para demostrar la generalidad de nuestros resultados, pero el hecho de que toda investigación con líneas celulares efectuado a la fecha ha dado un MGI, parece confirmar nuestra teoría. Los resultados obtenidos, indican que siempre que

exista una división celular en el organismo, debe de haber una producción de macrófagos y granulocitos a través de la ³⁹ participación del MGI. Creemos que esta suposición es lógica, pues nuevas células sanguíneas deben de estar presentes al formarse nuevo tejido, para que de esta manera todo el organismo funcione adecuadamente. Como en el organismo se encuentran tanto células epiteliales, como sanguíneas en proliferación abundante y continua, suponemos que se debe de producir una cantidad permanente de MGI, la cual sería responsable de la constante producción de macrófagos y granulocitos asegurando así, un sistema de vigilancia contra cuerpos extraños.

Cuando un organismo es expuesto a la invasión de antígenos que han logrado librar la barrera epitelial por alguna lesión de daño tisular, el primer tejido en responder es el epitelio el cual se divide para regenerar el daño, trayendo en consecuencia una producción de MGI. Si el daño tisular involucra capas más internas y hasta órganos, los fibroblastos de manera similar actuarían produciendo una mayor cantidad de este factor. Esta producción de MGI traerá como consecuencia la producción de nuevos leucocitos que acudirán al lugar de la infiltración para combatir a los cuerpos extraños. Hemos encontrado, que las moléculas de MGI de uno y otro tipo celular son de PM distintos; la molécula producida por epitelio es mucho más pequeña, pero de una alta efectividad en comparación con la de fibroblastos que es más grande y menos efectiva. Pensemos que evolutivamente, el organismo a seleccionado moléculas de distinta potencialidad; una molécula de bajo costo energético y muy potente como la producida por epitelio, que actuaría casi inmediatamente, pues es la piel

el órgano que está más expuesto al medio ambiente, y otra molécula más pesada y menos efectiva, producida por fibroblatos⁴⁰ no siempre expuestos al medio ambiente. Sospechamos también que una célula epitelial produce más MGI que una célula fibroblástica, pues la primera tiene más volumen celular y la morfología en cultivo in vitro es de láminas mientras que los fibroblastos tienden a formar fibras y a unirse en delgadas o finas formaciones, tendiendo las células a contener más proteínas.

El hecho, de que disminuyó la producción de MGI al acercarse tanto los cultivos de fibroblastos y células epiteliales a saturación (inhibición por contacto) (Fig. 3 y 4) indica probablemente que una información de sociedad de células fue transmitida para dejar de producirlo. Podemos explicarnos éste "ralentando" en la producción de MGI cuando las células llegan a la confluencia, en base a nuestra idea de que sólo las células en proliferación forman moléculas de MGI.

En nuestros resultados, encontramos que cuando las células llegaban a saturación mantienen en su interior una cierta cantidad de MGI, probablemente producto de la última división de cada célula. Es interesante determinar si el MGI no secretado por estas células en confluencia permanece dentro de ellas aguardando el momento de liberarlo, dado que esto implicaría que la mayoría de las células de nuestro organismo al encontrarse en un estado de no proliferación guardarían una reserva de MGI dispuesta a ser utilizada en caso necesario. Sería en consecuencia, un sistema de alarma que aseguraría una rápida respuesta sin necesidad de recurrir a un nuevo ciclo de proliferación celular para

garantizar una suficiente cantidad de este factor.

