

11261
2ej
3

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA

"EVIDENCIA DE QUE EL INDUCTOR DE MACROFAGOS Y GRANULOCITOS (MGI)
ES PRODUCIDO DURANTE LA PROLIFERACION CELULAR, ALMACENADO EN G₀,
LIBERADO EN G₁, CELULA ESPECIFICO E INDUCE LA SECRECION DE OTRAS
ACTIVIDADES ESTIMULADORAS DE COLONIAS (CSA)."

T E S I S

que para obtener el titulo de:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS (INMUNOLOGIA)

presenta:

JULIO ROBERTO CACERES CORTES

FALLA DE ORIGEN

1989



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.

INDICE.

-Dedicatorio.

-Titulo.

-Reconocimiento y Agradecimientos. pag.

-Resumen.....1

-Introduccion.....2

I. HEMATOPOYESIS Y MEDULA OSEA.....2	
A. Conceptos generales.....2	
B. Las celulas madre hematopoyeticas pluripotenciales.....4	
C. Progenitores hematopoyeticos comprometidos.....7	
D. La medula osea <i>in vivo</i>8	
II. SISTEMAS PARA EL ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DE LA HEMATOPOYESIS.10	
A. El cultivo de tejido hematopoyetico.....10	
a1. Nomenclatura y clasificacion de las celulas formadoras de colonias.....11	
a2. Tipos de progenitores formadores de colonias <i>in vitro</i>12	
a3. Consideraciones acerca de la interpretacion del aparente potencial diferenciador de las UFC.....14	
a4. Ambigüedades en la identificacion de colonias celulares.....14	
a5. Analisis de la clonalidad de una sola celula.....20	
B. Cultivos a largo plazo de medula osea.....24	
b1. Principios de la tecnica.....24	
b2. Estructura de la monocapa adherente.....25	
b3. Tipos celulares producidos en los cultivos a largo plazo.....26	
b4. El uso de cultivos a largo plazo en el analisis del papel del microambiente.....26	
b5. Papel de los factores hematopoyeticos en los cultivos de medula osea a largo plazo.....27	
C. Lineas de progenitores hematopoyeticos celulares factor dependientes.....29	
III. DETECCION Y CUANTIFICACION DE FACTORES QUE REGULAN LA PROLIFERACION Y DIFERENCIACION DE LAS CELULAS HEMATOPOYETICAS.....30	
A. Los factores de crecimiento hematopoyeticos.....30	
B. Fuentes comunes de los FECs.....36	
C. Fuentes celulares de factores de crecimiento.....38	
IV. PROLIFERACION Y DIFERENCIACION DE LAS CELULAS MIELOIDES.....40	
A. El acoplamiento entre la proliferacion y la diferenciacion de celulas mieloides.....40	

V. APORTACIONES, COMENTARIOS Y PERSPECTIVAS.....	41
A. Diferentes teorías sobre el funcionamiento y el origen de los factores de crecimiento hematopoyéticos.....	41
B. Críticas.....	44
C. Conclusiones.....	45
-Bibliografía.....	46
-Carta de aceptación del Artículo 1.....	63
-Artículo 1.....	64
-Carta de aceptación del Artículo 2.....	67
-Artículo 2.....	88

Dedicatoria:

- A mi esposa con amor!
Carmen Cecilia Perez Munquie.
- A nuestro hermoso bebe!
Pavel Sebastian Caceres Perez.
- A mi mama:
Leonor Cortes Bolivar.
- A mis hermanos:
Eleonora, Angula y Carlos.
- A la memoria de mi padre!
Julio R. Caceres Diaz.
- A la memoria de un gran amigo!
Alejandro Rosas Argues.
- A mis compañeros de laboratorio.
- A mis verdaderos amigos en la vida.

Titulo de la Tesis: EVIDENCIA DE QUE EL INDUCTOR DE MACROFAGOS Y GRANULOCITOS (MGI) ES PRODUCIDO DURANTE LA PROLIFERACION CELULAR, ALMACENADO EN GO, LIBERADO EN SI, CELULA ESPECIFICO E INDUCE LA SECRECION DE OTRAS ACTIVIDADES ESTIMULADORAS DE COLONIAS (CSA):

Tesis que se presenta para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biomédicas (Inmunología), en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Reconocimiento:

El trabajo experimental de la presente tesis se realizó en el Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza-UNAM, encabezado por el Dr. Benny Weiss Steider.

Agradecimientos:

Deseo agradecer sinceramente a: M en C Rodrigo Zembrano, M en C Jorge Mendoza, Biol. Edelmiro Santiago, Biol. Lourdes Mora, M en C Teresa Corona, Biol. Guadalupe Morales, Biol. Teresa Marín y Dr. Benny Weiss S. por su participación y colaboración en la realización de los presentes artículos publicados en los cuales se apoya esta tesis.

Quiero mencionar en forma muy especial al Dr. Benny Weiss para quien supo brindar su valioso apoyo académico y moral en una época difícil pero de muchos logros y retos.

Son miembros del jurado y aprobaron la tesis de Maestría:

- Dr. Ruben Darío Martínez.
- Dr. Edgar Zenteno Galindo.
- Dr. Armando Isibasi Araujo.
- Dr. Javier Torres López.
- Dr. Benny Weiss Steider.
- Dr. Juan C. Díaz Zagoys.
- MC Jorge Arellano Blanco.

RESUMEN.

El inductor de macrófagos y granulocitos (MGI, por sus siglas en Inglés, Macrophage and Granulocyte Inducer) o Factor Estimulante de Colonias (CSF, del Inglés Colony-Stimulating Factor), es producido y secretado por una gran variedad de tejidos y tipos celulares en el organismo. Desde hace tiempo se conoce, asimismo, la gran heterogeneidad que presenta este factor biológico en cuanto a su peso molecular. Sin embargo, no se sabe que tipo de MGI produce cada célula y en que circunstancias específicas es liberado. En los artículos publicados y presentados a continuación, se dan evidencias experimentales de que cada tipo celular produce su propio MGI con características diferentes, en cuanto a su actividad sobre la proliferación y diferenciación de los precursores de la médula ósea, siempre y cuando las células productoras de MGI estén a su vez en proliferación activa. Con esta finalidad, se cultivaron fibroblastos y células epiteliales de pulmón y riñón de ratón, para determinar si la producción de MGI estaba relacionada con el número de divisiones celulares efectuadas en cultivo in vitro. Los datos revelan que la producción de este factor se lleva a cabo solo durante el ciclo de división celular y que se detiene cuando dichas divisiones son suspendidas. Inclusive, la producción de este factor se reobta cuando las células son estimuladas a proliferar nuevamente por medio de agentes físicos o biológicos.

En la segunda parte de la investigación, se tomó el MGI producido por fibroblastos (CSF-1) para inducir la proliferación de células de médula ósea, con la finalidad de evaluar si un MGI induce la aparición de otros. Nuestros resultados muestran que el M-CSF o también llamado CSF-1, al inducir la proliferación de células médula ósea, induce asimismo a la producción de otros tres nuevos MGI. Los nuevos MGI presentaron un peso molecular aparente de 45, 30 y 17 K daltones. Suponemos que el pico de 45 K es el producido por los monocitos en respuesta al CSF-1 ya que hay reportes (Weiss B, 1982) de que una línea de tipo macrófágico WR19 es capaz de producir un MGI de este mismo peso, y que monocitos humanos secretan una molécula igual (Sachs, L. 1981). Aún no determinamos la procedencia del MGI de 30 K, siendo el de 17 K la IL-1 secretada igualmente por los macrófagos. De manera similar se indujo a la médula ósea a la proliferación con un MGI de 45 K, con la finalidad de determinar si este MGI era capaz de inducir a la producción de otros MGI. Para ello se cromatógrafió el medio condicionado por la médula ósea activada con el MGI de 45 K. Encontramos aparte del pico de 45 K otros de 30 K y 17 K.

Como aportación a la teoría moderna de la hematopoyesis, se discute la integración de circuitos celulares y mecanismos reguladores, mediante los cuales durante un proceso de proliferación y diferenciación, participen células del estroma medular como son los epitelios y los fibroblastos junto con los progenitores hematopoiéticos y los factores recientemente caracterizados.

INTRODUCCION.

I. HEMATOPOYESIS Y MEDULA OSEA.

A. Conceptos actuales.

La medula osea no solamente esta involucrada en la generacion de celulas maduras accesorias encargadas de la respuesta inmune no especifica (1,2), sino tambien en la produccion de varios tipos de linfocitos T y B (3,4) asociados con la funcion del sistema inmune especifico. Las celulas accesorias incluyen a las celulas especializadas presentadoras de antigenos como los macrfagos (2), celulas dendriticas (5), celulas intratimicas (6), celulas de Langerhans entre otras (7,8) y a celulas efectoras asociadas con la defensa inmunologica como los neutrofilos, eosinofilos, basofilos, monocitos (1,2), celulas cebadas (9,10) y celulas NK (11,12). Es interesante mencionar que el funcionamiento de estos sistemas celulares es controlado por la presencia de sustancias liberadas al medio por las mismas celulas. En particular es de hacerse notar que los productos secretados por los linfocitos, entre los que se encuentran las linfoquinas y las inmunoglobulinas, pueden regular las funciones de la mayoria de las celulas de la medula osea. Ademas mencionaremos que las linfoquinas derivadas de los linfocitos T, tienen aparte de las funciones de regulacion antes mencionadas las de induccion a la proliferacion de celulas hematopoyeticas de la medula osea (160,161). Aunque se sabe cada dia mas sobre cual tipo de celula fabrica y secreta que tipo de citocina, todavia se desconoce mucho sobre el mecanismo que controla su produccion.

Unicamente la eritropoyetina parece ser el paradigma de una hormona, debido a que su produccion en los rinones esta inversamente relacionada con el suministro de oxigeno al organo y a que su principal accion esta en la modulacion de la eritropoyesis en otro organo (la medula osea). Tambien existen otros factores que regulan la hematopoyesis que son producidos por celulas extramedulares como aquellas que forman el estroma entre las cuales se encuentran los fibroblastos y celulas endoteliales. Las celulas madre y las celulas progenitoras en la medula osea por tanto no solo estan sometidas al efecto de factores de regulacion secretados por las propias celulas hematopoyeticas sino por las celulas estromales que las rodean. En efecto los islotes de proliferacion hematopoyetica ocupan nichos que contienen diversos tipos de celulas sanguineas aparte de estar rodeadas por celulas endoteliales y fibroblasticas. El mecanismo por el cual se lleva acabo la coordinacion de este sistema no es obvio, pero se sabe que basta con la ocupacion por parte de los factores de tan solo un 10% de los receptores celulares para que el factor de crecimiento ejerza su efecto. Quizas la produccion de celulas de la sangre represente el resultado integrado de innumerables microcosmos en los cuales existen redes de interaccion aleatoria entre las celulas

estromales y las células hematopoyéticas (142).

La producción de células inmunológicamente competentes a partir de la médula ósea representa en sí un proceso importante para entender los mecanismos de la defensa del organismo contra cuernos extraños. Es justamente en este órgano en donde se crean las células maduras que participan en los mecanismos de defensa del sistema inmune no específico, como los macrófagos y granulocitos. Estas células aparte de participar en mecanismos de defensa no específicos como son la fagocitosis y la secreción de lisozimas, tienen también un papel en el sistema inmune específico al funcionar como células accesorias, presentadoras y procesadoras de antígeno, así como en la producción de citocinas importantes (interleucinas 1). Mencionaremos por último que es en la médula ósea en donde se generan los precursores de todos los linfocitos.

Mucho de lo que se sabe acerca de la hematopoyesis, se ha aprendido a partir de experimentos *in vitro*. Esto se debe a que las células hematopoyéticas de la médula ósea pueden ser dispersadas en suspensiones de células individuales por medios mecánicos simples, permitiendo estudiar el crecimiento y la diferenciación hasta de la progenie de una sola célula *in vitro*. Se reproduce en la Fig. 1 un modelo de la hematopoyesis basado en los experimentos desarrollados *in vitro* durante los últimos 20 años que ilustra el principio general aceptado de que todas las células de la sangre derivan de una célula madre común pluripotencial y de linajes discretos de células progenitoras (147).

B. Las células madre hematopoyéticas pluripotenciales.

La evidencia de la existencia de células madre hematopoyéticas pluripotenciales fue primeramente obtenida de experimentos *in vivo* en los cuales células de la médula ósea fueron transferidas a hospederos irradiados. Se utilizaron marcadores cromosómicos únicos para demostrar que células mieloides y linfocitos T y B en dichos hospederos, provenían de una célula madre común (13,4). Desde entonces el ensayo estándar para células madre hematopoyéticas pluripotenciales ha sido el llamado de unidad formadora de colonias de bazo (UFCb) (mejor conocida por sus siglas en inglés CFU-S Colony-Forming Unit-Spleen) (14), el cual se basa en la observación de que la inyección de cantidades graduales de células de médula ósea en ratones irradiados letalmente resultaba en la aparición de colonias macroscópicas discretas en el bazo. Estas colonias estaban formadas de células sanguíneas de diferentes estirpes. Se ha demostrado que estas colonias son clones (15) que contienen proporciones variables de células eritroides y células mieloides. La transferencia de estas colonias individuales de bazo a otros receptores irradiados ha demostrado nuevamente la aparición de colonias que contienen más UFCb (16). De esta manera se han realizado múltiples transferencias en las que la progenie de una sola colonia ha sido seriamente transferida a múltiples ratones irradiados letalmente, demostrando siempre la presencia de

precursores hematopoyeticos en las UFCb y por tanto la existencia de celulas pluripotenciales (17,18).

La idea de la existencia de un limite en la capacidad de autorenovacion en las celulas madre hematopoyeticas es controvertida (17,19). Aunque los experimentos que tratan de la transferencia seriada de medula osea, a traves de hospederos irradiados (17,18), hayan demostrado el agotamiento eventual de la capacidad de las celulas madre hematopoyeticas de repoblar los sistemas hematopoyeticos de los animales, hay evidencias que apoyan el punto de vista de que esto refleja un efecto de trasplante (20,21) y no un limite intrinseco de la capacidad de renuevo de las celulas. Por ejemplo, experimentos en los cuales animales individuales son repetidamente tratados con drogas citotoxicas que selectivamente destruyen las celulas en division, demuestran que no existe evidencia del decremento en la capacidad de proliferacion de las celulas hematopoyeticas remanentes (21).

Es importante hacer notar que la poblacion de celulas hematopoyeticas pluripotenciales es heterogenea (19,22). Hay evidencias de que existe una jerarquia en estas celulas puesto que la maduracion se correlaciona con un decremento en el potencial de autorenuevo siendo este mas alto en las celulas en reposo que en las que ciclan (23,24). Recientemente se ha demostrado que las colonias, evaluadas 7 dias despues de la inyeccion de celulas de medula osea a ratones irradiados, forman una poblacion distinta con diferentes propiedades de aquellas colonias que toman 12 dias en aparecer (22). Las colonias del dia 12 contienen grandes cantidades de progenitores hematopoyeticos en contraste con las colonias del dia 7 que parecen estar hechas de celulas eritroides diferenciadas. Parece probable que las colonias del dia 12 contienen mas UFCb y la capacidad de repoblar animales con todos los linajes hematopoyeticos y linfoides, aunque esto tendra que ser formalmente establecido. Despues de esta demostracion de la heterogeneidad de las UFCb, muchos de los primeros datos estan siendo revisados.

Las celulas progenitoras, consideradas estas como la progenie inmediata de las celulas madre, son reconocidas *in vitro* por su habilidad de proliferar para producir colonias de celulas maduras del linaje apropiado. Por muchos anos se supo que la sobrevivencia, la proliferacion y el desarrollo de estas celulas "formadoras de colonias", requerian de la presencia continua de moleculas reguladoras del crecimiento.

Actualmente las tecnicas de clonacion molecular han permitido contar con los factores de crecimiento hematopoyetico en forma recombinante. La significancia de estos descubrimientos, seguramente ayudara al mejor entendimiento del proceso global de formacion de las celulas de la sangre, el cual comienza durante la embriogenesis con el establecimiento de pequenas cantidades de celulas madre hematopoyeticas (25).

En virtud de su habilidad de autorenovacion, suficientes celulas madre son generadas no solamente para mantener la

población de células sanguíneas a través de la vida adulta, sino para producir por diferenciación los progenitores de todas las células hematópoyéticas. Es obvio que el mantenimiento de la hematopoyesis requiere de un balance mantenido entre el autorenovación y la diferenciación. Si demasiadas células madre se diferencian sin garantizar su reemplazo, el sistema puede sufrir una depleción (anemia), mientras si pocas se diferencian y aumenta el número de células progenitoras, aparte de que no habrá suficiente espacio al compartimiento de células maduras, se crea un aumento anormal de células indiferenciadas (leucemias).

Observaciones de grupos independientes indicaron que colonias de granulocitos (neutrófilos) (26) o macrófagos (27) podrían desarrollarse en agar, cuando se tenía presente en el cultivo una capa de células sustentadoras o de un medio condicionado por células de tipo fibroblástico. Desde entonces modificaciones a esta técnica han proveído las condiciones para que otros tipos mieloides, como aquellos que expanden células rojas, plaquetas y eosinófilos, puedan ser estimulados para formar colonias (28).

C. Progenitores celulares hematópoyéticos comprometidos.

La entrada de una progenie de células hematópoyéticas pluripotenciales a una vía de diferenciación definida es conocida como compromiso celular. Se asume generalmente que el compromiso está acompañado de una restricción irreversible o pérdida del potencial generador de células de otros linajes (29). La mayor actividad proliferativa en la médula ósea parece que ocurre en los progenitores celulares comprometidos. Únicamente una pequeña proporción de las células madre pluripotenciales en la médula ósea está ciclando activamente en un momento dado (30) mientras que entre el 50 y el 70 % de los progenitores comprometidos tardíos, como las células formadoras de colonias de macrófagos y granulocitos, pueden ser destruidas por un pulso de timidina tritiada (31). La capacidad de proliferación generalmente declina en los miembros más diferenciados de un linaje, aunque claro que esto no ocurre para los linfocitos. Actualmente los conceptos de autorenovación de los progenitores comprometidos en la hematopoyesis normal y la generación de nuevos progenitores a partir de células madre pluripotenciales está sufriendo una reevaluación (32).

El proceso de compromiso en la diferenciación mielóide ocurre en etapas, por ejemplo para la producción de células de tipo granulocito y macrófago (Fig. 1); primero se produce un progenitor celular de ambos tipos celulares (célula formadora de colonias de granulocitos y macrófagos CFC-GM, mejor conocido por sus siglas en inglés GM-CFC; granulocyte and macrophage colony forming cell) el cual tiene la característica de haber perdido la capacidad de producir células distintas a macrófagos y granulocitos. Posteriormente este precursor produce a su vez otros progenitores celulares que son más restringidos en su potencial de proliferación los cuales pueden producir solamente granulocitos, o solamente macrófagos (CFC-G y CFC-M).