En este trabajo, encontramos que el MGI intracelular puede 41 liberarse tanto al resembrarse las células en inhibición por contacto a baja densidad para que proliferen nuevamente, como cuando se cambia el medio de cultivo por un medio nuevo solo, o suplementado con un inductor a la proliferación de fibroblastos o de células epiteliales (FPF y FPE) (por sus siglas en inglés, Fibroblast Proliferation Factor y Epithelium Proliferation Factor, respectivamente) proveniente de medio condicionado (MC) por macrófagos residentes al ser estimulados con lipopolisacáridos de paredes bacterianas (MCOR-LPS). Creemos que los mecanismos de acción a la proliferación de las células, que se ven puestos en marcha ante estímulos externos como éstos, son los que ocasionan la liberación del MGI almacenado, puesto que detectamos una liberación de este factor a las 3 horas, el cual llegaba a un máximo a las 9 para mantenerse constante por más de 24, lo cual no sería explicable por una síntesis proteínica de novo (Fig. 3, 4 y 5). Encontramos que al utilizar MCOR-LPS había una liberación significativa a las 3 horas, pero que cuando se utilizó el método de resiembra no se presentaba sino hasta las 6 horas. Suponemos que la tardanza en liberar MGI era consecuencia del daño ocasionado a los fibroblastos por el tratamiento enzimático utilizado para despejarlos del sustrato antes de ser resembrados. Es interesante hacer notar que las células provenientes de una resiembra tardaron aproximadamente 3 horas en adherirse al nuevo sustrato de cultivo, que es justamente el tiempo que tardan de más en liberar su MGI, respecto al de las células que fueron inducidas a proliferar por MCOR-LPS. También

es importante resaltar, que en los cultivos en presencia de MCR-LPS se encontró una segunda liberación de MGI a los 5 días de cultivo. Siendo que para este tiempo ya había una nueva proliferación celular, consideramos que esta nueva liberación del factor corresponde a una nueva síntesis resultante de un proceso de división celular. In vivo el suero de ratón presenta, después de 3 hrs de un reto endotóxico, una gran concentración de MGI; la pregunta es, si no puede sintetizarse una proteína en menos de 3hrs dado que la fase S del ciclo celular tiene una duración de 5-6 hrs, como es que el suero contiene tal concentración de MGI?. En consecuencia y en base a nuestros resultados, creemos que el MGI detectado proviene de una liberación de este factor por células que fueron estimuladas a la proliferación por la endotoxina.

Uno de los MGIs más estudiados corresponde al obtenido del medio condicionado por pulmones de ratón después de un reto con endotoxinas. Esta molécula tiene un peso molecular de 21,000 daltones y ha sido purificada a heterogeneidad (57). Si tomamos en consideración que el medio condicionado por pulmón necesita de más de dos días para la mejor cosecha de MGI, entonces suponemos que esta molécula no es producto de almacenamiento, sino de nueva síntesis. Si tomamos como cierto que una célula al dividirse produce MGI, entonces el reto endotóxico debe de producir una estimulación a la proliferación de algún tipo celular. Siendo que, el pulmón es un órgano complejo el cual contiene gran diversidad de células, sería muy difícil determinar de cual de ellas proviene la secreción de este factor. Sin embargo, es de esperarse que el MGI provenga ya sea del macrófago alveolar, que

es la célula que primero entra en contacto con la endotoxina, o de otra célula que se encuentre en grandes cantidades y que de ⁴³ manera indirecta sea inducida a proliferar por la presencia de la endotoxina. Como ya se ha determinado que los macrófagos alveolares activados con LPS no producen MGI (63), entonces creemos que la interacción de un macrófago con la endotoxina produce factores capaces de activar la proliferación ya sea de fibroblastos, o de células epiteliales las cuales se encuentran abundantemente en el pulmón. El hecho de haber obtenido una inducción a la proliferación de fibroblastos y de células epiteliales al cultivarlos en presencia de MCR-LPS parece corroborar nuestra suposición (Fig.2). Ahora, siendo que el MGI de fibroblastos es de 70,000 daltones, era de esperarse que las células epiteliales sean las que produzcan un MGI de 21,000 daltones, lo cual es confirmado por el peso molecular obtenido en este trabajo a partir del medio condicionado por células epiteliales.