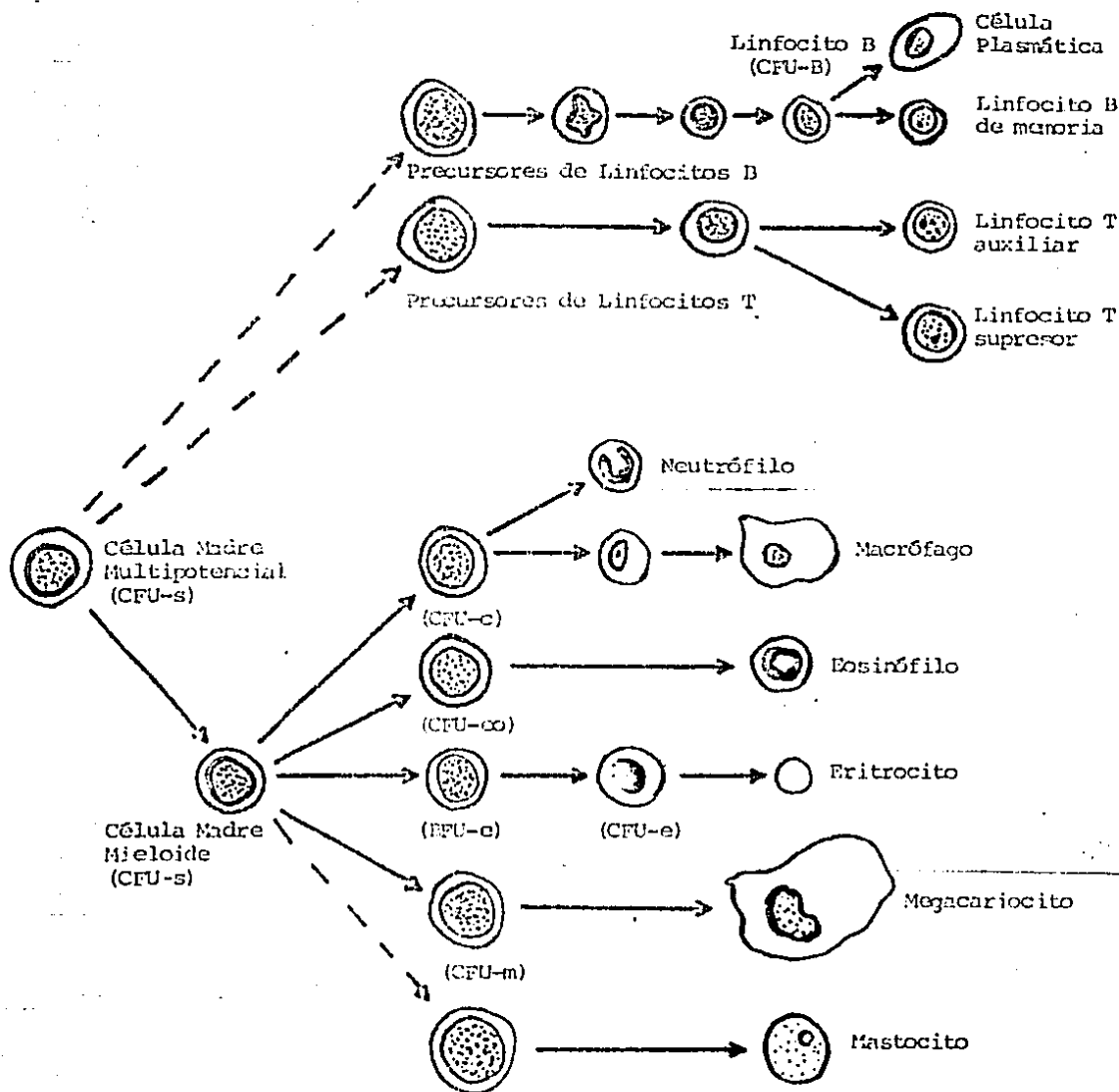


Diagrama 1.- Fases de maduración en el sistema hematolinfoide. Una célula precursora hematopoyética común puede originar a todos los elementos de la sangre y del sistema linfóide.

D. La medula osea In Vivo.

Antes de considerar con mas detalle los estudios sobre la diferenciacion de las celulas de la medula osea **in vitro**, es importante analizar la estructura de este organo. En contraste con la mayoria de los sistemas que se utilizan **in vitro** para el estudio de la medula osea que carecen de estroma extracelular, los experimentos realizados **in vivo** tienen que tomar en cuenta la existencia de una estructura de sosten bien organizada y anatomicamente muy compleja (33). El tejido de la medula osea esta organizado alrededor de un sistema extenso de paredes delgadas conocidas como los senos venosos. Las celulas maduras que se generan en la medula osea entran al torrente sanguineo a traves de las aperturas del citoplasma de las celulas endoteliales de estos senos venosos. Las celulas endoteliales se encuentran sobre la membrana basal la cual esta cubierta por las celulas adventicias en su cara externa, y estas a su vez se ramifican en el espacio perivascular formando un reticulo que contiene las celulas hematopoyeticas. Existen opiniones que consideran que los adipocitos de la medula osea, los cuales tienen un papel importante en la regulacion de la hematopoyesis (34), se derivan de estas celulas adventicias.

En algunos casos se pueden identificar morfologicamente algunas celulas progenitoras hematopoyeticas particulares y determinar su localizacion en el reticulo perivascular. Por ejemplo, se han observado megacariocitos diferenciados adyacentes a los senos perivasculares generando plaquetas. Generalmente las celulas en estadios iniciales de las vias de diferenciacion de eritrocitos y granulocitos se apartan de las paredes de los senos en comparacion con las demas celulas maduras. Mas aun se ha demostrado que en medula osea intensamente activa, las celulas especializadas como los macrofagos (35,36,43) o las celulas reticulares (36) o las multinucleadas (36) celulas ramificadas con un citoplasma electro denso, estan cercanamente asociadas con celulas hematopoyeticas inmaduras. Tambien hay evidencias de diferencias en la distribucion de varios progenitores en distintas regiones macroscopicas de la medula osea (37,38).

Es probable que pronto se tenga mas informacion acerca de la relacion anatomica entre celulas progenitoras hematopoyeticas especificas y tipos de celulas con posible funcion reguladora ya que actualmente se cuenta con marcadores de superficie especificos para cada tipo celular. Entre las posibles celulas reguladoras se encuentran aparte de las que pertenecen al mismo sistema hematopoyetico (macrofagos y celulas T) aquellas de tipo fibroblastico y epitelial. Es suficiente decir que la relaciones complejas e intimas entre las celulas hematopoyeticas y estromales en la medula osea **in vivo**, son destruidas en los sistemas de cultivo **in vitro** en lo que mucho del trabajo cientifico se ha basado. De hecho un aspecto clave de la mayoria de estos sistemas **in vitro** consiste en el estudio del aislamiento de celulas individuales, que conlleva al mejor entendimiento de sus funciones particulares.

II. SISTEMAS PARA EL ESTUDIO IN VITRO DE LA HEMATOPOYESIS.

A. El cultivo de tejido hematopoyetico.

El cultivo de tejidos hematopoyetico y linfoides ha logrado ser un metodo util para determinar su propia histogenesis. Estos tejidos no son cultivados por medio de las tecnicas comunmente descritas de explantes por celulas adherentes, los cuales no necesitan de factores de crecimiento externo para su proliferacion. Las celulas hematopoyeticas si necesitan de impulso mitotico pues no conservan su capacidad de proliferar por mucho tiempo *in vitro* sin la adicion de factores de crecimiento externos. Solo hasta el desarrollo de nuevas tecnologiss de cultivo, se permitio que estos tejidos proliferaran conservando y manifestando sus caracteristicas intrinsecas (39,40). El descubrimiento del ensayo de colonias *in vitro* de progenitores celulares hematopoyeticos fue un evento clave en los analisis *in vitro* de las celulas de la medula ossea. Fluznik y Sachs (39) y Bradley y Metcalf (40) observaron que los progenitores hematopoyeticos podian producir colonias de celulas diferenciadas cuando eran sembradas en suspensiones de celulas aisladas en medio de cultivo de tejidos en presencia de agar o metilcelulosa para formar un gel o medio viscoso. El crecimiento de esas colonias fue absolutamente dependiente de la presencia de celulas sustentadoras. Subsecuentemente se demostro que el papel de las celulas sustentadoras era producir factores de crecimiento y que dichas celulas podian ser reemplazadas por el medio condicionado (41,42). Asi se pudo lograr un sistema muy simplificado en el cual se podian analizar las acciones de diferentes sustancias nutritivas y en especial los factores de crecimiento y a los de diferenciacion y regulacion de estos tejidos. De esta forma los cultivos de tejidos hematopoyetico y linfoides se desarrollaron mediante tres tecnicas diferentes pero complementarias. Estas tecnicas que se diferencian principalmente en el tiempo de cultivo se clasifican en: corto plazo (menos de tres semanas), a largo plazo (mas de tres meses) y de lineas celulares que responden unicamente a determinados factores (43).

A.1 Nomenclatura y clasificacion de las celulas formadoras de colonias.

Los sistemas de colonias *in vitro* han formado la base de las ideas actuales que se tienen sobre las celulas progenitoras hematopoyeticas comprometidas. Inicialmente se supo que el potencial diferenciador de un progenitor celular o CFC, o unidad formadora de colonia en cultivo (UFC-c), podia inferirse a partir de la naturaleza de las celulas maduras que se encuentran en la colonia. De esta manera la celula que produce una colonia de macrofagos por ejemplo, se dice que ha sido una CFC de macrofago (CFC-M). Uno de los primeros frutos de la tecnologia de colonias fue la demostracion de celulas formadoras de colonias bipotenciales; por ejemplo, se comprobó que una sola CFC podia producir una colonia conteniendo macrofagos y neutrofilos

indicando que dichas células compartían un mismo progenitor (44).

Debe enfatizarse que la designación de una célula como progenitora de un linaje particular, con la implicación de su compromiso a un linaje y su restricción a producir otras células de otros linajes, es estrictamente operacional. La capacidad de una CFC dada, de expresar todo el rango del potencial diferenciador, depende de condiciones apropiadas; por ejemplo, de la presencia de múltiples factores solubles que no pueden ser necesariamente proveídos por cualquier sistema. Es así como los progenitores eritroides tempranos por ejemplo, pueden ser solo detectados en ensayos de colonias por la generación de células que contienen hemoglobina, un proceso que requiere de dos factores. El primero es el factor estimulante de colonia eritroide (también llamado BFA, del inglés Burst-Promoting Activity) y la segunda la eritropoyetina, la cual se requiere para las etapas tardías de la diferenciación (45,46,47). Por tanto no es muy aconsejable decir que la ausencia de un tipo particular de células en una colonia es indicio de que la CFC carece absolutamente de la capacidad de generar dicha célula.

A.2 Tipos de progenitores formadores de colonias In Vitro.

Cuando las condiciones son óptimas para el crecimiento y la diferenciación de un tipo particular de células hematopoyéticas, el sistema de colonias ofrece un medio conveniente para estimar la frecuencia de la CFC relevante en varias poblaciones de células de diferentes tejidos. Así los efectos sobre la frecuencia de una CFC en condiciones patológicas o experimentales puede ser monitoreada, y las características físicas y de superficie celular de la CFC pueden ser investigadas. Mas aún, hay métodos disponibles para analizar los efectos de factores solubles sobre el crecimiento y la diferenciación de una CFC en particular.

Los ensayos de colonias se han desarrollado para células que producen colonias de macrófagos (CFC-M) (39,46,49), neutrófilos ("granulocitos") (CFC-G) (40,49,50), megacariocitos (CFC-Meg) (51,52), eosinófilos (CFC-Eo) (53,54), células cebadas (CFC-MC) (55,56), y células eritroides (CFC-E). Las colonias que contienen más de un tipo celular también se han identificado, indicando que la CFC en esos casos no estaba restringida a un solo linaje. La primera CFC bipotencial que fue identificada que daba colonias de macrófagos y neutrófilos (granulocitos) fue llamada CFC-GM (44). Recientemente hay otros reportes sobre la aparente existencia de otros progenitores bipotenciales. Las colonias multicéntricas de células eritroides en algunos casos se ha demostrado que contienen megacariocitos derivados del mismo progenitor celular (57). Hay otros reportes que prueban que una CFC puede producir colonias que contienen células eritroides mas eosinófilos (58), o células eritroides mas granulocitos (59).

Ha sido corroborado que hay células capaces de producir linajes múltiples en colonias, por ejemplo células pluripotenciales. Los linajes que se pueden encontrar en tales

colonias incluyen células eritroides, megacariocitos, neutrofilos, macrófagos, eosinófilos y linfocitos (60,61). Cierta grado significativo de autorenovación de los progenitores o de las células madre puede presentarse en las colonias *in vitro*, como es indicado por el hecho de que algunas colonias mixtas contienen células capaces de producir más colonias mixtas (61,62). Al menos algunas de estas colonias mixtas contienen UFCb, células capaces de producir colonias macroscópicas o células eritroides y mieloides en los bazo de ratones irradiados (61,63), y que las UFCb han sido obtenidas de poblaciones de células en expansión tomadas a partir de colonias individuales *in vitro* a las 5 semanas después de iniciado la formación de la colonia (9).

Más recientemente un segundo tipo de colonia producida a partir de UFCb ha sido descrita (64). Esta colonia contenía solo pequeñas cantidades de células que crecían lentamente; se ha postulado que la UFC en este caso correspondía a las células madre pluripotenciales en ciclo más lentas que tienen la capacidad de autorenovación más grande (23,24). Debido a que las UFCb son heterogéneas (19,22), la presencia *in vitro* de colonias derivadas de estas, no necesariamente implica la presencia de una célula madre pluripotencial capaz de un autorenuevo extenso o de generar células de todos los linajes hematopoyéticos y linfoides. Obviamente será de gran interés para los inmunólogos si se demuestra formalmente que la clase de células madre pluripotenciales capaz de producir linfocitos puede crecer en un ensayo *in vitro*.

A.3 Consideraciones acerca de la interpretación del aparente potencial diferenciador de las UFC.

Es necesario reiterar que el potencial completo de una célula hematopoyética puede no ser expresado bajo ciertas condiciones. Por ejemplo, la no detección de linfocitos B en colonias mixtas (61), no necesariamente significa que la UFC en cuestión carezca del potencial de producir estas células, sino que las condiciones fueron inapropiadas para la diferenciación de linfocitos B detectables.

Merece hacerse notar también que un tipo celular que es difícil de identificar (o más obviamente aquel que no se ha buscado) tiende a ser ignorado. Así, no hay datos de la ocurrencia de colonias *in vitro*, solas o con otros tipos de células, de protimocitos (células restringidas a repoblar el timo), células pre-B o inclusive células accesorias como las células dendríticas o células de Langerhans. Es posible que algunas de estas células o sus precursores pudieran estar incluidos dentro de los blastos presentes en las colonias, usualmente clasificadas por su contenido de células maduras reconocibles como por ejemplo colonias de "macrófagos-granulocitos".

A.4 Ambigüedades en la identificación de colonias celulares.

Incluso las células mieloides pueden ser difíciles de identificar correctamente cuando se presentan en situaciones anormales o en estadios de maduración. El primer reporte de crecimiento de colonias de células hematopoyéticas en agar, incorrectamente identificó las células como mastocitos (39). Las células en cuestión fueron macrófagos, y la confusión fue causada por el hecho de que ellas fagocitaron agar, el cual se tenía de una manera metacromática similar al polisacárido de los granulos de los mastocitos.

Se han reportado dos tipos diferentes de colonias de eosinófilos de ratón (54,62). Los eosinófilos fueron inicialmente identificados por la tinción con Giemsa de colonias que tenían una distribución característica de células dispersas. La microscopía electrónica de estas células sin embargo no reveló los granulos típicos de los eosinófilos. Más recientemente usando azul rápido de Luxol como una tinción específica para eosinófilos (54), el mismo grupo encontró que estas colonias dispersas no se tenían. Sin embargo las células positivas al azul rápido de Luxol estaban presentes en una colonia diferente mucho más compacta (54).

En muchos casos los neutrófilos (granulocitos) han sido identificados en colonias únicamente por su núcleo en forma de anillo que es característico de los neutrófilos inmaduros. Sin embargo esto parece no muy satisfactorio puesto que un subgrupo de macrófagos se ha reportado que tienen un núcleo en forma de anillo (67,68). Se han observado otras células que pudieran ser confundidas con neutrófilos; estas son probablemente megacariocitos inmaduros con núcleos profundamente indentados o lobulados que pueden parecerse mucho a los núcleos de neutrófilos (69). Se requiere un grupo de marcadores obviamente para la firme identificación de las células, particularmente en situaciones no fisiológicas. En la Tabla 1 se enumeran algunos de los antígenos de superficie de las células hematopoyéticas de ratón conocidos a la fecha, que ayudan en parte al reconocimiento del tipo celular (70)*

TABLA 1

ANTIGENOS DE SUPERFICIE CELULAR EN CELULAS HEMATOPOYETICAS DE RATON.