Nuestros resultados muestran que las células epiteliales tienen un tiempo de doblaje de 94 hr, que es ligeramente mayor que el obtenido para el de los fibroblastos de 86 hr. Además, según nuestros datos, tenemos que la producción de MGI por fibroblastos fué la mitad del producido por células epiteliales (Tabla 1) lo cual equivaldría de acuerdo a nuestra hipótesis, que una célula epitelial al momento de dividirse produce una cantidad de MGI que resulta ser el doble del que una célula fibroblástica secreta en las mismas condiciones. Ya que, mediante inspección al microscopio observamos que las células epiteliales eran significativamente más grandes que las fibroblásticas, suponemos

que ésta pudiese ser la razón de la mayor producción de MGI. Sería recomendable el determinar ya sea el volumen de estas células, o la cantidad de proteínas totales que contienen, para corroborar si nuestra suposición es correcta. Por otro lado, tomando en consideración que los pesos moleculares de los MGIs de fibroblastos y células epiteliales son distintos, podemos suponer que la molécula de mayor tamaño, que es la correspondiente al fibroblasto, sea producida en menor cantidad que la molécula derivada de la célula epitelial la cual es, como veremos más adelante, mucho más pequeña. Además, si tomamos en consideración que las dos moléculas de MGI pueden tener distintas propiedades de activación en células de médula ósea, entonces el encontrar diferentes producciones de éstas, tendría una razón fisiológica más que de simple proporción. De demostrarse esta última suposición, apoyaría la idea de que las propiedades fisicoquímicas de los MGIs dependen del tipo celular que los producen (45). Por último, mencionaremos que aunque el ciclo celular de cada tipo de célula esta constituido de las mismas fases, estas pueden tener diferente duración, lo cual nos haría pensar que la fase de síntesis de MGI es mayor en las células epiteliales, que en los fibroblastos. Evidentemente, estudios detallados de cinética celular tendrán que ser efectuados para dilucidar este punto.

Este fenómeno de presentarse también in vivo, implicaría que el epitelio produce mas MGI que el tejido que contiene fibroblastos, lo cual aunado al hecho de que en el organismo normal el tejido que se presenta con mayor tasa de proliferación es el epitelial, nos daría una idea de la importancia de esta

molécula. Evidentemente, sería recomendable determinar los niveles de MGI de tipo epitelial en el torrente sanguíneo para corroborar nuestra hipótesis. Fisiológicamente, podríamos pensar que el MGI resultante de la división de células epiteliales en condiciones normales, podría ser el que asegure la presencia continua de macrófagos y granulocitos para el sistema de vigilancia contra cuerpos extraños existente normalmente en el organismo. Además, como el epitelio representa la primera línea de defensa contra cuerpos extraños, una lesión en éste al producir una mayor proliferación de células epiteliales, daría como resultado una mayor cantidad de MGI, lo cual repercutiría en una mayor producción de células inmunocompetentes que migrarían al lugar de la lesión. Aunque, en la literatura científica se encuentra una gran heterogeneidad respecto a los pesos moleculares del MGI, se ha llegado a suponer que los PM de todos estos dependen de una unidad monomérica de 23 000 daltones (39,40,41). Sin embargo, esta suposición no tiene gran aceptación, pues se han encontrado MGIs de tamaños mucho menores. Pensamos que biológicamente no es explicable que existan dos o más MGIs de diferentes características para producir el mismo efecto hematopoyético. No es lógico pensar que se gaste tanta energía en la fabricación de diferentes moléculas de proteína para un mismo fin. Más bien, creemos que el organismo contiene una abundante variedad de MGI, los cuales tienen funciones muy específicas, de tal manera que cada tipo celular fabrica su propio MGI. Es evidente, que estudios más detallados de los mecanismos de acción del MGI producido por distintas estirpes celulares tendrán que ser efectuados para poder aceptar esta

última hipótesis. Bajo la suposición de que una célula en proliferación produce MGI, entonces las células hematopoyéticas⁴⁶ serían las únicas con la propiedad de producir un segundo tipo de MGI, al ser inducidas a proliferar por un primer MGI. Nuestro trabajo parece apoyar este punto, pues al evaluar los pesos moleculares de los MGI existentes en los MC por células de médula ósea activadas con MGI de fibroblastos, encontramos aparte del factor de 72 000 daltones del fibroblasto, otras dos moléculas de 47 000 y 21 000 daltones (Fig. 6 y 9). Creemos, que la aparición de estos nuevos MGIs provienen de las células que fueron estimuladas a proliferar. Como ya se ha reportado que el MGI de la línea macrófago monocito es de 45 000 daltones (61), suponemos que es el precursor de los monocitos en la médula ósea el que produjo el MGI de 47 000 daltones, por otro lado la pequeña componente de 21 000 daltones creemos que proviene del tejido epitelial que normalmente está presente en los cultivos de médula ósea, y que como demostramos en este trabajo produce un peso molecular parecido.

De igual manera, al estimular a la proliferación a macrófagos inducidos a la cavidad peritoneal mediante MGI de fibroblastos, encontramos nuevos MGI en los MC de estas células (Fig. 8a y 8b). Como los resultados obtenidos mediante la técnica de colonias en agar y de cultivos en medios líquidos no corresponden entre sí, consideramos que nuevos experimentos tendrán que ser efectuados para poder asociar un peso molecular definido a estos MGI. Aparte de esta discrepancia encontrada entre las dos técnicas de evaluación de la proliferación utilizadas a lo largo de este trabajo, por lo general, los MGI detectados mediante la

técnica de colonias en agar fueron los mismos que los de proliferación de células de médula ósea en medios líquidos. 47

Para una mayor confiabilidad en los resultados que se realicen sobre este tema en el futuro, se recomendaría que se utilicen en forma complementaria estas dos técnicas, pues la que utiliza medios líquidos es más rápida y menos compleja, mientras que la que emplea medios semisólidos es más sensible.

Como una importante contribución al desarrollo del estudio del MGI y para apoyar los resultados presentados en este trabajo, se tendrían que elaborar técnicas que diluciden si en el suero humano normal existen diferentes MGIs procedentes de cada una de las distintas células presentes en el organismo. Evidentemente, de esta forma se obtendrá una "huella" característica de cada individuo. Así, si por algún motivo en el suero humano, apareciera un aumento, o disminución de algún tipo de MGI, o si se presentara una forma anormal de éste, se pensaría en la existencia de una falla en los procesos normales de regulación de la proliferación celular. Es importante señalar, que las técnicas convencionales de cultivos de médula ósea en medios líquidos o semisólidos, no son lo suficientemente sensibles para la detección de pequeñas cantidades de MGI, por lo tanto para detectar esta huella de MGIs, sería necesario utilizar otro tipo de técnicas de alta tecnología, como la de anticuerpos monoclonales, o la de cromatografía de líquidos a alta presión, entre otras. Evidentemente, sería de mucha utilidad el tener un ensayo que determine de una manera confiable cuando se presente un crecimiento tumoral en el organismo, que al final de cuentas no es más que un aumento incontrolable de la proliferación de

algún tipo de célula.

A últimas fechas se ha encontrado evidencias de que existe una ⁴⁸ íntima correlación entre diferentes factores de crecimiento para el buen funcionamiento del organismo. Especialmente, se ha visto que el macrófago es capaz de secretar un factor estimulador a la proliferación de fibroblastos, el cual a su vez produce un MGI que induce a la médula ósea a la producción de más macrófagos. En este trabajo, encontramos que los macrófagos también son capaces de activar a células epiteliales a la proliferación y que de igual manera estas últimas secretan un MGI. Consideramos que, sería conveniente ahondar nuestros estudios en los mecanismo de interrelación entre FPF, EPF y MGI aquí descritos, para determinar si nuestra hipótesis sobre la defensa del organismo contra cuerpos extraños es correcta. Esta hipótesis establece, que durante una reacción de daño de tejido, el macrófago al interaccionar contra un cuerpo extraño secreta EPF o FPF (dependiendo del tipo de lesión), el cual al hacer proliferar a células epiteliales o fibroblastos induce mediante un MGI, la producción de más macrófagos y granulocitos en la médula ósea, asegurando de esta manera, una rápida respuesta y una mejor eliminación del cuerpo extraño.

V APENDICES

APENDICE I

Preparación de Medio de Eagle:

Se mide un volumen de agua bidestilada 5% menor al volumen de medio total deseado, utilizando para ello 2 matraces. Se adicionan 13.4 g/l del medio de Eagle en polvo (Microlab, México), agitándose suavemente, se agregan 3.7 g de bicarbonato de sodio, 100 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomicina. Se completa el volumen deseado con agua bidestilada, se ajusta el Ph entre 0.2 y 0.3 menos del que se desea, que es de 7.2 (esto se hace con ácido clorhídrico) y se esteriliza por filtración con bióxido de carbono, pasándolo a través de una membrana millipore con poro de 0.22 u.