Ag	Otros nombres	CD	Distribucion/Funcion	Mr Cromosoma (KDa)	
Ly-1	Lyt-1	CD5	Cel. T, subgrupo de Cel B	70	19
Ly-2	Lyt-2	CD8a	Linfocitos T cit. Adhesion de CTL.	30	6
Ly-3	Lyt-3	CD8b	Linfocitos T cit. Adhesion de CTL.	35	6
Ly-4	L3T4	CD4	Linfocitos T inductor/ auxiliar, Union de Cel. T MHC clase II restringida.	52	6
Ly-5	T200,CLA	CD45	Pan-leucocito, Eritroblasto, Cel. Madre, Cel. Dendriticas foliculares, Timocitos, Maduracion Cel. B	220 210 200 190	1
Ly-5 (B220)	B220	CD45R	Cel. pre-B y B, subgrupo de Linfocitos T cit.	220	1
Ly-6A, -6B -6C -6D -6E	Tap, Ala-1 Ly-27,28 MALA-1,DAG		Linfocitos T y B, Granulo- citos. Activacion de Cel.T.	12-18	15
Ly-7			Linfocitos T y B, subgrupo de Timocitos, 15% de la medula osea.		12
Ly-8	Ly-11		Timocitos.	18-22	
Ly-9	Lgp-100 T100		Linfocitos T y B, Timocitos BFU-E, algunos CFU-E y CFU-GM, -M.	100	1
Ly-10			Linfocitos T y B, Timocitos.		19
Ly-11			Subgrupo de Linfocitos T, Cel. Naturales Asesinas (NK).		2
Ly-12			Linfocitos T y B.	67	19
Ly-13			Linfocitos T y B, RBC.		
Ly-14			Linfocitos T y B.	73	7
Ly-15	LFA-1	CD11a	Linfocitos T y B, Cel. Mieloides, Cel. NK, Eritrocitos y Cel. Madre Mieloides. Adhesion de CTL.	177	7
Ly-16	Ly-18		Linfocitos T cit.		12
Ly-17	Lym-20	CD32	Linfocitos B, Cel. Mieloides, Cel. Langerhans, Tlinfocitos T Cel. Madre, Receptor Fc IgG2b/1	55-60	1
Ly-18	Lym-18		Subgrupo de Linfocitos B y T, Timocitos, subgrupo de medula osea.		12
Ly-19	Lym-19		Linfocitos T y B, subgrupo de medula osea.		4

Ly-20	Ly-22		Subgrupo de Linfocitos T.		4
Ly-21			Linfocitos T y B.		7
Ly-22	Lym-22		Linfocitos T supresores.		1
Ly-23			Linfocitos T y B.		2
Ly-24	Fgp-1		Todos los leucocitos no-T, 100% de medula osea, Cel. T de memoria, Protimocitos. ?Adhesion	95	2
Ly-25			Linfocitos B, Timocitos, subgrupo de Linfocitos T, 90% de medula osea		2
Ly-26			Linfocitos B, 60% medula osea.		2
Ly-27			Subgrupo de Linfocitos T y B, subgrupo de Timocitos.		2
Ly-28			Linfocitos T, Timocitos, subgrupo de Linfocitos B.		2
Ly-29			Linfocitos B, subgrupo de Linfocitos T, subgrupo de Timocitos, 40% medula osea.		4
Ly-30			Linfocitos B, subgrupo de Linfocitos T, 70% medula osea.		4
Ly-31			Subgrupo de Linfocitos T, B y Timocitos, 20% medula osea.		4
Ly-32			Linfocitos B, subgrupo de Linfocitos T, 30% medula osea.		4
Ly-33			Linfocitos T y B, Timocitos, 30% medula osea.		1
Ly-34			Timocitos, Linfocitos T, 20% medula osea.		
Ly-35			Timocitos, subgrupo de Linfocitos T.		6
Ly-36			Timocitos, Linfocitos T y B.		6
Ly-37		CR2	Linfocitos T y B, Timocitos. Activacion de la Cel. T Receptor de rosetas E.	55-60	3
Ly-38		CD1			3
Ly-39					17
Ly-40	Mac-1	CD11b	Linfocitos B activados Macrofagos, Granulocitos, cel. B Ly-1. Receptor CBi	165	
Ly-41	PC-1		Linfocitos T y B.	115-dimero	
Ly-42		CD23	Linfocitos B, Receptor Fc Ige.	49	1
Ly-43		CD25	Linfocitos T y B. Receptor para IL-2.	47-53	
Ly-44		CD20	Linfocitos B.		
Lyb-2			Linfocitos B. Activacion de Cel. B, respuesta parecida a IL-4.	45	4
Lyb-3			Linfocitos B.		4
Lyb-4			Linfocitos B.		4
Lyb-5			Subgrupo de Linfocitos B.		
Lyb-6			Linfocitos B.	45	4
Lyb-7			Linfocitos B.		12
Lyb-8			Linfocitos B.	95-105	7
Thy-1			Linfocitos T, Cel. Epitelia-	25-30	9

	les, Fibroblastos, Neuronas, Cel. Madre. Activacion de Cel. T.		
Thy-2	Timocitos	150	17
F4/80	Monocitos, Macrofagos.	160	
ThE	Linfocitos B, Timocitos	16	15
HSA	Linfocitos B, Cel. Maduras, Mieloides, Cel. Madre Eritroi- des, subgrupo de Timocitos, 95% medula ossea.	52(Tim,PMN)	
BP-1,6C3	Cel. pre-B, Linfocitos B tempranos.	140-160	
Mac-2	Macrofagos peritoneales elicitados con tioglicolato.	32	
Mac-3	Macrofagos peritoneales.	110	

A.5 Analisis de la clonalidad de una sola celula.

El uso de CFC purificadas.

Los sistemas de cultivo *in vitro* a base de geles, ofrecen muchas ventajas para el estudio de la progenie de una sola celula. Por ejemplo, las celulas formadoras de colonias pueden ser transferidas a posiciones determinadas sobre la superficie del agar, donde en presencia de factores solubles apropiados formaran colonias.

Si se obtiene una poblacion relativamente pura de celulas CFC en particular, por ejemplo usando tecnicas basadas en el tamano (44) o combinaciones en el tamano y la capacidad de unir lectinas fluorosceinadas (71), es factible transferir celulas facilmente al agar desde una suspension diluida usando una pipeta fina. Este procedimiento se uso inicialmente para establecer inequívocamente que una sola celula puede producir una colonia que contenga tanto macrofagos como neutrofilos (44).

Identificacion preliminar de las CFC responsivas.

Alternativamente, cuando las poblaciones enriquecidas en CFC no estan disponibles, las CFC pueden ser identificadas como dobles cuando se dividen despues de un corto tiempo en presencia de un factor de crecimiento apropiado (72). Asi, una suspension de celulas aisladas puede ser sembrada en agar y despues de 16 hr los dobles pueden ser tomados usando una pipeta y transferidos a posiciones marcadas en otros platos. La influencia secuencial de diferentes factores puede ser estudiada usando esos sistemas. Las celulas pueden ser expuestas a determinadas condiciones para luego ser retiradas y lavadas para que de esta manera cualquier factor residual proveniente de la incubacion inicial estara muy diluido en la segundo cultivo.

La tecnica descrita fue usada para demostrar que celulas

individuales forman colonias 'mixtas' *in vitro* que contienen tanto células mieloides como eritroides (60). En otra serie de experimentos (72), se demostró que una preparación altamente purificada de un factor que produce colonias de macrófagos y granulocitos (FEC-MG) derivado a partir del medio condicionado de pulmón, tenía a su vez el efecto directo sobre un CFC que tenía el potencial de generar colonias eritroides o mixtas. Para ello una población rica en células capaces de formar colonias eritroides y colonias mixtas eritroides/mieloides, fueron puestas a una densidad de 500 células por ml de agar. Inmediatamente las células fueron transferidas a recipientes individuales de cultivo que contenían FEC-MG purificado, así cualquier efecto de este material fue medido directamente sobre cada célula aislada. Se establecieron un total de 534 cultivos para este experimento. Después de 48 hr se observó que 39 células habían respondido al FEC-MG y se procedió a suplementarlos con medio condicionado que contenía factores que se requieren para el desarrollo de colonias eritroides y mixtas.

Uno de estos clones formó una colonia mixta y otro una colonia eritroide estableciendo el descubrimiento inesperado de que el FEC-MG, durante el período inicial de 48 hr, tiene influencia directa en la división no solamente de las CFC-MG sino también de las CFC eritroides o mixtas. Sin este experimento cuidadoso del FEC-MG actuando sobre CFC aisladas, se podría haber argumentado que este factor actuaba indirectamente por medio de otras células. Se consideró describir este último experimento en detalle pues en el radica el argumento final de que los factores de crecimiento no actúan únicamente en un solo tipo de célula, sino que puede ser compartido para la diferenciación de diferentes estirpes celulares.

Estudio del compromiso celular.

El proceso de la restricción del potencial diferenciador (incremento del compromiso celular) puede ser estudiado entre la progenie de una sola CFC. Así, los miembros de un doblete o cuadruplete de células provenientes de una sola CFC pueden ser individualmente probados para la restricción de su potencial hacia varios tipos de células maduras. Se han estudiado por esta técnica las progenies de CFC-MG bipotencial para macrófagos y granulocitos (73) y las CFC mixtas multipotenciales que producen colonias de eritrocitos, megacariocitos, neutrófilos y macrófagos (74).

Los datos *in vitro* apoyan el tipo de modelo de la Fig. 1. Células individuales (CFC-mixtas o unidades mieloides/eritroides en expansión, UFE-M/E) se ha demostrado que producen múltiples linajes *in vitro* (60,61). Experimentos en los que tales colonias mixtas se han dispersado y sembrado como suspensiones de células aisladas en el ensayo de colonias, han demostrado la presencia de al menos algunas de esas colonias (61,63,64). Estos resultados son paralelos al autorenewal de las UFCb que

están presentes entre las colonias esplenicas *in vivo* (16). Las colonias mixtas también contienen CFC y parecen ser restringidas en su potencial diferenciador y generar colonias que contienen solamente macrófagos y neutrófilos (61,62).

Las relaciones entre los varios linajes, por ejemplo en los puntos de ramificación del modelo de la Fig. 1, son controvertidas. El análisis *in vitro* sistemático del potencial diferenciador de la progenie de CFC pluripotencial debe eventualmente resolver esta cuestión. Los sistemas *in vitro* ofrecen la oportunidad de investigar que factores externos influyen, que progenitores entran a las propiedades de autorenewo de CFC individuales y su progenie. Algunos estudios *in vitro* sugieren una pérdida de programación del potencial diferenciador, mientras que otros sugieren un proceso aleatorio. Por ejemplo, se observó (74) que las células eritroides eran un componente invariable de las colonias que contenían linajes mixtos, además los autores concluyeron que la generación de progenitores restringidos a la diferenciación eritroide era un paso obligatorio en la diferenciación de las células madre pluripotenciales.

Otros investigadores sostienen que el orden por el cual las células madre pluripotenciales generan los diferentes progenitores comprometidos es aleatorio (58,75). La evidencia de este punto de vista es la existencia de colonias mixtas que contienen megacariocitos, granulocitos y macrófagos careciendo de células eritroides (58,75) y además colonias que contienen pares de otros linajes putativamente aleatorios por ejemplo eritrocito-megacariocito (57), eritrocito-eosinófilo (59) y granulocito-macrófono (44). No debe pasarse por alto la evaluación de este argumento, ya que es posible que factores desconocidos puedan prevenir el desarrollo de células de un linaje en particular en una colonia que pudo haber generado un progenitor celular apropiado. Experimentos en los cuales una proporción de colonias que contienen solo granulocitos, macrófagos y megacariocitos cuando son resembrados producen colonias de eritrocitos (75), demuestran que tal situación puede ocurrir.

Se ha examinado usando el ensayo *in vitro* para células pluripotenciales formadoras de colonias el proceso que determina si una célula lleva a cabo autorenewo o produce progenitores más diferenciados sin autorenewo. Se sugiere que el proceso que determina si el autorenewo tiene lugar o no, es estocástico (29). Se ha reportado (76) que las colonias mixtas *in vitro* varían mucho en su contenido de CFC-mixtas y UFCb, reflejando marcadas diferencias en el autorenewo de las UFCb mixtas iniciales pluripotenciales similarmente a las contenidas en las colonias del bazo generadas a partir de CFU-s *in vivo* (16). Ellos postularon que un evento aleatorio a nivel de las células pluripotenciales individuales determina si el autorenewo ocurre. Por otra parte, otros autores (77) usando otra vez colonias *in vitro*, encontraron la evidencia de que la heterogeneidad en el autorenewo de las células madre pluripotenciales no era

solamente debida a un evento aleatorio, sino que tambien era influido por factores externos como el tejido a partir del cual la CFC fue obtenida o la presencia *in vitro* del medio condicionado por celulas de medula osea.

Se ha dicho tambien que los factores externos, como el microambiente, determinan el linaje en el que una celula pluripotencial se diferencia (76). Algunos experimentos *in vitro* sugieren que la presencia de eritropoyetina favorece el compromiso de los progenitores de las celulas madre al linaje eritroide, produciendo una deficiencia de aquellos progenitores comprometidos con el linaje mielocido (79). Otros han fallado en confirmar un efecto de la eritropoyetina sobre las celulas madre pluripotenciales (80). La disponibilidad de preparaciones homogeneas de moleculas reguladoras relevantes usando tecnicas de ADN recombinante, combinada con estudios de celulas aisladas debera esclarecer esto en un futuro cercano.

B. Cultivos a largo plazo de medula osea.

B.1 Principios de la tecnica.

El sistema de cultivos de medula osea a largo plazo esta basado en el establecimiento *in vitro* de una capa adherente consistente de una mezcla de celulas estromales de medula osea. La seleccion cuidadosa de suero de caballo y la adiccion de suero

fetal de ternera e hidrocortisona (81,82) son factores importantes en el establecimiento de monocapas efectivas. En el procedimiento original (82,83), despues del establecimiento de la monocapa se adicionaba una segunda inoculacion de celulas de medula osea. La temperatura optima para la produccion de celulas madres fue cercana a 33 °C; los cultivos eran depletados de la mitad de las celulas no adherentes y de medio de cultivo cada semana. Tales cultivos mantenian la proliferacion a largo plazo de las celulas hematopoyeticas pluripotenciales incluyendo a las UFCb junto con las celulas mieloides diferenciadas (83a) y a las celulas capaces de generar linfocitos en hospederos irradiados (84,85).

B.2 Estructura de la monocapa adherente.

Las UFCb y los progenitores celulares son generados dentro de la monocapa adherente (82) habiendo una interaccion muy cercana entre ellas (83b). Estan presentes celulas endoteliales derivadas del endotelio de los senos venosos junto con adipocitos maduros con caracteristicas ultraestructurales de los adipocitos de la medula osea. Estos adipocitos parecen derivarse de las celulas adventicias reticulares de la medula osea, pues se han visto formas transicionales de estas en los cultivos a largo plazo. Tambien se encuentran fibroblastos en cantidades importantes.

Hay muchas similitudes entre la organizacion de la capa adherente en este sistema *in vitro* y la organizacion del tejido

hematopoyetico alrededor de los senos venosos *in vivo* (84). Asi, las celulas endoteliales *in vitro* forman una monocapa que se sobrepone a la superficie de la capa subyacente, y como ocurre *in vivo*, los granulocitos mas maduros se encuentran cerca o sobre las celulas endoteliales mientras que las celulas granulociticas menos maduras estan lejos de las celulas endoteliales pero profundas en la monocapa. Los adipocitos que se encuentran, son criticos en la granulopoyesis y la proliferacion de las celulas madre (34); ademas el efecto benefico de la adiccion de corticosteroides en los cultivos a largo plazo con algunas fuentes de suero, puede influir sobre el incremento en la diferenciacion de los adipocitos (81). Es importante hacer notar que el sistema de cultivo a largo plazo ha sido adoptado para el uso de varias especies incluyendo con algun exito al hombre (74,75).

B.3 Tipos celulares producidos en los cultivos a largo plazo.

Los sistemas originales de cultivo a largo plazo mantienen el crecimiento de celulas madre pluripotenciales (83a) incluyendo celulas capaces de generar linfocitos (84,85), pero las unicas celulas producidas en cantidad fueron los granulocitos y los macrofagos (83b), aunque los megacariocitos (78) y los mastocitos (7) pueden estar presentes. Sin embargo se ha demostrado (87,88) que modificaciones a las condiciones de cultivo pueden provocar la produccion de eritrocitos maduros. Tanto la agitacion mecanica (87) como la adiccion de suero de raton en los cuales la anemia ha sido inducida (88) produce eritropoyesis acompanada por una regresion de la poblacion de adipocitos y de la granulopoyesis. En estos cultivos los progenitores eritroides estaban en grupos alrededor de los macrofagos (84) como lo hacen *in vivo* (33,35,69). Mas recientemente, se ha reportado que con los sistemas de cultivo a largo plazo modificados se pueden producir linfocitos B (90).

B.4 El uso de cultivos a largo plazo en el analisis del papel del microambiente.

A diferencia de los cultivos en liquido o en agar, los cultivos a largo plazo dependen de complejas interrelaciones anatomicas reminiscentes que se encuentran *in vivo*, de esta manera este sistema de cultivo ofrece la posibilidad de estudiar los procesos fisiologicos importantes que no operan en los otros sistemas. Un modelo animal interesante en la evaluacion del papel del estroma medular ha sido el raton mutante S1/S1(d). Este raton es geneticamente anemico y no puede ser curado por la inyeccion de medula osea normal, sugiriendo un defecto en el ambiente debido a que las celulas madre funcionan bien en recipientes normales (2,91). Las copes de celulas adherentes producidas a partir de medula osea de ratones S1/S1(d) no pueden mantener la proliferacion a largo tiempo de UFCb normales (92), indicando que el defecto genetico en estos ratones esta reproducido en el ambiente estromal *in vitro*.

Otro raton geneticamente anemico, el W/W(v), tiene en

esencia un defecto reciproco, las CFU-s no pueden demostrarse en la medula osea aunque las celulas madre de ratones normales forman CFU-s en ratones W/W(v) y curan la anemia (93). En este caso, la medula osea del raton W/W(v) puede formar monocapas funcionales de celulas adherentes las cuales mantienen el crecimiento a largo plazo de UFCs, incluso de ratones S1/S1(d) (92). La reproduccion *in vitro* de estos defectos geneticos, da fuerza a la validez fisiologica de la interaccion celula madre-celula estromal que ocurre en estos cultivos.

B.5 Papel de los factores hematopoyeticos en los cultivos de medula osea a largo plazo.

Actualmente se cuestiona si los cultivos a largo plazo de medula osea han contribuido al esclarecimiento del papel de los factores de crecimiento en la hematopoyesis normal o factores formadores de colonias en agar (FECs). Los estudios iniciales sugirieron que los FECs no eran detectables en el medio tomado de los cultivos a largo plazo activamente produciendo macrofagos y neutrofilos (83). Mas aun la adicion de anticuerpos antiFEC-M para macrofagos fallo en afectar la produccion de estas celulas (94). Aunque este experimento fue inconcluso debido a que los anticuerpos dirigidos contra este FEC particular no reaccionaban en forma cruzada con otros FECs que estimulan la produccion de macrofagos y granulocitos, por ejemplo el FEC-GM de pulmon de raton (95) o el del hibridoma T 19.1 de celula T (96). En otro estudio la adicion de FEC-MG preparado a partir de medio condicionado de pulmon de raton no afecto la granulopoyesis en los cultivos a largo plazo (97). La demostracion de una inhibicion de las celulas estromales adherentes sobre el efecto *in vitro* del FEC-MG de pulmon de raton es otra evidencia contra un papel de estos (98) en los cultivos a largo plazo. El efecto inhibitor en la respuesta al FEC-MG no fue bloqueada por inhibidores del metabolismo de las prostaglandinas, pero puede ser bloqueada por la adicion de monosacaridos (98). De hecho en presencia de monosacaridos las celulas estromales producen niveles detectables de un factor que estimula la formacion de colonias (98). En el momento parece que no puede excluirse que la granulopoyesis en los cultivos a largo plazo involucra a una molecula parecida al llamado factor estimulador de colonias FEC aunque los dos FECs que han sido estudiados en gran detalle, el FEC-1 y el FEC-MG derivado de pulmon de raton, no afectan este sistema quizas debido a que ya esta estimulada al maximo o quizas debido a la influencia inhibitoria de las celulas estromales.