Este medio se utilizó para mantener a los cultivos celulares en condiciones normales in vitro. El medio esta constituido por los siguientes componentes químicos:

AMINOACIDOS	CONCENTRACION (mg/l)
L-Arginina.....	84.00
L-Cistina.....	62.57
L-Glutamina.....	584.00
Glicina.....	30.00
L-Histidina HCl.H. 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).....	104.00
L-Valina.....	94.00

VITAMINAS

D-Ca Pantotenato.....	4.00
Cloruro de Colina.....	4.00
Acido Fólico.....	7.20
Inositol.....	7.20
Nicotinamida.....	4.00
Piridoxal.HCl.....	4.00
Riboflavina.....	0.40
Tiamina.....	4.00

SALES INORGANICAS

Cloruro de Calcio Anhidro.....	200.00
Nitrato de Hierro III monohidratado.....	0.10
Cloruro de Potasio.....	400.00
Sulfato de Magnesio Anhidro.....	97.67
Cloruro de Sodio.....	6400.00
Fosfato monosódico monohidratado.....	125.00

OTROS COMPUESTOS

L-Glucosa.....	4500.00
Roja Fenol.....	15.00

APENDICE II

Preparación de Solución Salina de Fosfatos (SAF):

- SAF con Calcio y Magnesio.

En un litro de agua bidestilada, se disuelven las siguientes sustancias:

Cloruro de Calcio.....	0.10 g
Cloruro de Sodio.....	8.00 g
Fosfato de Sodio Monobásico.....	2.16 g
Fosfato de Potasio Monobásico.....	0.20 g
Cloruro de Magnesio.....	0.10 g
Cloruro de Potasio.....	0.20 g

Una vez disueltas estas sustancias, se ajusta el Ph a 7.2 con ácido clorhídrico y se esteriliza la solución por filtración en una membrana millipore cuyo poro es de 0.22 u.

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

1. Raymond C (1961): Methods of tissue culture. Ed Paul B Hoerber 3rd ed, New York USA pp 1-7.
2. Von Recklinghausen FD (1866): Ueber die erzeugung von rothen blutKörperchen. Arch Mikroskop Anat 2:137.
3. Roux W (1885): Bertrage zur entwicklungsmechanik des embryo. Ztschr Biol 21:411.
4. Arnold JU (1887): Ueber theilungsvorgange an den wanderzellen ihre progressiven und regressiven metamorphosen. Arch Mikroskop Anat 30:205.
5. Ljunggren CA (1897-98): Von der fähigkeit des häutepithels, ausserhalb des organismus sein leben zu behalten, mit berucksichtigung der transplantation. Deutsche Ztschr Chir 47:608.
6. Harrison RG (1907): Observations on the living developing nerve fiber. Proc Soc Exper Biol & Med 4:140.
7. Burrows MT (1910): The cultivation of tissues of the chick-embryo outside the body. JAMA 55:205.
8. Burrows MT (1913): The tissue culture as a physiological method. Tr Cong Am Physicians & Surgeons 9:77.
9. Carrel A and Baker LE (1926): The chemical nature of substances required for cell multiplication. J Exper Med 44:503.
10. Carrel A and Burrows MT (1910): Cultivation of adult tissues and organs outside of the body. JAMA 55:1379.
11. De Vita VT, Hellman S and Rosenberg SA (1982): Cancer

principles and practice of oncology. Ed JB Lippincott Co, 53
Philadelphia USA pp 62-63.

12. Luriya EA (1977): Hematopoietic and lymphoid tissue in culture. Ed Consultants Bureau, New York USA pp 1-5.
13. Vasiliev JM and Gelfand IM (1981): Neoplastic and normal cells in culture. Ed Cambridge University Press, New York USA pp 19-22.
14. Taub M and Sato G (1980): Growth of functional primary cultures of kidney epithelial cells in defined medium. J of C Phys 105:369-378.
15. Feder J and Tolbert WR (1983): The large-scale cultivation of mammalian cells. Sci Am 248:24-31.
16. Wahl SM, Wahl LM and McCarthy JB (1978): Lymphocyte-mediated activation of fibroblast proliferation and collagen production. J of Immunol 121:942-946.
17. Cline JM (1975): The white cell. Ed Harvard University Press Cambridge Massachusetts USA pp 1-2.
18. Till JE and McCulloch EA (1961): A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat Res 14:213-222.
19. Till JE and McCulloch EA (1980): Hematopoietic stem cell differentiation. Biochem Biophys Acta 605:431-459.
20. Johnson GR and Metcalf D (1979): The commitment of multipotential hematopoietic stem cells: Studies in vivo and in vitro. Ed. In Le Douarin N: Cell lineage stem cells and cell determination. Inserm Symp 10. Elsevier North Holland Biomedical Press pp 119.
21. Messner HA and Fauser AA (1980): Culture studies of human

- pluripotent hematopoietic progenitors. Blut 41:322-327.
22. Johnson GR and Metcalf D (1977): Pure and mixed erythroid colony formation in vitro stimulated by spleen conditioned medium with no detectable erythropoietin. Proc Natl Acad Sci USA 74:3879-3882.
 23. Hara H and Ogawa M (1978): Murine hematopoietic colonies in culture containing normoblasts, macrophages and megakaryocytes. Am J Hematol 4:23-24.
 24. Humphries RK, Jacky PB, Dill FJ, Eaves AC and Eaves CJ (1979): CFU-S in individual erythroid colonies derived in vitro from adult mouse marrow. Nature 279:718-720.
 25. Humphries RK, Eaves AC and Eaves CJ (1981) : Self-renewal of hematopoietic stem cells during mixed colony formation in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 78:3629-3633.
 26. Nakshata T and Ogawa M (1982): Identification in culture of a class of hemopoietic colony forming units with extensive capability to self-renewal and generate multipotential hemopoietic colonies. Proc Natl Acad Sci USA 79:3843-3847.
 27. Magli NC, Iscove NN and Ddartchenko N (1982): Transient nature of early hematopoietic spleen colonies. Nature 295:527-529.
 28. Hodgson GS and Bradley TR (1979): Properties of hematopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: Evidence for a pre-CFU-S cell. Nature 281:383-384.
 29. Harrison DE (1981): Competitive repopulation: A new assay for long term stem cell functional capacity. Blood 55:77-81.
 30. Ham WA and Cormack HD (1985): Tratado de histología. Ed Interamericana (Sa) México DF pp 199-201.

31. Oppenheim JJ, Rosenstreich MD and Potter M (1981): Cellular⁵⁵
functions in immunity and inflammation. Ed Edward Arnold pp
259-260.
32. Cohen S and Yoshida T (1977): Suppression of B-cell MIF
production by T-cells and soluble T-cell derived factors. J
of Immunol 119:719-721.
33. Paran M, Sachs L, Barak Y and Resnitzky P (1970): In vitro
induction of granulocyte differentiation in hemopoietic
cells from leukemic and non-leukemic patients. Proc Natl Acad
Sci USA 67:1542-1544.
34. Pluznik DH and Sachs L (1965): The cloning of normal "mast"
cells in tissue culture. J Cell Comp Physiol 66:319-322.
35. Pluznik DH and Sachs L (1966): The induction of clones of
normal "mast" cells by a substance from conditioned medium.
Exep Cell Res 43:553-557.
36. Ichikawa Y, Pluznik DH and Sachs L (1967): Feedback
inhibition of the development of macrophage and granulocyte
colonies. I. Inhibition by macrophages. Proc Natl Acad Sci
USA 58:1480-1483.
37. Sachs L (1974): Regulation of membrane changes,
differentiation and malignancy in carcinogenesis. Harvey
Lectures Vol 68 New York: Academic Press, pp 1.
38. Sachs L (1983): Constitutive gene expression and the
uncoupling of controls in leukemia: Regulatory proteins that
control growth and differentiation in normal and leukemic
myeloid cells. Normal and Neoplastic Hematopoiesis. Ed Alan
R Liss Inc, New York USA pp 57-58.
39. Sachs L (1978): Control of normal cell differentiation and

the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukemia. 56
Nature 274:535-537.