En otro estudio se hizo notar que celulas parecidas a los mastocitos o celulas F ocurren en los cultivos a largo plazo, aunque el factor estimulante de celula F (celulas persistentes) (FEP), el factor requerido para el crecimiento *in vitro* de poblaciones puras de celulas con esta apariencia, fue indetectable (9). Las celulas adherentes removidas de estos cultivos no obstante contenian celulas que respondian al FEP produciendo poblaciones homogeneas celulares dependientes de

este factor.

C. Líneas de progenitores hematopoyéticos celulares factor dependientes.

Una importante contribución a la metodología del estudio **in vitro** de la diferenciación de las células de médula ósea ha sido el descubrimiento de que los progenitores celulares hematopoyéticos pueden crecer en cultivo como poblaciones clonales, siempre y cuando un factor específico de crecimiento se encuentre presente. Estas líneas pueden ser enmarcadas dentro de dos grupos. Dentro del primer grupo se encuentran las líneas mejor caracterizadas y consistentes de poblaciones homogéneas de células relativamente bien diferenciadas que comparten muchas características con los mastocitos (9,99-105). Sin embargo durante el período en el cual su relación precisa con los mastocitos ha estado bajo investigación ciertos autores han preferido usar el nombre operacional de células persistentes (células P), por su propiedad distintiva de persistir creciendo **in vitro**. El segundo grupo está compuesto de líneas de poblaciones heterogéneas de células las cuales muestran una variedad de características y de potenciales diferenciadores. Por ejemplo, una de tales líneas clonadas se diferencia tanto en mastocitos como en megacariocitos (69). El crecimiento y la capacidad de autorrenuevo de estos dos grupos de líneas difiere, pero ambos comparten el requerimiento común del factor específico FEP.

Las líneas dependientes de factores se obtuvieron a partir de dos tipos de caminos de investigación diferentes. Las células P y las líneas heterogéneas factor dependientes fueron generadas en forma casi directa a partir de varios tejidos linfoides (9,99,101), la mucosa del intestino (106) o la médula ósea (9,99), cultivando suspensiones de células en presencia de medio condicionado de células esplénicas estimuladas con Con A o del tumor mielomonocítico WEHI-3B. Siguiendo otra línea de investigación otros grupos han generado líneas hematopoyéticas factor dependientes a partir de poblaciones de células no adherentes tomadas inicialmente de cultivos de médula ósea infectada con virus (107,108) y subsecuentemente de cultivos a largo plazo no infectados (109).

III. DETECCIÓN Y CUANTIFICACION DE FACTORES QUE REGULAN LA PROLIFERACION Y DIFERENCIACION DE LAS CELULAS HEMATOPOYETICAS.

A. Los factores de crecimiento hematopoyéticos.

Un hombre produce un promedio de 150 millones de células rojas y cerca de 120 millones de granulocitos en cada minuto de su vida. Para lograr este reemplazo las células maduras hematopoyéticas deben derivarse a partir de varios tipos de progenitores, cada uno comprometido a desarrollarse en solamente un linaje celular. Además sabemos que la teoría hematopoyética actual presupone que todos estos progenitores celulares tienen su

origen en una sola célula madre. El control de este proceso de proliferación y diferenciación, se piensa reside en un grupo de factores de crecimiento hematopoyéticos conocidos como factores estimulantes de colonias (FECs, mejor conocidos como CSFs; del Inglés Colony Stimulating-Factors) (28). Estas moléculas se encuentran presentes en el suero sanguíneo y pueden ser obtenidas en los "medios condicionados" por células en proliferación activa *in vitro*. Estos inductores pueden ser proteínas o glicoproteínas dependiendo de las células en las cuales son producidas, pero la presencia de carbohidratos no parece ser necesaria para su actividad biológica (110). Sus pesos moleculares oscilan alrededor de 23 000 daltones o múltiplos de este número según sus fuentes (28):"

Orina humana	45 000	
Pulmon de raton	23 000	
Fibroblastos de raton (Células-L)	70 000	
Rinon de raton	80 000	
Medula osea de raton	73 000	
Suero de raton estimu- lado con endotoxina	12 000, 28 000	
Placenta humana	23 000	
Macrofagos peritoneales	41 000	
Leucocitos de raton estimulados con mito- genos	23 000	
Musculo de raton	23 000	
Hueso "	23 000	
Glandula salival "	23 000	
Cerebro "	23 000	
Timo "	23 000	
Bazo "	23 000	
Corazon "	23 000	

En muchos casos los factores que mantienen la proliferación y diferenciación hematopoyética han sido obtenidos de tejidos complejos donde el origen celular no se ha determinado con precisión. De hecho al menos para el caso de los FECs que estimulan colonias de macrofagos y granulocitos (FEC-MG) la mayoría de los tejidos sirven como fuentes secretoras, obteniéndose FEC-MG con propiedades moleculares similares a partir de la mayoría de los medios condicionados. Evidentemente cuando se extrae el FEC de órganos completos no es posible determinar que tipo de célula es la secretora.

Aparte de la eritropoyetina que es la encargada de la formación de las células rojas en el organismo, la Tabla 2 sirve como punto de referencias en la diversidad de nombres y actividades de los factores de crecimiento mielóide reconocidos a la fecha (25):"

TABLA 2

		1	2	3	4	5	6	7
					G	H		
IL-3	A	--	--	?	0	-?	ND	ND
	B	--	--	--	--	--	--	--
	C	ND	--	--	--	--	--	--
GM-CSF	A	ND	--	--	--	--	--	ND
	B	ND	--	--	--	--	--	-?
	C	ND	--	--	--	--	--	--
G-CSF	A	ND	--	--	--	--	--	ND
	B	ND	-?	-?	--	-?	-?	ND
	C	ND	--	--	--	-?	--	ND
M-CSF	A	--	--	--	--	--	--	--
	B	--	--	--	-?	--	--	--
	C	--	--	--	-?	--	--	--

-Significado de cada puntuacion de la Tabla 2.

Los signos -- indican una respuesta positiva, - una respuesta negativa, ? un resultado equivoco o controversial y ND no determinado.

-Naturaleza de la respuesta (Tabla 2)*

- A.- Autorenewo
- B.- Proliferacion
- C.- Desarrollo

-Celulas blanco (Tabla 2)*

- 1.- UFCb (Unidad formadora de colonias del bazo).
mejor conocida como CFU-s
- 2.- CFCMez (Celula formadora de colonias mezcladas).
mejor conocida como CFC-Mix
- 3.- UFEE (Unidad formadora expansiva-eritroide).
mejor conocida como BFU-E
- 4.- CFC-MG (Celula formadora de colonias de M, G o ambas).
mejor conocida como GM-CSF
- 5.- CFC-Eos (Celula formadora de colonias de Eosinofilos).
mejor conocida como Eos-CFC
- 6.- CFC-Meg (Celula formadora de colonias de Megacariocitos).
mejor conocida como Meg-CFC
- 7.- Mastocitos.

-Los nombres completos de las abreviaturas son como siguen (Tabla 2)'

IL-3, Interleucina-3; nombres alternativos'

APE, actividad promotora expansiva;
mejor conocida como **BPA.**

FCCH, Factor de crecimiento de la célula hematopoyética;
mejor conocido como **MCGF.**

FEC, Factor estimulante de colonias;
mejor conocido como **CSF.**

FCCH, Factor de crecimiento de la célula mast;
mejor conocido como **MCGF.**

FECF, Factor estimulante de la célula F;
mejor conocido como **PCSF.**

FEC-NG, Factor estimulante de colonias de macrófagos y de granulocitos;
mejor conocido como **GM-CSF; nombres alternativos"**

ING-GM, Inductor de macrófagos/granulocitos-granulocito macrófago;
mejor conocido como **MGI-1GM.**

FEC-G, Factor estimulante de colonias granulocíticas;
mejor conocido como **G-CSF; nombres alternativos"**

ING-2, Inductor de macrófagos y granulocitos-2;
mejor conocido como **MGI-2.**

FIDCL, Factor inductor a la diferenciación de la célula leucémica;
mejor conocido como **Factor-D.**

FIDMGCL, Factor inductor a la diferenciación de macrófagos/granulocitos y de la célula leucémica;
mejor conocido como **LGN-DF.**

FEC-M, Factor estimulante de colonias de macrófagos; mejor conocida como M-CSF; nombres alternativos"

ING-1M, Inductor de macrófago/granulocito específico para macrófago;
mejor conocido como **MGI-1M.**

AEC, Actividad estimulante de colonias;
mejor conocida como **CSA.**

FEC-1, Factor estimulante de colonias-1.
mejor conocido como **CSF-1.**

B. Fuentes comunes de los FECs.

-Pulmon de raton.

El medio condicionado de pulmones tomados de ratones inyectados 3 hr previamente con endotoxina ha sido usado como una fuente conveniente de FEC-MG, un FEC que operativamente genera colonias que contienen unicamente neutrofilos ("granulocitos") y macrofagos (111,110). Un FEC-MG ha sido purificado a una alta actividad especifica (actividad cercana a 10^{-11} M) a partir de esta fuente (110). El medio condicionado de pulmon tambien contiene una molecula diferente la cual promueve el crecimiento de colonias de granulocitos (FEC-G) y que copurifica con un factor que causa que ciertas sublineas de la leucemia mielomonocitica WEHI-3B se diferencien hacia neutrofilos (113).

-Celulas-L.

Las celulas L, una linea de fibroblastos de raton, ha sido ampliamente usada como fuente de un factor que estimula macrofagos (114,115). El FEC para macrofagos (FEC-M o FEC-1) que produce ha sido purificado a aparente homogeneidad (114,115). La contrapartida del FEC-1 de celulas L ha sido preparado a partir de orina humana, siendo seleccionados como una buena fuente a los pacientes geriatricos (116).

-Placenta humana.

La placenta humana ha sido usada como una fuente conveniente de factores estimulantes de colonias humanas (117) (un punto practico importante cuando los factores derivados del raton son en general inactivos sobre los progenitores celulares humanos aunque ocurren excepciones a esta generalizacion). El medio condicionado de placenta humana contiene al menos dos FECs (118), uno que estimula la formacion de neutrofilos, macrofagos y colonias de eosinofilos y otro que genera colonias de neutrofilos y macrofagos predominando los neutrofilos.

-Poblaciones linfoides.

El medio condicionado de poblaciones de celulas linfoides estimuladas con mitogenos policonales para celulas T (119a,120,65,66) (Con A, PWM o PHA) tanto en el hombre como en el raton contienen factores que estimulan un amplio rango de celulas. Estos celulas incluyen a los linfocitos T (119b), a las celulas eritroides (121,122), a los megacariocitos (51,52), a los neutrofilos y macrofagos (119a,120), a los eosinofilos (123), a linajes de mastocitos (9,99,100,101) y a celulas pluripotenciales (9,99,60,61,124,125).

-Reacciones inmunologicas y factores hematopoyeticos.

Se sabe que la estimulación del sistema reticuloendotelial resulta en la producción de FECs. Así, la inyección de endotoxina produce una rápida aparición en el suero de factores que promueven el crecimiento de colonias de macrófagos y granulocitos y cambios en la distribución y cantidad de células progenitoras hematopoyéticas (126,127). Investigaciones bioquímicas e inmunológicas indican la presencia de varios tipos de factores reguladores en el suero después de la inyección con endotoxinas. Estos incluyen un FEC (FEC-G) que produce colonias de neutrófilos e induce a la diferenciación de un tumor mielóide (128), y un FEC que produce colonias de macrófagos, FEC-M o FEC-1 (95). La estimulación de células de bazo *in vitro* con endotoxina también resulta en la producción de un FEC que estimula el crecimiento de neutrófilos y macrófagos (119a,129).

Es probable que la estimulación del sistema reticuloendotelial por otros medios también resulte en la producción de FEC. Por ejemplo, los cambios en las propiedades y distribución de linajes que siguen a la inyección de anticuerpos dirigidos contra plaquetas (130) pueden ser debidos a la estimulación del sistema reticuloendotelial por opsonización con plaquetas cubiertas con anticuerpos. Como primera regla, cualquier reacción inmunológica debe dar vista en asociación con la producción de factores que regulan la proliferación y diferenciación hematopoyética hasta que se pruebe lo contrario.

C. Fuentes celulares de factores de crecimiento.

-Macrófagos, Fibroblastos, Células Endoteliales y Tumores.

Investigaciones iniciales basadas en procedimientos de separación física sugirieron que los macrófagos eran la mejor fuente de factores estimuladores de colonias (131,132,133). Esto era apoyado por la evidencia de que líneas de clones de tumores con propiedades tipo macrófagico producen FEC (134,135). Como ya se mencionó la línea de fibroblastos L (114,115) es fuente de FEC-1 o FEC-M. Las Células Endoteliales también se ha reportado que producen FEC (138,139) y de igual manera por un sarcoma (136) y un carcinoma pancreático (137).

-Células T.

Es claro ya desde hace 7 años que las células T activadas son una fuente directa de factores que afectan las células linfoides y hemostopoyéticas. Al menos cuatro moléculas distintas están involucradas en el factor de crecimiento de célula T (IL-2), FEC-MG de célula T, FEP (IL-3, APE, FEC-MG, y FEC-Meg) y el INF gamma. Además con actividad de FEC para eosinófilos (IL-5) según los últimos hallazgos (112,140-145). Es más, se ha detectado una eosinofilia célula T dependiente asociada con ciertas infecciones parasitarias (146), la cual bien puede estar controlada por algún

otro factor proveniente de linfocitos T aun no identificado.

Como se ha mencionado anteriormente, en la actualidad se considera que la activacion de los linfocitos T resulta en la liberacion de multiples moléculas reguladoras de la hematopoyesis. Sin embargo resulta ser todavía tema de investigacion el determinar si los genes que codifican para estos diferentes factores se activan simultaneamente, o si existen clones de linfocitos cada uno capaz de sufrir un solo rearrreglo cromosomal que de lugar a la síntesis y secrecion de un factor de regulacion hematopoyetica especifico. Ciertamente uno de los prospectos mas exitantes que debiera seguir la investigacion en este area consistira en el aislamiento de los genes que codifican a estos linfocinas para el analisis y el estudio de la funcion reguladora en la hematopoyesis que conlleva la expresion de estos genes.

IV. PROLIFERACION Y DIFERENCIACION DE LAS CELULAS MIELOIDES.

A. El acoplamiento entre la proliferacion y la diferenciacion de células mieloides.

Como se ha mencionado anteriormente el programa de desarrollo normal del sistema mieloides tambien incluye un mecanismo de acoplamiento inducido por las diferentes proteínas de induccion a la multiplicacion en las células madre y de induccion a la diferenciacion, para mantener el balance normal entre células no diferenciadas y maduras. Por tanto el acoplamiento entre el crecimiento y la diferenciacion, creemos debe de ser logrado mediante un factor de crecimiento que a su vez active la produccion de un factor de diferenciacion (148).

En la actualidad para las células de la línea mieloides se han encontrado, como ya se menciono, cuatro moléculas diferentes inductoras de la proliferacion. Alternativamente a la nomenclatura de FECs se les conoce como inductores de macrófagos y granulocitos tipo 1 (IMG-1) (25,149-151). De los cuatro factores uno el FEC-M induce el desarrollo de clones de macrófagos, otro el FEC-G al de granulocitos, el tercero FEC-MG al de macrófagos y granulocitos simultaneamente, y el cuarto FEC-Multi (tambien llamado interleucina-3), a macrófagos, granulocitos, eosinófilos, células cebadas, células eritroides y megacariocitos. Por tanto puede considerarse que esta familia multigenica representa moléculas para diferentes estadios cada vez mas restringidos en el programa de desarrollo de las células de la sangre.

Los precursores mieloides normales requieren en consecuencia de uno de los cuatro factores para su visibilidad celular y su multiplicacion. Sin embargo hay células leucémicas mieloides que son viables y se multiplican sin la adicion de un factor de crecimiento, pero que pueden ser inducidas a la diferenciacion hacia macrófagos o granulocitos terminales no

malignos mediante proteínas que son diferentes de los factores de crecimiento (149,150). Estas proteínas de diferenciación, que también inducen la diferenciación de las células mieloides normales (149,150), han sido llamadas IMG-2 (mejor conocidas como MGI-2) (149,152) o factores de diferenciación (DF) (153,154). Se ha comprobado que la inyección de IMG-2 en ratones leucémicos inhibe el desarrollo de la leucemia mieloide (150,155).

Por último mencionaremos que los precursores mieloides normales cultivados con uno de los factores de crecimiento IMG-1, a su vez endogenamente producen el factor de diferenciación IMG-2 (149,150,156). Se cree por tanto que esta producción endógena sirve como un mecanismo eficiente para acoplar el crecimiento y la diferenciación. Se ha visto que diferencias en el rearrreglo genético para la expresión del factor de diferenciación y su receptor, pueden producir diferencias en la cantidad de divisiones antes de la diferenciación de algunas células, pues todas las células tienen el mismo genoma pero distinto fenotipo o expresión adaptativa al medio que les rodea. Puesto que hay más de un IMG-2 (152,157), diferentes factores de crecimiento pueden inducir diferentes factores de diferenciación y esto puede determinar el tipo celular diferenciado.

V. APORTACIONES, COMENTARIOS Y PERSPECTIVAS.

A. Diferentes teorías sobre el funcionamiento y el origen de los factores de crecimiento hematopoyéticos.

Existe una dicotomía entre dos escuelas de pensamiento en torno al problema del origen y función de los factores de crecimiento hematopoyéticos. El grupo de Metcalf (28) establece que existe una estructura monomérica de 23 000 D conocida como FEC-MG y que los distintos pesos moleculares obtenidos para las otras moléculas, son polímeros de esta unidad. Cada uno de los distintos FECs son productos de respuestas a diferentes estímulos externos, siendo las funciones de los factores en ocasiones traslapadas. El grupo de Sachs (149,152) propone que existen solo dos tipos de factores que regulan la producción de células hematopoyéticas, aquellos inductores de crecimiento que promueven la proliferación llamados IMG-1 (IMG-Multi, IMG-MG, IMG-B y IMG-M), y los que promueven la diferenciación conocidos como MGI-2. Estas últimas moléculas son consideradas como autocrinas pues uniéndose al ADN de la célula que lo secreta puede inducir un rearrreglo cromosómico para que comience el cambio hacia una célula madura.