40. Lotem J, Lipton J and Sachs L (1980): Separation of different molecular forms of macrophage and granulocyte inducing proteins for normal and leukemic myeloid cells. Int J Cancer 25:763-765.
41. Nicola NA, Burgess AW and Metcalf D (1979): Similar molecular properties of granulocyte-macrophage colony stimulating factor produced by different organs. J Biol Chem 24:5290-5293.
42. Lipton J and Sachs L (1981): Characterization of macrophage and leukemic myeloid cells produced by the Krebs ascites tumor. Biochim Biophys Acta 673:552-554.
43. Weiss R and Sachs L (1978): Indirect induction of differentiation in myeloid leukemic cells by lipid A. Proc Natl Acad Sci USA 75:1374-1376.
44. Falk A and Sachs L (1980): Clonal regulation of the induction of macrophage and granulocyte inducing proteins for normal and leukemic myeloid cells. Int J Cancer 26:595-597.
45. Ichikawa Y, Pluznik DH and Sachs L (1966): In vitro control of the development of macrophage and granulocyte colonies. Proc Natl Acad Sci USA 56:488-490.
46. Austin PE, McCulloch EA and Till JE (1971): Characterization of the factor in L cell conditioned medium capable of stimulating colony formation by mouse marrow cells in culture. J Cell Physiol 77:121-123.
47. Landau T and Sachs L (1971): Characterization of the inducer required for the development of macrophage and granulocyte

48. Stanley ER and Heard PM (1977): Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells. J Biol Chem 252:4305-4307.
49. Page RC (1978): The macrophage as a secretory cell. Int Rev Cytol 52:119-121.
50. Ginsburg H and Sachs L (1963): Formation of pure suspension of mast cells in tissue culture by differentiation of lymphoid cells from the mouse thymus. J Natl Cancer Inst 31:1-4.
51. Bradley TR and Metcalf D (1966): The growth of mouse bone marrow cells in vitro. Aust J Exp Biol Med Sci 44:287-289.
52. Sachs L (1980): Constitutive uncoupling of pathways of gene expression that control growth differentiation in myeloid leukemia: A model for the origin and progression of malignancy. Proc Natl Acad Sci USA 77:6152-6154.
53. Fibach E, Landau T and Sachs L (1972): Normal differentiation of myeloid leukemic cells induced by a differentiation inducing protein. Nature New Biol 237:276-278.
54. Liebermann D, Hoffman-Liebermann B and Sachs L (1982): Regulation and role of different macrophage and granulocyte proteins in normal and leukemic myeloid cells. Int J Cancer 29:159-161.
55. Metcalf D (1969): Studies on colony formation in vitro by mouse bone marrow cells. I. Continuous cluster formation of the relation of clusters to colonies. J Cell Physiol 74:323-325.

56. Cabrera FG (1984): Determinación del peso molecular y pH ⁵⁸
Isoeléctrico del factor inductor a la proliferación y
diferenciación de macrófagos y granulocitos (MGI) contenido
en medios condicionados por una línea leucémica de tipo
macrofágico. Tesis Profesional Fac Ciencias UNAM pp 1-69.
57. Burgess A, Camakaris J and Metcalf D (1977): Purification and
properties of colony-stimulating factor from mouse lung
conditioned medium. J Biol Chem 252:1998-2001.
58. Stanley E and Heard PM (1977): Factors regulating macrophage
production and growth. Purification and some properties of
the colony stimulating factor from medium conditioned by
mouse L cells. J Biol Chem 252: 4305-4312.
59. Stanley ER and Metcalf D (1969): Partial purification and
some properties of the factor in normal and leukemic
human urine stimulating mouse bone marrow colony growth in
vitro. J Cell Physio 78:30-337.
60. Ralph P, Braxmeyer HF, Moore MAS and Nakoinz I (1978):
Induction of myeloid colony-stimulating activity in murine
monocyte tumor cell lines by macrophage activators and in a
T-cell line by concavalin A. Can Res 38:1414-1419.
61. Calcagno M, Pérez JR, Waldo MG, Cabrera G and Weiss B
(1982): Evidence of the existence of a factor that induces Fc
receptors on bone marrow cells. Blood 59:756-760.
62. Ralph P, Braxmeyer HE and Nakoinz I (1977): Immunostimulators
induce granulocyte macrophage colony stimulating activity and
block proliferation in a monocyte tumor cell line. J Exp Med
146:611.
63. Zambrano IR (1985): Inducción a la autoproliferación y