Aunque consideramos que estas dos teorías son en parte correctas, creemos que existen varios fenómenos que no pueden aun ser explicados por ellas. En consecuencia hemos desarrollado una tercera forma de explicar estos fenómenos de regulación hematopoyética, los cuales describimos en las publicaciones que se anexan. Primero no creemos que sea evolutivamente ventajoso para un organismo el disponer de diferentes factores de regulación hematopoyética que tengan funciones idénticas.

Estamos de acuerdo en que sean los FECs polimeros o agregados de una unidad basica de 23 000 d puesto de que los mas conocidos factores de regulacion son aproximadamente multiples de este peso molecular, en nuestra publicacion describimos la existencia de una nueva molecula reguladora de 45 K que bien podria ser un dimero de la de 23 K. Sin embargo no estamos de acuerdo en que varias celulas de estirpe diferente puedan producir el mismo tipo de factor regulador. En nuestro trabajo por tanto demostramos que diferentes tipos de fibroblasto producen la misma molecula de 70 K, mientras que diferentes tipos de macrofagos la de 45 K y de celulas epiteliales de 33 K. Proponemos en nuestras publicaciones (articulos 1 y 2) en consecuencia, que cada IMG es celula especifica en el sentido de su origen y funcion.

Otra novedad de nuestro modelo consiste en que suponemos que una molecula reguladora no por necesidad tiene solamente un tipo de funcion, sino que puede desarrollar diferentes efectos reguladores. Por ejemplo los IMG-2 (45 K) producidos por macrofagos no solamente actuan sobre la celula que lo produjo para inducirle a la produccion de IL-1, sino que es posible que tambien actue sobre otra estirpe celular como lo seria el granulocito. Asi nuestro IMG-2 que es producido por el macrofago influye tanto sobre los granulocitos para aumentar la defensa no especifica del organismo contra cuerpos extranos, como tambien sobre linfocitos auxiliares mediante la produccion de IL-1 que evidentemente tiene una funcion reguladora en la respuesta inmune especifica. Por ultimo mencionaremos que la produccion y secrecion de estos factores de regulacion sola se efectuaba siempre que las celulas se encontraran en division celular activa. Esta ultima observacion tambien resulta ser innovadora pues hasta la fecha se consideraba que las celulas producian y secretaban los factores de regulacion hematopoyetica durante las fase de G₀ y no dentro del ciclo celular.

En trabajos futuros aparte de tratar de obtener el IMG de 45 K en forma pura para su estudio, trataremos de determinar los mecanismo de regulacion cruzada entre lineas hematopoyeticas con mayor detalle para contribuir a adecuar los conocimientos en esta area y poder incidir sobre el diseno de una teoria mas moderna sobre la hematopoyesis y su importancia en la regulacion del sistema inmune.

R. Critica

No podemos pretender que las hipotesis contenidas en nuestras publicaciones puedan cubrir todas las observaciones experimentales, ni que este carente de errores, sin embargo consideramos que puede ser un paso adelante dentro de este tan complejo campo de la regulacion hematopoyetica. Como punto aun no esclarecido e importante, mencionaremos que distintas moleculas son liberadas al medio de cultivo cuando se inducen las celulas de la medula osea a proliferar con un IMG-1. Entre ellas la IL-1 asi como FNT alfa (mejor conocida como TNF alfa, del ingles Tumor

Necrosis Factor alfa), los cuales son modificadores biológicos que tienen a su vez la característica de inducir a la liberación de FEC-MG y FEC-G en fibroblastos y células endoteliales (159) creando de esta forma un mecanismo de retroalimentación. Esto genera una problemática experimental nueva, al tener más de un inductor de IMG dentro de un mismo cultivo de médula ósea. Todas estas moléculas que se inducen unas a otras en una cascada de activación para la generación de más elementos sanguíneos ejercen su influencia a cantidades muy pequeñas. En nuestros ensayos obtuvimos la presencia de por lo menos tres picos de actividad de IMG aparte del FEC-1 adicionado como inductor a la proliferación, siendo un problema el determinar si estos factores eran IMG o inductores de estas moléculas. Esperamos que en un futuro con el diseño de mejores técnicas de aislamiento y purificación tanto de factores reguladores, como de subpoblaciones de células específicas se pueda contribuir en forma más clara a determinar la función de cada uno de los factores reguladores de la hematopoyesis y por tanto de la respuesta inmune.

C. Conclusiones.

Tomando en consideración lo expuesto a partir de los artículos publicados se pueden sacar las siguientes conclusiones:

-Se describe una molécula de 45 K producida por macrófagos que tiene la propiedad de ser un IMG (FEC).

-El IMG de 45 K es inducible tanto por IMG de Fibroblastos como por IMG de Células Epiteliales.

-Solamente los IMGs son producidos durante la proliferación activa de las células.

-Es almacenado en G₀.

-Es liberado en G₁.

-La producción de IMG es célula específica.

-El IMG de Fibroblastos se sabe que induce a la producción de IL-1 en macrófagos (Oppenheim, J. 1987) pero nosotros creemos que es el IMG de 45 K el real inductor de IL-1 a través de un mecanismo en cadena FEC-1-FEC 45 K-IL-1.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Metcalf, D., *Hemopoietic Colonies in vitro; Cloning of Normal and Leukemic Cells*. Springer-Verlag, Berlin, 1977.
- 2.- Metcalf, D., and Moore, B.A.S., *Haemopoietic Cells*, North-Holland, Amsterdam, 1971.
- 3.- Trentin, J., Wolf, N., Cheng, V., Fahlberg, D.E., Weiss, D., and Bourhay, B., Antibody production by mice repopulated with limited number of clones of lymphoid cell precursors, *J. Immunol.*, **98**, 1324, 1967.
- 4.- Abramson, S., Miller, R.G., and Phillips, R.A., The identification in adult bone marrow of pluripotential and restricted cells of the myeloid and lymphoid system, *J. Exp. Med.*, **145**, 1567, 1977.
- 5.- Steinman, R. M., Lustig, D.S., and Cohn, Z.A., Identification of a novel cell-type in peripheral lymphoid organs of mice. III Functional properties *in vitro*, *J. Exp. Med.*, **139**, 1431, 1974.
- 6.- Barclay, A.M., and Meyrhofer, G., Bone marrow origin of Ia positive cells in the medula of rat thymus, *J. Exp. Med.*, **153**, 1666, 1981.
- 7.- Katz, S.I., Tamahji, K., and Sachs, D.H., Epidermal Langerhan's cells are derived from cells originating in bone marrow, *Nature (London)*, **282**, 324, 1979.
- 8.- Frelinger, J.G., Hood, L., Hall, S., and Frelinger J.A., Mouse epidermal Ia molecules have a bone marrow origin, *Nature (London)*, **282**, 321, 1979.
- 9.- Schardor, J.W., Lewis, S.J., Clark-Lewis, I., and Culvenor, J.G., The persisting (P) cell: histamin content, regulation by a T cell derived factor, origin from a bone marrow precursor and relationship to mast cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 323, 1981.
- 10.- Kitamura, Y., Yokoyama, Y., Matsuda, H., and Ohno, T., Spleen colony-forming cell as a common precursor for tissue mast cells and granulocytes, *Nature (London)*, **291**, 159, 1981.
- 11.- Haller, O., Kiessling, R., Orr, A., and Wigzell, H., Generation of natural killer cells: an autonomous function of the bone marrow, *J. Exp. Med.*, **145**, 1411, 1977.
- 12.- Miller, S.C., Production and renewal of murine natural killer cells in the spleen and bone marrow, *J. Immunol.* **129**, 2282, 1982.
- 13.- Wu, A.M., Till, J.E., Simonovitch, L., and McCulloch, E.A., Cytological evidence for a relationship between normal hemopoietic-coloniforming cells and cells of the lymphoid system, *J. Exp. Med.*, **127**, 455, 1968.
- 14.- Till, J.E., and McCulloch, E.A., A direct measurement of the radiation sensitivity of normal bone marrow cells, *Radiat. Res.*, **14**, 213, 1961.
- 15.- Becker, A.J., McCulloch, E.A., and Till, J.E., Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells, *Nature (London)* **197**, 452, 1963.
- 16.- Simonovitch, L., McCulloch, E. A., and Till, J.E., The

- distribution of colony-forming cells among spleen colonies, *J. Cell. Physiol.*, **62**, 327, 1963.
- 17.- Siminovitch, L., Till, J. E., McCulloch, E.A., Decline in colony-forming ability of marrow cells subjected to serial transplantation into irradiated mice, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **64**, 23, 1964.
- 18.- Cudkovic, G., Upton, A.C., Shearer, S.M., and Hughes, N.L., Lymphocyte content and proliferative capacity of serially transplanted mouse bone marrow, *Nature (London)*, **201**, 165, 1964.
- 19.- Worton, R. G., McCulloch, E.A., and Till, J.E., Physical separation of hemopoietic stem cells differing in their capacity for self-renewal, *J. Exp. Med.*, **130**, 91, 1969.
- 20.- Harrison, G.E., Astle, C.M., and Delcambre, J.A., Loss of proliferative capacity in immunohemopoietic stem cells caused by serial transplantation rather than aging, *J. Exp. Med.*, **147**, 1526, 1978.
- 21.- Ross, E.A., Anderson, M., and Hicklem, H.S., Serial depletion and regeneration of the murine hemopoietic system. Implications for hemopoietic organization and the study of cellular aging, *J. Exp. Med.*, **155**, 432, 1982.
- 22.- Magli, M.C., Iscove, N.N., and Oditchenko, N., The transient of early haemopoietic spleen colonies, *Nature (London)*, **259**, 527, 1982.
- 23.- Rosendal, M., Hodgson, G. S., and Bradley, T.R., Hemopoietic stem cells are organized for use on the basis of the generation age, *Nature (London)*, **264**, 68, 1976.
- 24.- Schafeld, R., Lord, B. J., Kyffin, S., and Gilbert, C. W., Self maintenance capacity of CFU-s, *J. Cell. Physiol.*, **103**, 355, 1980.
- 25.- Dexter, T.M., The message in the medium, *Nature*, **312**, 744, 1984.
- 26.- Tokota, T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 1070, 1984.
- 27.- Gough, N.M., *Nature*, **309**, 763, 1984.
- 28.- Metcalf, D., In *Tissue Growth Factors* (ed. Baserga, R.), 343 (Springer, New York) 1981.
- 29.- Till, E., McCulloch, E.A., and Seminovitch, L., A stochastic model of stem cell proliferation based on the growth of spleen colony-forming cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **51**, 29, 1964.
- 30.- Becker, A. J., McCulloch, E.A., Seminovitch, L., and Till, J.E., The effect of different demands for blood cell production on DNA-synthesis by hemopoietic colony-forming cells of mice, *Blood*, **26**, 296, 1965.
- 31.- Iscove, N.N., Till, J. E., and McCulloch, E.A., The proliferative state of mouse granulopoietic progenitor cells, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **134**, 33, 1970.
- 32.- Dexter, T. M., Self-renewing haemopoietic progenitor cells and the factors controlling proliferation and differentiation, in *Microenvironments in Haemopoietic and Lymphoid Differentiation*, CIBA Found. Symp. No. 84, Porter, R. and Whelan, J., Eds., Pitman Medical, London, 1981, 22.
- 33.- Weiss, L., Haemopoiesis in mammalian bone marrow, in *Microenvironments in Haemopoietic and Lymphoid Differentiation*, CIBA Found. Symp. No. 84, Porter, R., and

- Whelan, J., Eds., Pitman Medical, London, 1981, 5.
- 34.- Allen, D.T., and Dexter, T.M., Cellular inter-relationships during *In Vitro* granulopoiesis, *Differentiation*, **6**, 91, 1976.
- 35.- Sakai, N., Johnstone, G., and Weiss, L., Bone marrow cells associated with heightened eosinophilopoiesis; an electron microscopic study of murine bone marrow stimulated by *Ascaris suum*, *Am. J. Anat.*, in press.
- 36.- Weston, H., and Bainton, D.F., Association of an alkaline phosphatase positive reticulum cell in bone marrow with granulocytic precursors, *J. Exp. Med.*, **150**, 919, 1979.
- 37.- Fransson, F., Testa, N.G., and Lord, B.E., The relative spatial distribution of erythroid progenitor cells (BFU-e and CFU-e) in the normal mouse femur, *Blood*, **46**, 65, 1975.
- 38.- Lord, B.E., Testa, N.G., and Hendry, J. H., The relative spatial distribution of CFU-s and CFU-c in the mouse femur, *Blood*, **46**, 65, 1975.
- 39.- Fluznik, D.H., and Sachs, L., The cloning of normal mast cells in tissue culture, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **66**, 319, 1965.
- 40.- Bradley, T.R., and Metcalf, D., The growth of mouse bone-marrow cells *in vitro*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci*, **44**, 297, 1966.
- 41.- Fluznik, D., and Sachs, L., The induction of clones of normal mast cells by a substance from conditioned medium, *Exp. Cell. Res.*, **43**, 553, 1966.
- 42.- Bradley, T.R., and Summer, M.A., Stimulation of mouse bone marrow colony growth *In Vitro* by conditioned medium. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci*, **46**, 607, 1966.
- 43.- Ben-Ishai, Z., and Yaffe, J.M., Ultrastructural studies of erythroblastic islands of rat bone-marrow. II. The resumption of erythropoiesis in erythropoietically depressed rebound marrow, *Lab. Invest*, **26**, 637, 1972.
- 44.- Moore, M.A.S., Williams, M., and Metcalf, D., Purification and characterization of the *in vitro* colony-forming cell in monkey hemopoietic tissue, *J. Cell. Physiol.*, **79**, 283, 1972.
- 45.- Axelrad, A.A., McLeod, B.L., Suzuki, S., and Shreeve, M.M., Regulation of the population size of erythropoietic progenitor cells, in *Differentiation of Normal and Neoplastic Hematopoietic Cells*, Vol. 5, Clarkson, A.B., Marks, P.A., and Till, J.E., Eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1978, 155.
- 46.- Stephenson, J.R., Axelrad, A.A., McLeod, B.L., and Shreeve, M.M., Induction of colonies of hemoglobin-synthesizing cells by erythropoietin *In Vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1542, 1971.
- 47.- Heath, D.S., Axelrad, A.A., McLeod, B.L., and Shreeve, M.M., Separation of the erythropoietin-responsive progenitors BFU-e and CFU-e in mouse bone marrow by unit gravity sedimentation, *Blood*, **47**, 777, 1976.
- 48.- Lin, H.S., Steward, C.C., Peritoneal exudate cells. I. Growth requirements of cells capable of forming colonies in soft agar, *J. Cell. Physiol.*, **83**, 369, 1974.
- 49.- Metcalf, D., and MacDonald, H.R., Heterogeneity of *in vitro*

- colony and cluster forming cells in the mouse marrow. Segregation by velocity sedimentation, *J. Cell. Physiol.*, **85**, 443, 1975.
- 50.- Ichikawa, Y., Fluznik, D.H., and Sachs, L., *In vitro* control of the development of macrophage and granulocyte colonies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **56**, 488, 1966.
- 51.- Metcalf, D., MacDonald, H. R., Odartchenko, M., and Sordat, R., Growth of mouse megakaryocyte colonies *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 1744, 1975.
- 52.- Messner, H.A., Jomsl, N., and Isquirdes, C., The growth of large megakaryocyte colonies from human bone marrow, *J. Cell. Physiol.*, **1** (Suppl.) **45**, 1982.
- 53.- Chervenick, P.A., and Boggs, D.R., *In vitro* growth of granulocytes and mononuclear colonies from blood of normal individuals, *Blood*, **37**, 131, 1971.
- 54.- Johnson, G.R., and Metcalf, D., Detection of a new type of mouse eosinophil colony by Luxol-fast blue staining, *Exp. Hematol.*, **8**, 549, 1980.
- 55.- McCarthy, J.H., Mandel, T.E., Garson, D.N., and Metcalf, D., The presence of mast cells in agar culture, *Exp. Hematol.*, **8**, 562, 1980.
- 56.- Nakahata, T., Spicer, S.S., Canter, J.R., and Ogawa, M., Induction of colonies of hemoglobin-synthesizing cells by erythropoietin *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1542, 1971.
- 57.- McLeod, B.L., Shreeve, M.M., and Axelrod, A.A., Chromosome evidence for the bipotentiality of BFU-e, *Blood*, **56**, 318, 1980.
- 58.- Nakahata, T., Spicer, S.S., and Ogawa, M., Clonal origin of human erythrosinophilic colonies in culture, *Blood*, **59**, 807, 1982.
- 59.- Fauser, A.A., and Messner, H.A., Granulocerythropoietic colonies in human bone marrow, peripheral blood and blood, *Blood*, **52**, 1243, 1978.
- 60.- Johnson, G.R., and Metcalf, D., Pure and mixed erythroid colony formation *in vitro* stimulated by spleen conditioned medium with no detectable erythropoietin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 3679, 1977.
- 61.- Metcalf, D., Johnson, G.R., and Mandel, T.E., Colony formation in agar by multipotential hemopoietic cells, *J. Cell. Physiol.*, **98**, 401, 1979.
- 62.- Humphries, R.K., Eaves, A.C., and Eaves, J.C., Characterization of primitive erythropoietic progenitors found in mouse bone marrow before and after several weeks in culture, *Blood*, **53**, 746, 1979.
- 63.- Humphries, R.K., Jacky, P.B., Dill, F.J., Eaves, A.C., and Eaves, J.C., CFU-s in individual colonies derived *in vitro* from adult mouse marrow, *Nature (London)*, **279**, 718, 1979.
- 64.- Nakahata, T., and Ogawa, M., Identification in culture of a class of hemopoietic colony-forming units with extensive capability to self-renew and generate multipotential hemopoietic clones, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 3843, 1982.
- 65.- Elihe, N.J., and Golde, D.W., Production of colony stimulating activity by human lymphocytes, *Nature (London)*,

245, 703, 1974.

- 46.- Prival, J.P., Facon, M., Gallo, R.C., and Wu, A.M., Colony-stimulating factors in cultures of human peripheral blood cells, *J. Natl. Cancer Inst.*, **53**, 1583, 1974.
- 47.- Fel, S.E., De Groot, J.W., Mullink, R., Van Unnik, J.A.M., and Venotter, W., Mouse peritoneal exudate cells with ring-shaped nuclei; identification of two different cell types, *J. Reticuloendothel. Soc.*, **27**, 347, 1980.
- 48.- Kuhles, W.C., Studies on mononuclear phagocyte progenitor cells: morphology of cells and colonies in liquid culture of mouse bone marrow, *J. Reticuloendothel. Soc.*, **25**, 343, 1979.
- 49.- Schrader, J.W., and Crapper, E. M., Cloned factor-dependent lines of murine progenitors capable of generating both mast cells and megakaryocytes, in press.
- 70.- Holmes, K.L., and Morse III, H.C., Murine hemopoietic cell surface antigen expression, *Immunology today*, **9**, 344, 1988.
- 71.- Nicola, M.A., Metcalf, D., Von Melchner, H., and Burgess, A.W., Isolation of murine fetal hemopoietic progenitor cells and selective fractionation of various erythroid precursors, *Blood*, **58**, 374, 1981.
- 72.- Metcalf, D., Johnson, G.R., and Burgess, A.W., Direct stimulation by purified GM-CSF of the proliferation of multipotential and erythroid precursor cells, *Blood*, **55**, 138, 1980.
- 73.- Metcalf, D., and Burgess, A.W., Clonal analysis of progenitor cell commitment to granulocyte or macrophage production, *J. Cell. Physiol.*, **111**, 275, 1982.
- 74.- Johnson, G.R., and Metcalf, D., The commitment of multipotential hemopoietic stem cells: studies *in vivo* and *in vitro*, in *Cell Lineage and Cell Determination*, Murray, A.A., and Le Douarin, M., Eds., North Holland, Amsterdam, 1979, 198.
- 75.- Nishizata, T., and Ogawa, M., Clonal origin of murine hemopoietic colonies with apparent restriction to granulocyte-macrophage-megakaryocyte (GNM) differentiation, *J. Cell. Physiol.*, **111**, 239, 1982.
- 76.- Humphries, R.K., Eaves, A.C., and Eaves, J.C., Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony-formation *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 3627, 1981.
- 77.- Johnson, G.R., Keller, G.M., and Nicola, M.A., Differentiation and renewal of multipotential cells *in vitro*, *J. Cell. Physiol.*, **1** (Suppl.) **23**, 1982.
- 78.- Curry, J.L., and Trentin, J.J., Hemopoietic spleen colony studies. I. Growth and Differentiation, *Dev. Biol.*, **15**, 395, 1969.
- 79.- Van Zant, G., and Goldwasser, E., *Experimental Hematology Today*, Baum, S.J., and Ledney, G., Eds., Springer-Verlag, New York, 1977, 43.
- 80.- Metcalf, D., Johnson, G.R., Interaction between purified GM-CSF purified erythropoietic and spleen conditioned medium on hemopoietic colony-formation *in vitro*, *J. Cell. Physiol.*, **99**, 159, 1979.
- 81.- Greenberger, J.S., Sensitivity of corticosteroid-dependent

- inulin-resistant lipogenesis in marrow preadipocytes of obese-diabetic (db/db) mice, *Nature (London)*, **275**, 752, 1978.
- 82.- Dexter, T.M., Spencer, E., Toksoz, D., and Lajtha, L.G., The role of cells and their products in the regulation of the *in vitro* stem cell proliferation and granulocyte development, *J. Supramol. Struct.*, **13**, 513, 1980.
- 83a.- Dexter, T.M., Allen, T.D., and Lajtha, L.G., Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*, *J. cell. Physiol.*, **91**, 335, 1977.
- 83b.- Bentley, S.A., Close range cell: cell interactions required for stem cell maintenance in continuous bone marrow culture, *Exp. Hematol.*, **9**, 309, 1981.
- 84.- Allen, T.D., Haemopoietic microenvironments *in vitro*; ultrastructural aspects, in *Microenvironments in Haemopoietic and Lymphoid Differentiation*, CIBA Found. Symp. No. 84, Porter, R., and Whelan, J., Eds., Pitman Medical, London, 1981, 33.
- 85.- Toddgood, I.R.G., Dexter, T.M., Allen, T.D., Sada, T., and Lajtha, L.G., The development of a liquid culture system for the growth of human bone marrow, *Leuk. Res.*, **4**, 449, 1980.
- 86.- Moore, M.A.S., Broxmeyer, H.E., Sheridan, A.P., Meyers, P.A., Jacobsen, N., and Winchester, R.J., Continuous human bone marrow culture: Is antigen characterization of probable pluripotential stem cells, *Blood*, **55**, 682, 1980.
- 87.- Eliason, J.F., Testa, M.G., and Dexter, T.M., Erythropoietin-stimulated erythropoiesis in long-term bone marrow cultures, *Nature (London)*, **281**, 382, 1979.
- 88.- Dexter, T.M., Testa, M.G., Allen, T.D., Rutherford, T., and Srobnick, E., Molecular and cell biologic aspects of erythropoiesis in long-term bone marrow cultures, *Blood*, **58**, 699, 1981.
- 89.- Bessis, M., *Living Blood Cells and their Ultrastructure*. Springer-Verlag, Berlin, 1973.
- 90.- Whitlock, C.A., and Witte, D.N., Long-term culture of B lymphocytes and their precursors from murine bone marrow, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 3608, 1982.
- 91.- McCulloch, E.A., Siminovitch, L., Till, J.E., Russell, E.S., and Bernstein, S.E., The cellular basis of the genetically determined hemopoietic defect in anemic mice of genotype *G1/G1(d)*, *Blood*, **26**, 399, 1965.
- 92.- Dexter, T.M., and Moore, M.A.S., *In vitro* duplication and cure of hemopoietic defects in genetically anemic mice, *Nature (London)*, **269**, 312, 1977.
- 93.- McCulloch, E.A., Siminovitch, L. L., and Till, J.W., Spleen colony formation in anemic mice of gene type *W/W(v)*, *Science*, **144**, 844, 1977.
- 94.- Dexter, T.M., and Sheddack, L.K., The regulation of haemopoiesis in long-term bone marrow cultures. I. Role of L-cell CSF, *J. Cell. Physiol.*, **102**, 279, 1980.
- 95.- Stanley, E.R., Colony-stimulating factor (CSF) radioimmunoassay: detection of a CSF subclass stimulating macrophage production, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 2969, 1979.

- 96.- Burgess, A.W., Bartlett, F.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., Clark-Lewis, I., and Schrader, J.W., Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor produced by inducible murine T cell hybridoma: molecular properties and cellular specificity, *Exp. Hematol.*, **9**, 893, 1981.
- 97.- Williams, N., and Burgess, A.W., The effect of mouse-lung granulocyte macrophage colony-stimulating factors and other colony-stimulating activities on the proliferation and differentiation of murine bone marrow cells in long-term cultures, *J. Cell. Physiol.*, **102**, 287, 1980.
- 98.- Zipori, C., Cell interactions in the bone marrow microenvironment; role of endogenous colony-stimulating activity, *J. Supramol. Struct. Cell Biochem.*, **17**, 347, 1982.
- 99.- Schrader, J.W., Clark-Lewis, I., and Bartlett, F.F., Lymphoid stem cells, in *Biology of Bone Marrow Transplantation*, Gale, R.P., and Fox, C.F., Eds., Academic Press, New York, 1980, 443.
- 100.- Schrader, J.W., and Nossol, G.J.V., Strategies for the analysis of accessory cell function: the *in vitro* cloning and characterization of the F cell, *Immunol. Rev.*, **53**, 61, 1980.
- 101.- Schrader, J.W., The *in vitro* production and cloning of the F cell, a bone marrow-derived null cell that express H-2 and Ia-antigens has cell mast-cell like granules and is regulated by a factor released by activated T cells, *J. Immunol.*, **126**, 452, 1981.
- 102.- Razin, E., Gordon-Carado, C., and Good, R.A., Growth of a pure population of mast cells *in vitro* with conditioned medium derived from concanavalin-A stimulated splenocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 2559, 1981.
- 103.- Tertish, G., Yung, Y.P., Guy-Grand, D., and Moore, M.A.S., Long term *in vitro* culture of murine mast cells. I. Description of a growth factor dependent culture technique, *J. Immunol.*, **127**, 788, 1981.
- 104.- Yung, Y.P., Eger, R., Tertish, G., and Moore, M.A.S., Long term *in vitro* culture of murine mast cells. II. Purification of a mast cell growth factor and its dissociation from TCGF, *J. Immunol.*, **127**, 794, 1981.
- 105.- Nobel, G., Galli, S.J., Dvorski, A.M., Dvorski, H.F., and Cantor, H., Inducer T lymphocytes synthesize a factor that stimulates proliferation of cloned mast cells, *Nature (London)*, **291**, 333, 1981.
- 106.- Schrader, J.W., Scollay, R., and Battye, F., Intramucosal lymphocytes of the gut: Lyt-2 and Thy-1 phenotype of the granulated cells and evidence for the presence of both T cells and mast cells precursors, *J. Immunol.*, **130**, 558, 1983.
- 107.- Greenberger, J.S., Gans, P.J., Davison, P.R., and Moloney, W., *In vitro* induction of continuous acute promyelocytic leukemia cell lines by Freund and Abelson murine leukemia virus, *Blood*, **53**, 987, 1979.
- 108.- Greenberger, J.S., Newberger, P.E., and Sakakeeny, M.A., Phorbol myristate acetate stimulates macrophage differentiation and replication and alters granulopoiesis

- and leukemogenesis in long-term bone marrow cultures, *Blood*, **56**, 368, 1980.
- 109.- Dexter, T.M., Garland, J., Scott, R., Scolnick, E., and Metcalf, D., Growth of factor-dependent hemopoietic precursor cell lines, *J. Exp. Med.*, **152**, 1036, 1980.
- 110.- Burgess, A.W., Camakaris, J., Metcalf, D., The purification and properties of colony stimulating factor from mouse lung-conditioned medium, *J. Biol. Chem.*, **252**, 1988, 1977.
- 111.- Sheridan, J.W., Metcalf, D., and Sytanley, R., Further studies on the factor in lung conditioned medium stimulating granulocyte and monocyte colony-formation *in vitro*, *J. Cell. Physiol.*, **84**, 147, 1974.
- 112.- Yamaguchi, Y., Hayashi, Y., Sugama, Y., Mura, Y., Kasahara, T., Kitamura, S., Terisu, M., Hata, S., Tomimaga, A., Takatsu, K., and Suda, T., Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs *in vitro* survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor, *J. Exp. Med.*, **167**, 1737, 1988.
- 113.- Nicola, N.A., and Metcalf, D., Biochemical properties of differentiation factors for murine myelomonocytic leukemic cells in organ conditioned medium: separation from colony-stimulating factors, *J. Cell. Physiol.*, **109**, 253, 1981.
- 114.- Austin, P.E., McCulloch, E.A., and Till, J.E., 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, 1971.
- 115.- Stanley, E.R., and Heard, P.M., Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony-stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells, *J. Biol. Chem.*, **252**, 4305, 1977.
- 116.- Das, S.K., Stanley, E.R., Guilbert, L.J., and Forman, L.W., Human colony-stimulating factor (CSF-1) radioimmunoassay: resolution of three subclasses of human colony-stimulating factors, *Blood*, **58**, 630, 1981.
- 117.- Burgess, A.W., Wilson, E.M.A., and Metcalf, D., Stimulation by human placental conditioned medium of hemopoietic colony formation by human bone marrow cells, *Blood*, **49**, 573, 1977.
- 118.- Nicola, N.A., Metcalf, D., Johnson, G.R., and Burgess, A.W., Separation of functionally distinct human granulocyte-macrophage colony-stimulating factors, *Blood*, **54**, 614, 1979.
- 119a.- McNeil, T.A., Release of bone marrow colony-stimulating activity during immunological reactions *in vitro*, *Nature (London) New Biol.*, **244**, 175, 1973.
- 119b.- Morgan, B.A., Ruscetti, S.C., and Gallo, R.C., Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrow, *Science*, **193**, 1007, 1976.
- 120.- Ruscetti, F.W., and Chervenick, P.A., Release of colony stimulating activity from thymus-derived lymphocytes, *J. Clin. Invest.*, **55**, 529, 1975.
- 121.- Aye, M.T., Erythroid colony formation in cultures in human marrow: effect of leukocytes conditioned medium, *J. Cell. Physiol.*, **91**, 69, 1977.

- 122.- Iscove, N.N., Erythropoietin-independent stimulation of early erythropoiesis in adult marrow cultures by conditioned medium from lectin-stimulated mouse spleen cells, in Hemopoietic Cell Differentiation, Golde, D.E., Cline, M.J., Metcalf, D., and Fox, C.F., Eds., Academic Press, New York, 1978, 37.
- 123.- Fuscetti, F.W., Cypress, R.H., and Chervenick, F.A., Specific release of neutrophilic and eosinophilic-stimulating factors from sensitized lymphocytes, *Blood*, **47**, 757, 1976.
- 124.- Hara, H., and Ogawa, M., Murine hemopoietic colonies in cultures containing normoblasts, macrophages and megakaryocytes, *Am. J. Hematol.*, **4**, 23, 1978.
- 125.- Fauser, A.A., and Mesner, H.A., Identification of megakaryocytes, macrophages and eosinophils in colonies of human bone marrow containing neutrophils, granulocytes and erythroblast, *Blood*, **53**, 1023, 1979.
- 126.- Metcalf, D., Acute antigen-induced elevation of serum colony stimulating factor (CSF) levels, *Immunology*, **21**, 427, 1971.
- 127.- Vos, D., Burman, W.A., and Flaemscher, R.E., Mobilization of haemopoietic stem cells (CFU) into the peripheral blood of the mouse; effects of endotoxin and other compounds, *Cell Tissue Kinet.*, **5**, 467, 1972.
- 128.- Burgess, A.W., and Metcalf, D., Characterization of a serum-factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemia cells, *J. J. Cancer*, **26**, 647, 1980.
- 129.- Parker, J.W., and Metcalf, D., Production of colony-stimulating factor in mitogen-stimulated lymphocyte cultures, *J. Immunol.*, **112**, 502, 1974.
- 130.- Levin J., Lovin, F.C., and Metcalf, D., The effects of acute thrombocytopenia on megakaryocyte CFC and granulocyte-macrophage CFC in mice; studies on bone marrow and spleen, *Blood*, **56**, 274, 1980.
- 131.- More, M.A.S., and Williams, N., Physical separation of colony-stimulating cells from *in vitro* colony-forming cells in hemopoietic tissue, *J. Cell. Physiol.*, **80**, 195, 1972.
- 132.- Chervenick, F.A., and Lo Euglio, A.F., Human blood monocytes. Stimulation of granulocytes and mononuclear colony-formation *in vitro*, *Science*, **178**, 164, 1972.
- 133.- Golde, D.W., Finley, T.N., and Cline, M.J., Production of colony-stimulating factor by human macrophages, *Lancet*, **2**, 1397, 1972.
- 134.- Ralph, P., Broxmeyer, H.E., Moore, M.A.S., and Makiwicz, I., Induction of myeloid colony-stimulating activity in murine monocytic tumor cell lines by macrophage activators and in a T cell line by concanavalin A, *Cancer Res.*, **38**, 1414, 1978.
- 135.- Dipersio, J.F., Brennan, J.K., Lichtman, M.A., and Spicer, B.L., Human cell lines that elaborate colony-stimulating activity for the marrow cell of man and other species, *Blood*, **51**, 507, 1978.
- 136.- Ohno, T., Seki, M., and Shikita, M., Colony-stimulating factors active on human bone marrow cells from a Yoshida sarcoma cell line, *Blood*, **51**, 911, 1978.
- 137.- Wu, M.C., Cini, J.K., and Yunis, A.A., Purification of a

- colony-stimulating factor from cultured pancreatic carcinoma cells, *J. Biol. Chem.*, **254**, 6226, 1979.
- 138.- Schrader, J.W., Arnold, B., and Clark-Lewis, I., A Con A-stimulated T-cell hybridoma releases factors affecting haemopoietic colony-forming cell and B cell antibody responses, *Nature (London)*, **238**, 197, 1982.
- 139.- Quesenberry, F.J., Gimbrone, M.A., and McDonald, M.J., Endothelial-derived colony-stimulating activity, *Exp. Hemat.*, **6(Suppl. 3)**, 4, 1978.
- 140.- Schrader, J.W., Bartlett, P.F., and Clark-Lewis, I., T cell hybridoma-derived lymphokines, biology, and biochemistry of factors regulating hemopoietic and lymphoid cells, *Lymphokines*, **5**, 590, 1982.
- 141.- Schrader, J.W., and Clark-Lewis, I., T cell hybridoma-derived regulatory factors. I. Production of T cell growth factor following stimulation by Con A, *J. Immunol.*, **126**, 1101, 1981.
- 142.- Schrader, J.W., and Clark-Lewis, I., A T cell derived factor stimulating multipotential hemopoietic stem cells molecular weight and distinction from T cell-growth factor and T-cell-derived-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *J. Immunol.*, **129**, 30, 1982.
- 143.- Clark-Lewis, I., and Schrader, J.W., Biochemical characterization of regulatory factors derived from T cell hybridomas and spleen cells. I. Separation of T cell-growth factor and T cell-replacing factor from granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *J. Immunol.*, **128**, 168, 1982.
- 144.- Clark-Lewis, I., and Schrader, J.W., Biochemical characterization of regulatory factors derived from T cell hybridomas and spleen cells. II. Evidence for glycosylation of T-cell growth factor, T cell-replacing factor, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *J. Immunol.*, **128**, 175, 1982.
- 145.- Clark-Lewis, I., and Schrader, J.W., F cell-stimulating factor: biochemical characterization of a new T cell-derived factor, *J. Immunol.*, **127**, 1941, 1981.
- 146.- Bøsten, A., and Beeson, P.R., Mechanism of eosinophilia. II. Role of the lymphocyte, *J. Exp. Med.*, **131**, 1288, 1970.
- 147.- Schrader, J.W., Bone marrow differentiation in vitro, *Crit. Rev. Immunol.*, **4**, 3, 1984.
- 148.- Sachs, L. Hematopoietic growth factors, *Nature*, **309**, 763, 1984.
- 149.- Sachs, L., 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. U.S.A.*, **77**, 6152, 1980.
- 150.- Sachs, L., Normal developmental programmes in myeloid leukemia: regulatory proteins in the control of growth and differentiation, *Cancer Surv.*, **1**, 321, 1982.
- 151.- Nicols, N.A., Metcalf, D., Matsumoto, N., and Johnson, G.R., *J. Biol. Chem.*, **258**, 9017, 1983.
- 152.- Lotem, J., Lipton, J.H., and Sachs, L., Separation of different molecular forms of macrophage and granulocyte inducing proteins for normal and leukemic myeloid cells,

- Int. J. Canc., 25, 743, 1980.
- 153.- Tomida, M., Yamamoto, Y., and Hazumi, M., Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells, *J. Biol. Chem.*, **259**, 10978, 1984.
- 154.- Olsson, I., Saragadharan, M.G., Breitman, T.R., Gallo, R.C., Isolation and characterization of a T lymphocyte-derived differentiation inducing factor for the myeloid leukemic cell line HL-60, *Blood*, **62**, 510, 1984.
- 155.- Lotem, J., and Sachs, L., *Int. J. Canc.*, **33**, 147, 1984.
- 156.- Lotem, J., and Sachs, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 4347, 1984.
- 157.- Symonds, G., and Sachs, L., *EMBO J.*, **1**, 1343, 1982.
- 158.- Calcagno, M., Perez, J.R., Valdo, M.G., Cabrera, M.G., and Weiss, B., Evidence of the existence of a factor that induces Fc receptors on bone marrow cells, *Blood*, **59**, 756, 1982.
- 159.- Clark, S.C., and Nemen, R., The human hemopoietic colony-stimulating factors, *Science*, **236**, 1229, 1987.
- 160.- Ihle, J.N., Keller, J., Greenberger, J.S., Henderson, L., Yetter, R.A., and Morse, H.C., Phenotypic characteristics of cell lines requiring interleukin 3, *Cell*, **25**, 179, 1981.
- 161.- Ihle, J.N., Keller, J., Lee, J.C., Farrar, W.L., and Hapel, A.J., Purification and biological properties of interleukin 3, in *Lymphokine and Thymic factors and their Potential in Cancer Therapeutics*, Goldstein, A.L., and Chirigos, M. Eds., Raven Press, New York, in press.
- 162.- Nienhuis, A.W., Hemopoietic growth factors, *Biologic complexity and clinical promise*, *N. Engl. J. Med.*, **317**, 914, 1988.