autodiferenciación de macrófagos murinos. Tesis profesional 59
Fac Ciencias UNAM pp 1-72.

64. Spratt NT (1947): A simple method for explanting and cultivating early chick embryos in vitro. Sci 106:452-454.
65. Wolff E and Haffen K (1952): Sur une methode de culture d'organes embryonnaires in vitro. Tex Rep Biol Med 10:463-466.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento al Dr. Bonny Weiss Steider por su apoyo y asesoramiento para la realización de este trabajo reconociéndole su paciencia, capacidad e inteligencia.

Asimismo agradecemos a la Biol. Teresita del niño Jesús Marín Hernández, a la Biol. Ma. Teresa Corona Ortega, a la Biol. Gloria Cabrera Pimentel, a la CDMO Julia Urdiales Ramos y al Biol. Ramiro Ríos Gómez por la revisión crítica del manuscrito y sus acertados consejos para la culminación de él.

Es de reconocer la valiosa ayuda del Dr. Guillermo Mendoza y del Dr. Mario Calcagno en la parte bioquímica de este trabajo.

Finalmente, expresamos nuestro agradecimiento a los Señores Renulfo Pedraza y Jose Chavarría por su colaboración técnica.

Por otra parte, agradecemos al Dr. Domingo Zipitria por su apoyo en la aportación de animales para la realización experimental.

(recombinación de fibrillas a alta densidad)

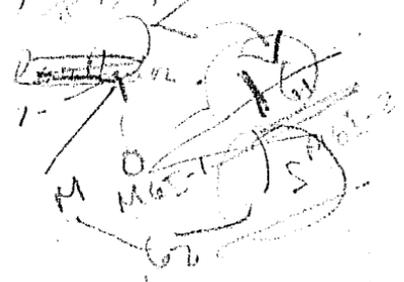
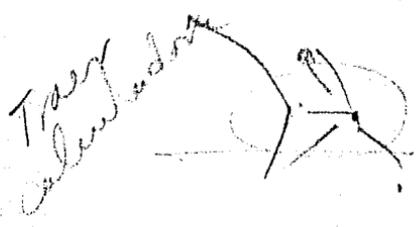
3. Bien si hay liberación de M6I a los 6 hrs.
para recombinar y a los 3 hrs que suceden
entonces quiero decir que hay M6I intracelular
(liberación de M6I intracelular
de células epiteliales en solución).

4. Se sabe que F y C ep producen \rightarrow M6I
por otro lado se conoce que ϕ produce
EPI e inducción EPI? por otro
lado cuando ϕ estas fijas celulares proliferan
en cultivos deben de producir M6I.

(Inducción a la proliferación de F y C e
mediante el virus ϕ (Fig 2.11) y

(Fig 3, 4 11).

P, M, L, M, M, M, R, B, S, R, D, F, P, E
 A, R, P, S, T, C, M, B, C, P, I, A, L, d



N_{total} = # de divisiones celulares por unidad
 la formación de una célula en vitro

D_c = Divisiones celulares totales $\times 10^3$

A = # de colonias producidas

$$N_{total} = \frac{D_c}{A} = \frac{N_0 e^{kt-1}}{A}$$

20 cell

RESULTADOS

1 - ¿Relación de proliferación celular y producción de M6I?

(cinética de producción de M6I + y Cep)

2 - ¿Cuándo una célula ^{es estimulada} deja de proliferar sintotiza de nuevo M6I? ¿presen en una cierta cantidad de este factor afinoconada?

Existe un certo y de la felicidad que
se puede encontrar en la vida
cuando se vive en armonía con
los demás y con uno mismo.