Experimental Hematology

Journal of the International Society for Experimental Hematology

Eugene P. Cronkite, MD Medical Department Brookhaven National Laboratory Upton, LI, NY 11973-5000

Ref: EH 8

September 23, 1988

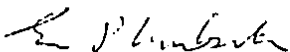
Dr. Benny Weiss, ENEP-Zaragoza, UNAM
Apartado Postal 9-020, Mexico 15000
D.F., Mexico

Dear Dr. Weiss:

Re: MS No. 87-214R

I am very pleased to inform you that your manuscript entitled "Evidences that the macrophage and granulocyte inducer..." has been accepted for publication in Experimental Hematology and will be forwarded to the publisher.

Sincerely,



Eugene P. Cronkite, M.D.
Editor in Chief
Experimental Hematology

EPC:mb

Title: Evidences that the Macrophage and Granulocyte Inducer (MGI), Also Known as Colony Stimulating Factor (CSF), is Produced During Cell Proliferation, is Stored in Go, Released in G1, is Cell Specific, and Induces the Secretion of Other Colony Stimulating Activities (CSA).

By: Isaac R. Zambrano, Jorge F. Mendez, Julio R. Caceres, Edelmira Santiago, Lourdes M. Mora, Terecita N.J. Marin and Benny Weiss-Steider.

From: Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza, Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer, UNAM, Mexico D.F.

Short title: CSF is Cell Specific.

Key words: MGI- CSF- Macrophages.

Correspondence address: Dr. Benny Weiss, ENEP-Zaragoza, UNAM, Apartado Postal 9-020, Mexico 15000 D.F., Mexico.
Tel: 792-32-68 ext. 239.

ABSTRACT. The secretion of the macrophage and granulocyte inducer (MGI), also known as colony stimulating factor (CSF) by epithelial cells from lungs and kidneys, and by fibroblasts from lungs, was determined as a function of time in cultures and found to be secreted during the initial exponential proliferation period, and not when the cells approached saturation density. When the cells were again induced to proliferate, large amounts of CSF were released after 3 h, thus hinting to the existence of a reserve pool. A CSF activity with 70 000 d was found in cultures of fibroblasts from lungs, kidneys and from the peritoneal cavity, a 45 000 d CSF was obtained from mouse peritoneal macrophages, and from bone marrow cells when activated for macrophage proliferation, and a 22 000 d CSF was found from epithelial cells, thus suggesting that the different CSFs are cell specific. When fibroblast CSF was used to induce bone marrow cells, three new molecules with colony stimulating activity were produced with 45 000, 30 000 and 17 000 d. The fraction with the 17 000 d activity contained also IL-1 activity, hinting to an indirect induction of colony formation by this factor. Finally the possible existence of a cascade reaction in which one CSF induces the appearance of other CSFs during the normal regulation of myeloid cell differentiation is discussed.

INTRODUCTION

The macrophage and granulocyte inducer (MGI) (1-3), better known as colony stimulating factor (CSF) (4,5) has been clearly identified, at least *in vitro*, as the regulator of the proliferation and differentiation of granulocytes and macrophages from a common committed precursor (6,7). Many sources are known today of CSF, they are produced and secreted by a wide variety of cells, and are found in almost all the body fluids (8-11). Even though unifying theories have been proposed to explain the existence of many molecular weights of this molecule (12), no one can account for such a diversity.

Studies with the CSFs secreted by fibroblasts (CSF-1) (13), by lungs (GM-CSF) (14), and by lymphocytes (IL-3) (15,16), have shown that apart from having different molecular weights they act on different target cells. Recently interesting data has been published in which the induction of CSF has been bisected in a proliferative (MGI-1), and a differentiative (MGI-2) activity (17-19).

Although much is known today on the mechanism of action of CSF, it is still not clear if this factor is cell or tissue specific, whether it is a normal dynamic property of the cells involved, whether there exists a storage compartment that accounts for the release of great amounts of this factor soon after an endotoxic challenge (9,10), or whether all the existing CSF act independently, or they belong to a cascade reaction in which one factor induces the appearance of another one.

We undertook this work to try to provide evidences that the CSFs are cell specific, that they are actively produced and secreted during cell proliferation, and then stored (probably in G₀) to be rapidly released (probably in G₁), and that they could belong to a chain reaction in which one CSF induces the production of other CSFs. For these purposes we cultured several cell types and evaluated the secretion of CSF as a function of time until they reached saturation by cell density, followed by the reactivation for new proliferation.

We also determined the molecular weights of the CSFs in the different conditioned media produced in order to evaluate whether similar cell types produce similar CSFs, and finally we induced target cells sensible to CSF to proliferate to determine if new colony stimulating activities are secreted by these cells.

MATERIALS AND METHODS

Mice. Mice of either sex, strain CD-1, were used at 7-10 days of age as donors of lungs and kidneys, and at 6-8 weeks as donors of fibroblasts, alveolar macrophages, bone marrow cells, thymocytes, and resident and induced macrophages of the peritoneal cavity.

Cell culture. All the cells were cultured under a 10% CO₂ atmosphere, at 37 °C and with 95% relative humidity in minimal essential medium (MEM) (Gibco Labs., Grand Island, NY) supplemented with either 10% fetal bovine serum (FBS) (MicroLab, Mexico), or horse serum (HS) (MicroLab) previously inactivated at 56 °C for 30 min. Streptomycin 100 mcg/ml, penicillin G 100 U/ml, and sodium bicarbonate 3.7 g/liter were added to the MEM before culture. All the cultures were done using 60 x 15 mm tissue culture dishes with a final volume of 5 ml.

Cells. Lung fibroblasts were obtained after an enzymatic dispersion with 0.05% of collagenase type IV in a phosphate-buffered saline solution (PBS) at room temperature. On the other hand to obtain epithelial cells from kidneys and lungs the organs were subjected to enzymatic dispersion with 0.25% of crude trypsin from pig pancreas, also in PBS and at room temperature. Finally the cells were always resuspended in culture media containing FBS.

To obtain resident macrophages from the peritoneal cavity, the mice were sacrificed and the cells removed by flushing the cavity with 10 ml of PBS. This operation was repeated two more times with 5 ml of PBS to recover as many cells as possible. The cells were then washed three times with PBS at 500 g for 5 min, and finally 8x10⁶ cells were seeded in culture media containing HS. To obtain induced macrophages from the peritoneal cavity, the mice were injected ip with 3 ml of sodium caseinate (Difco Labs., Detroit, MI) at 10% in PBS. After 4 days the animals were sacrificed and the peritoneal exudates recovered by flushing the cavity with 20 ml of PBS. The cells were washed three times and 8x10⁶ cells seeded with culture media containing HS. In order to enrich the macrophage populations, the cells were incubated for 1 h at 37 °C, followed by the removal of those cells that did not adhere to the culture substrate. To obtain alveolar macrophages 1 ml of MEM was introduced intratracheally into the lungs to flush the cells out. To recover as many cells as possible, this operation was repeated ten times. The cells were then washed three times with MEM at 500 g for 3 min, and 4x10⁶ cells seeded in culture media containing HS. Finally to obtain thymocytes, the thymus was squeezed through a nylon sieve, and the mononuclear cells recovered from a density gradient with Ficoll-Hypaque were washed three times with PBS at 500 g for 3 min before seeding 1 x 10⁶ cells/ml in culture media.

Conditioned media. Unless otherwise specified the sources for

the CSFs were the media conditioned (CM) by the different cell types employed. CSF from fibroblasts and epithelial cells were produced by cultures in their second passages, either by seeding 2.7×10^6 lung fibroblasts and collecting the CM at 1, 4, 8, and 12 days, or 3×10^6 lung epithelial cells after 1, 3, 4, 7 and 12 days, or 1.5×10^6 kidney epithelial cells after 1, 4, 8 and 11 days. The media conditioned by 8×10^6 bone marrow cells stimulated with 2 ml of the CM from fibroblasts as a source of CSF, was collected after 4 days in culture. To produce CM from peritoneal macrophages (MAC-CM) 8×10^6 cells were incubated during 4 days with 1.5 mcg/ml of lipopolisaccharides (LPS) from *Salmonella typhimurium*. The CM of alveolar macrophages was obtained after incubating the cells for 4 days. All the CM were stored at -20 C until use.

CSF assay. For the colony stimulation assay the double agar layer technique was employed (1). Briefly; in a 60 x 15 mm Petri dish a first layer with 0.6% of agar was added with the medium to be tested, and a second layer with 0.3% of agar was overlaid with approximately 5×10^6 bone marrow cells. After 7 days of incubation, all the colonies with more than 20 cells were counted using an inverted microscope.

IL-1 assay. For the IL-1 assay its property to potentiate unfractionated thymocytes proliferation was employed (20). Briefly; in a 30 x 10 mm Petri dish 0.25 ml of the medium to be tested was added with 5×10^6 unfractionated thymocytes and 6 mcg/ml of Con A. The cell proliferation was determined by evaluating the number of cells after 3 days in culture.

Gel chromatography. A total of 2 ml of CM from either fibroblasts, epithelial cells or from bone marrow cells, were chromatographed in Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) in a 2.5 x 90 cm column, and eluted with 75 mM Tris - HCl buffer, pH 7.7, at 4 C and with a flow rate of 4 cm/h. Fractions of 3.5 ml were collected and stored at -20 C until use. Transferrin, ovalbumin, myoglobin and cytochrome C were used as external standards. On the other hand 2 ml of the CM from induced macrophages, and peritoneal fibroblasts were chromatographed on Acs-54 (LKB Produkter, Bromma, Sweden) using this time bovine serum albumin, ovalbumin, beta-lactoglobulin, myoglobin, and cytochrome C as standards. For the biological assays, aliquots of 0.5 ml from each fraction were employed.

Miscellaneous. The results are the averages of duplicates of two independent assays, that did not depart more than 15% from each other. A culture without CM was always added as control. All the chemicals were from Sigma Chemical Co unless otherwise specified.

RESULTS

CSF is produced by active proliferating cells.

The proliferation *in vitro* of fibroblast from mouse lungs, and epithelial cells from lungs and kidneys, was evaluated by cell counts as a function of time, and the secretion of CSF by using 0.5 ml of the conditioned medium (CM) collected during the cell counts, by means of a double agar colony assay. Our results showed that in all the experiments there was a significant secretion of CSF during the exponential growth phase (Fig. 1), and that this secretion stopped when the cells approached saturation. In order to assure that colony saturation was not due to CSF saturation in our assays, in all the experiments we used as positive control 0.5 ml of a CM from saturated cultures of either lung fibroblasts or epithelial cells with high CSF activity. While we never obtained colonies in the negative controls without CSF, we routinely counted between 1300 and 1500 colonies/10 cells seeded, in the positive ones. That is almost three times as many colonies as those from the most active CM.

CSF is released from the cells a few hours after activation to proliferation.

Once that we have established that in our conditions cells approaching density inhibition (probably in G0, or with a large doubling time) do not secrete CSF while proliferating cells do, we proceeded to activate the saturated cultures of lung fibroblasts and kidney epithelial cells by adding MAC-CM. We employed this CM because it is known that it contains an activator for proliferation (21-25), and because it has the additional advantage that we could never detect any CSF activity in any of the 5 occasions in which it was produced.

Due to the fact that CSF is already present at high levels *in vivo* even after 3 h of LPS challenge (9), we recovered the CM of the different cell types under the action of MAC-CM for CSF evaluation after 3, 6, 9, 12, 31 and 120 h. Our results show that a significant secretion of CSF was already present after 3 h, that this secretion increased during the next 9 h, and then remained constant as well as the number of cells for another 19 h (Fig. 2). On the other hand when the confluent fibroblasts and epithelial cells were lysed by a double cycle of freeze-thaw using liquid nitrogen, the supernatants presented CSA. In fact by lysing 1×10^6 cells in 1 ml of PBS and using 0.5 ml for our CSA assays, we found 65 colonies when using the epithelial cells lysate, while 200 when using the fibroblasts lysate. In consequence we think that the fact that the lysates of saturated cultures had CSA, and that we could detect CSA in the CM of these cultures, in such a short period of time after the cells were exposed to MAC-CM, indicates that the factor was released from a storage compartment and probably during G1. Simultaneously to the increase of the number of fibroblasts from 8.4×10^5 to 1.0×10^6 and epithelial cells from 7.0×10^5 to 9.0×10^5 at 120 h, there was an increase in CSA secretion (Fig. 2), hinting that this second cycle of secretion is a product of de

novo synthesis and not from a storage compartment.

Fibroblast CSF induces the secretion of macrophage CSF.

If as shown above a cell secretes CSF when it proliferates, then when the monocyte-macrophage cells are induced to proliferate by their regulator CSF-1 (13), we could expect that the newly induced cells would secrete its own CSF. To determine if in our conditions one CSF can induce the secretion of another CSF, we proceeded either to cocultivate CSF secreting fibroblasts with nonsecreting elicited peritoneal macrophages, or by adding fibroblast CSF to induce bone marrow monocytic precursors to proliferate. When peritoneal elicited macrophages were kept *in vitro* for up to 15 days we could never detect, even in the presence of LPS, the secretion of CSF activity in their CM. When the peritoneal fibroblasts that produced a CSF activity with an apparent mol wt of 70 000 d were cocultivated with the elicited macrophages, two peaks of activity were obtained, one with 70 000 d and another with 45 000 (Fig. 3), hinting that the secretion of this second CSF is done by the induced macrophages.

When bone marrow cells were cultured in the presence of the CM of kidney fibroblasts, which by itself gave us a single peak of CSF activity similar in mol wt to the one obtained with peritoneal fibroblasts of 70 000 d, we detected in the culture media after 7 days four different colony stimulating activities with apparent mol wts of 70 000, 45 000, 30 000 and 17 000 d (Fig. 4). The 45 000 CSF was by far the most abundant peak, hinting once again to the monocyte-macrophage cell as the producer of this factor. This observation coincides with one of our previous works (26) in which we identified in the CM of a macrophage-like line a single peak of CSF activity with 45,000 d, and from another work in which peritoneal and alveolar macrophages were found to produce a molecule with a similar mol wt (17). It is interesting to mention that it has also been found a CSF from human monocytes with a similar mol wt (27). Taking into consideration that macrophages are known to secrete several factors with CSF inducing properties, like interleukin 1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) (24,28-30) we can not associate to these peaks a clear CSF activity. Thus we prefer to call them colony stimulating activities until this point is clarified. Nevertheless due to the fact that the peak with the 17 000 d is similar in weight with IL-1 (31), we proceeded to determine whether this molecule was present in the chromatographic fractions. By using the assay of potentiation to proliferation of unfractionated thymocytes by IL-1, we obtained that the fractions that contained the 17 000 d colony stimulating activity corresponded with those with IL-1 activity (Fig. 4).

CSF is probably a cell specific factor.

It has been well documented that the CSF produced by endotoxic mouse lungs is of approximately 22 000 d (32,33). In this work we have already shown that we could not obtain CSF activity from lung macrophages, and only one CSF of 70 000 d from lung

fibroblasts, thus it is probable that this 22 000 molecule is produced by another cell type in the lungs. Taking into consideration that apart from the fibroblasts and the macrophages, the epithelial cells represent another important group in this organ, we employed the CM of our epithelial cells to evaluate the mol wt of their CSF. We obtained a single peak with CSF activity of 22 000 d. Thus we interpret that the epithelial tissue of the lungs is the secretor of the endotoxic lung CSF.

In this work we have obtained a CSF activity of 70 000 d from three sources of fibroblasts (lung, kidney and peritoneum) similar in weight to the well known CSF-1 also from a fibroblastic cell line. We have given evidences that the monocyte-macrophage cells secrete a 45 000 d CSF, similar in weight to the one obtained from a macrophage-like cell line and to the one found from human monocytes, and finally we have associated the 22 000 d CSF to that produced by epithelial cells, similar in weight to the one obtained from mouse lungs with a large epithelial cellular component. Thus there are evidence that the production of a particular CSF is cell specific. Obviously more cells have to be analyzed, and a more precise biochemical determination performed in order to generalize this assumption, but we think that our results point towards that direction.

DISCUSSION

The macrophage and granulocyte inducer (MGI), also known as colony stimulating factor (CSF) has been found in almost every conditioned media (CM) from every cell line tested, hinting that its production and secretion is an intrinsic cellular property. In this work we provide evidence that this factor is secreted by the cells during proliferation, and stops when the cultures approach saturation. If this has any similarity to what happens *in vivo*, then we could expect that the active proliferating tissues regulate, through the secretion of growth factors, the size and differentiation state of the myeloid hematopoietic pool. Evidently if we take into consideration that epithelial cells form part of one of the most important proliferating tissues in the organism, we could then expect that the CSF produced by them is an important physiological factor regulating the amount of granulocytes and macrophages in the body. We can further speculate that during chemotherapy the proliferation of the myeloid precursors is affected not only by the cytotoxicity of the drugs (34,35), but by the lack of CSF as a result of the toxicity on the epithelial cells that produce it. The external administration of granulocyte CSF during chemotherapy has already been suggested as a useful procedure to maintain the production of these cells in patients (34), nevertheless taking into consideration that the epithelial CSF could represent the physiologic inducing factor, it would also be interesting to determine if the external administration of this factor shortly after chemotherapy helps in maintaining the production of both macrophages and granulocytes.

It is known that after an endotoxic challenge the organism is capable of secreting, in a very short time, large amounts of CSF. In consequence there has to be a reserve pool of this factor somewhere in the organism readily available for this purpose. In this work we have shown that when a culture in density inhibition (probably in G₀, or with a large doubling time) is activated, it secretes significant amounts of CSF in a very short time. We thus think that a possible source for body CSF reserve can be found in the resting cells, and that it can be released to the environment in a very short time (probably during G₁).

Even though when the different organs were digested enzymatically cultures with different cellular composition were obtained, we only took for our experiments those that by morphology were clearly fibroblasts or epithelial cells. In this work we have presented evidence that fibroblasts from different organs produce the 70 000 d CSF similar in mol wt to the CSF-1 produced by a well known fibroblast cell line, that the resident peritoneal macrophages and the bone marrow monocytes produce the 45 000 d CSF similar in mol wt to the one produced by a macrophage-like cell line (26), by alveolar and elicited macrophages (17), and by human monocytes (27), and that the epithelial cells produce the 22 000 d CSF similar in mol wt to the GM-CSF produced by endotoxic lungs. In consequence we think that in the organism the production of CSF is cell specific, and that every cell type is capable of producing its own, thus providing a simple way to explain the diversity of CSF found

published in the scientific literature so far.

It has been shown that one type of CSF (MGI-1) can induce a target cell to proliferate and to secrete another type of CSF (MGI-2) that helps in the process of its own differentiation (17-19, 34, 37). Thus implying that the production of mature myeloid cells in the organism could be due to at least two interrelated CSF molecules. Also in this work we have shown that the CSF produced by fibroblasts is capable in turn to induce the production of another CSF by the monocyte-macrophage cells, and we have also presented evidence that when this factor is given to bone marrow cells, at least three new colony stimulating activities were produced. We also showed that one of these peaks corresponded to the fractions where IL-1 was present. Thus taking into consideration that IL-1 can induce the secretion of CSF by macrophages (24), we can not rule out the possibility of an indirect induction, specially if we take into consideration that we used a rather high number of bone marrow cells in our assays. In fact it would be interesting to repeat the experiments with anti-IL-1 to determine whether there exists a CSF that corelates with IL-1.

Taking into consideration that other factors with the property of CSF induction can be also released by macrophages (23), we can not at this stage determine if the 30 000 d molecule found in the supernatants of bone marrow cultures, is a result of another indirect mechanism of colony induction. Nevertheless we do think that the 45 000 d molecule is a true CSF because no indirect inducer has been found with this mol wt so far. On the other hand we also think that this CSF is produced by proliferating monocyte-macrophage cells, as shown in this work, and by a macrophage like cell line in a previous one (26). We consider that the possibility of this molecule being a polymer of lighter forms of CSF produced by the chromatographic technic used is low, because no lighter CSF molecules were obtained neither on the experiment with peritoneal macrophages, nor with the macrophage like cell line, and also by the fact that the same mol wt was obtained in the conditioned medium of this cell line by using the technic of ultracentrifugation in sucrose gradients. Nevertheless we can not rule out the possibility that the 45 000 d CSF molecule is a dimer of the already known 22 000 d one. It has to be mentioned that in this work we do not attempt to demonstrate that we have found new CSF molecules, for this purpose it would be necessary to purify the molecules, or to make cross experiments with antibodies to the already known factors. From our results we can nevertheless speculate that there are hemopoietic cells that produce their own CSF in response to the proliferation induced by other cell types; and that a cascade reaction can occur in which the CSF produced by one cell type, induces another cell to proliferate and to secrete yet another CSF. Finally if we consider that a chain reaction does occur, and that on the other hand there are CSF that belong to the differentiating group MGI-2, then it would be interesting to determine if a differentiating molecule for one cell type, could also have a proliferating effect in another one.

Legends to Figures

- 1.- Proliferation Kinetics of Kidney epithelial cells (), lung fibroblasts (), and lung epithelial cells (), as well as colony formation induced on bone marrow cells by the media conditioned by Kidney epithelial cells (), lung fibroblasts (), and lung epithelial cells ().
- 2.- Kinetics of colony formation induced on bone marrow cells by the media conditioned by saturated cultures of lung fibroblasts () and Kidney epithelial cells (), after induction to proliferation by macrophage conditioned media.
- 3.- Elution profile of the media conditioned by a coculture of elicited macrophages and fibroblasts of the peritoneal cavity. Colony formation on bone marrow cells (), and absorbance at 280 nm ().
- 4.- Elution profile of the media conditioned by bone marrow cells that were activated by the conditioned media of Kidney fibroblasts. Colony formation on bone marrow cells (), induction of proliferation of unfractionated thymocytes (), and absorbance at 280 nm ().

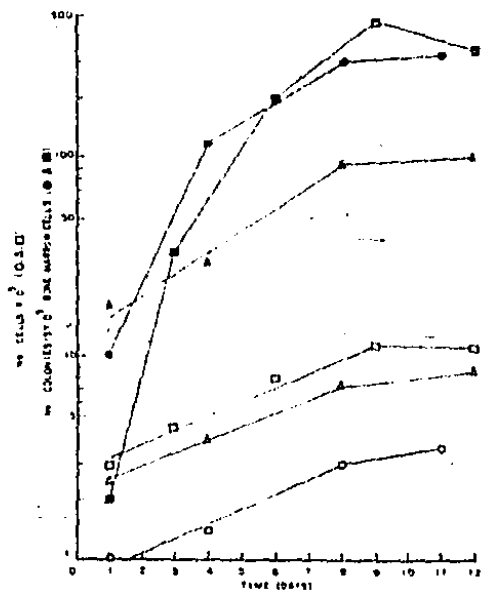


FIGURE 1.

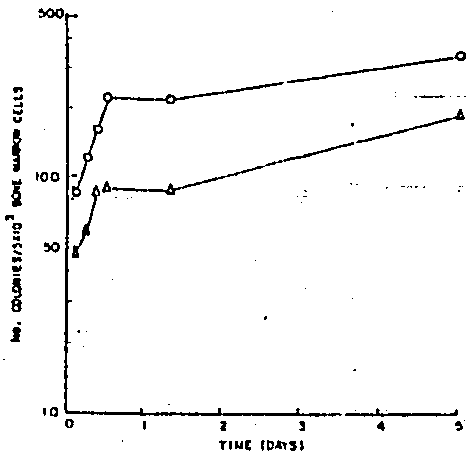


FIGURE 2.

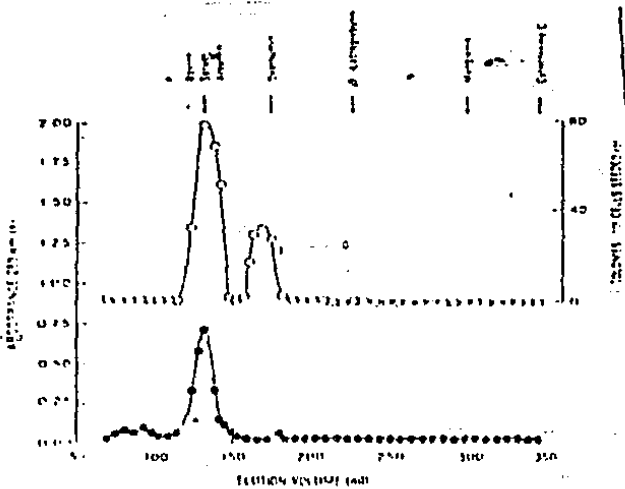


FIGURA 3

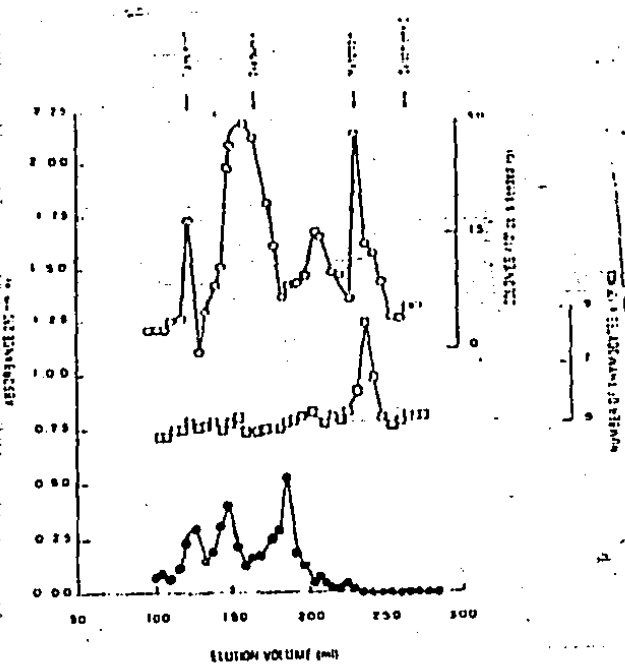


FIGURA 4

REFERENCES

1. Fluznich DH, Sachs L: The cloning of normal B₂₂₀ cells in tissue culture. *J Cell Comp Physiol* 66:319, 1965.
2. Fluznich DH, Sachs L: The induction of clones of normal B₂₂₀ cells by a substance from conditioned medium. *Exp Cell Res* 43:553, 1966.
3. Ichikawa Y, Fluznich DH, Sachs L: Feedback inhibition of the development of macrophage and granulocyte colonies. I. Inhibition by macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 53:1480, 1967.
4. Bradley TR, Metcalf D: The growth of mouse bone marrow cells *in vitro*. *Aust J Exp Biol Med Sci* 44:287, 1966.
5. Metcalf D: Studies of colony formation *in vitro* by mouse bone marrow cells. I. Continuous cluster formation and relation of cluster to colonies. *J Cell Physiol* 74:323, 1969.
6. Till JE, Mc Culloch EA: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 11:213, 1961.
7. Ichikawa Y, Fluznich DH, Sachs L: *In vitro* control of development of macrophage and granulocyte colonies. *Proc Natl Acad Sci USA* 56:488, 1966.
8. Sachs L: Regulation of membrane changes, differentiation, and malignancy in carcinogenesis. *Harvey Lect* 68:1, 1974.
9. Lotan J, Lipton J, Sachs L: Separation of different molecular forms of macrophage and granulocyte inducing proteins for normal and leukemic myeloid cells. *Int J Cancer* 25:763, 1980.
10. Laukel H, Glassel WR, Dorsch HH, Schmidt W, Havemann K: Preparation of colony stimulating activity from large batches of human urine and production of antibodies against it. *J Cell Physiol* 94:21, 1978.
11. Stanley ER, Metcalf D: Partial purification and some properties of the factor in normal and leukemic human urine stimulating mouse bone marrow colony growth *in vitro*. *Aust J Exp Biol Med* 47:467, 1969.
12. Nicols WA, Burgess AW, Metcalf D: Similar molecular properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factors produced by different mouse organs *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 254:5290, 1979.
13. Stanley ER, Heard FM: 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, 1977.
14. Burgess AW, Camskaris J, Metcalf D: Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung conditioned medium. *J Biol Chem* 252:1978, 1977.
15. Ihle JN, Keller J, Henderson L, Klein F, Palaszynski EW: Procedures for the purification of interleukin 3 to homogeneity. *J Immunol* 129:2431, 1982.
16. Watson JB, Crossier PS, March CJ, Conlon PJ, Nishizaki DY, Gillis S, Urdal DL: Purification to homogeneity of a human hematopoietic growth factor that stimulates the growth

- of murine interleukin 3-dependent cell line. *J Immunol* 137:854, 1986.
17. Lotem J, Lipton JH, Sachs L: Separation of different molecular forms of macrophage- and granulocyte-inducing proteins for normal and leukemic myeloid cells. *Int J Cancer* 25:763, 1980.
 18. Sachs L: Regulatory proteins for growth and differentiation in normal and leukemic hematopoietic cells: Normal differentiation and the uncoupling of controls in myeloid leukemia. In: Ford RJ, Meizel AL (eds) *Mediators in cell growth and differentiation*. New York: Raven Press, p 341, 1985.
 19. Warren MK, Ralph P: Macrophage growth factor CSF-1 stimulates human monocyte production of interferon, tumor necrosis factor, and myeloid CSF. *J Immunol* 137:2281, 1986.
 20. Gery I, Gershon RK, Wakeman BH: Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. *J Exp Med* 136:120, 1972.
 21. Leibovich SJ: Production of macrophage-dependent fibroblast-stimulating activity (M-FSA) by murine macrophages: Effects on BALBc 3T3 fibroblasts. *Exp Cell Res* 113:47, 1978.
 22. McCall E, Bagby GC: Monocyte-derived recruiting activity: Kinetics of production and effects of endotoxin. *Blood* 65:689, 1985.
 23. Sharma S, Dogde W: Induction of colony-stimulating factor from quiescent fibroblasts by avian macrophage and monocytic leukemic cells. *Leuk Res* 2:1507, 1985.
 24. Fibbe WE, van Namme J, Billiau A, Voogt PJ, Duinkerken N, Kluck PMC, Falkenburg JHF: Interleukin-1 (22-K factor) induces release of granulocyte-macrophage colony-stimulating activity from human mononuclear phagocytes. *Blood* 68:1316, 1986.
 25. Lovhaug B, Pelus LB, Nordlie EM, Boyum A, Moore MAS: Monocyte-conditioned medium and interleukin 1 induce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production in the adherent cell layer of murine bone marrow cultures. *Exp Hematol* 14:1037, 1986.
 26. Calcagno M, Perez JB, Waldo NG, Cabrera S, Weiss B: Evidence of the existence of a factor that induces Fc receptors on bone marrow cells. *Blood* 59:756, 1982.
 27. Sullivan R, Lipkin EW, Bell R, Larsen NE, McCarroll LH: The kinetics of the production of granulocyte-macrophage colony stimulating activity (GM-CSA) by isolated human monocytes: Response to bacterial endotoxin. *Prog Clin Biol Res* 104:173, 1985.
 28. Old LJ: Polypeptide mediator network: Tumor necrosis factor. *Nature* 326:330, 1987.
 29. Nathan CF: Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79:319, 1987.
 30. Le J, Vilcek J: Biology of disease. Tumor necrosis factor and interleukin 1: Cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 57:234, 1987.
 31. Tocci MJ, Hutchinson NJ, Cameron PM, Kirk KE, Norman DJ, Chin J, Rupp EA, Limjoco GA, Bonilla-Aranda VM, Schmidt JA: Expression in *Escherichia coli* of fully active

- recombinant human IL 1 : comparison with native human IL 1. *J Immunol* 138:1109, 1987.
32. Calcagno N, Rice B, Fraga A, Arciga MA, Cabrera G, Torres R, Weiss B: Evidence of the existence of a factor that induces C3 receptors on bone marrow cells. *Blood* 61:403, 1983.
 33. Burgess AW, Metcalf D, Sparrow LG, Simpson RJ, Nice EC: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from mouse lung conditioned medium. Purification of multiple forms and radioiodination. *Biochem J* 235:805, 1986.
 34. Welte K, Bonilla MA, Gillio AP, Boone TC, Potter GK, Gabrilove JL, Moore MAS, O'Reilly RJ, Souza LM: Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Effects on hematopoiesis in normal and cyclophosphamide-treated primates. *J Exp Med* 165:241, 1987.
 35. Broxmeyer HE, Williams DE, Cooper S, Waheed A, Shadduck RK: The influence *in vivo* of murine colony-stimulating factor-1 on myeloid progenitor cells in mice recovering from sublethal dosages of cyclophosphamide. *Blood* 69:913, 1987.
 36. Ishizaka Y, Motoyoshi K, Hatake K, Saito M, Takaku F: Mode of action of human urinary colony-stimulating factor. *Exp Hematol* 14:1, 1986.
 37. Metcalf D, Nicols MA: Synthesis by mouse peritoneal cells of G-CSF, the differentiation inducer for myeloid leukemia cells: Stimulation by endotoxin, M-CSF and multi-CSF. *Leuk Res* 9:35, 1985.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Mario Calcagno and Dr. Guillermo Mendoza for help in the biochemistry techniques, and Raulfo Pedraza and Jose G. Chavarria for excellent technical assistance. This work was supported in part by the DAFRNU of CONACyT, Departamento de Becas.



NEW YORK MEDICAL COLLEGE

Basic Science Bldg.
111th St., New York 10095
Tel: 993 4025

DEPARTMENT OF ANATOMY

April 6, 1988

Dr. Benny Weiss-Steider
FNEP-Zaragoza, UNAM
Apartado Postal 9-020, Mexico 15000
D.F., Mexico

Dear Dr. Weiss-Steider:

This is to acknowledge receipt of your manuscript entitled, "Evidences that fibroblasts and epithelial cells produce a specific type of macrophage and granulocyte inducer (MGI),...on macrophages" to be published in the Annals of the New York Academy of Sciences. If anything additional is needed, I'll be in touch.

My best regards.

Sincerely,

Donald Orlic, Ph.D.
Professor and Acting Chairman

DO/wsl

Title: Evidences that fibroblasts and epithelial cells produce a specific type of macrophage and granulocyte inducer (MGI), also known as colony stimulating factor (CSF), and that monocyte-macrophages can produce another factor with proliferative inducing activity on myeloid cells and differentiative activity on macrophages.

By: Isaac R. Zembrano, Julio R. Caceres, Jorge F. Mendoza, Edelmir Santiago, Lourdes M. Mora, Maria E. Morales, Maria T. Correns and Benny Weiss-Steider.

From: Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza, Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer, UNAM, Mexico D.F.

Correspondence address: Dr. Benny Weiss, ENEP-Zaragoza, UNAM .
Apartado Postal 9-020, Mexico 15000
D.F., Mexico.
Tel: 792-32-88 ext. 239.

Abstract

Molecules with the property to induce proliferation of bone marrow cells in liquid cultures, and with colony stimulating activity, were found on media conditioned (MC) by lung fibroblasts and kidney epithelial cells. These factors presented an apparent mol wts of 70 000 and 22 000 d respectively. Also when MC by epithelial cells from lungs was tested for the induction of proliferation of bone marrow cells a molecule with 22 000 d was detected. These molecules are thought to be CSF because they induce colony formation, and they are also similar in mol wt to two of the already known CSF. In fact the SM-CSF obtained from endotoxic lungs with a large epithelial cell content has a mol wt of 22 000 d, and the CSF-1 produced by a fibroblast cell line has 70 000. When the MC by fibroblast was used to induce bone marrow cells to proliferate, three new molecules with colony stimulating activity were secreted. These molecules with apparent mol wts of 45 000, 30 000 and 17 000 d were also found in the MC by bone marrow cells when induced to proliferate with MC by epithelial cells. When the 45 000 d molecule was used to induce bone marrow cells to proliferate, once again the 30 000 and the 17 000 d molecules were secreted. Evidence is also provided that the 45 000 d molecule is produced by the monocyte-macrophage cells, and that it can induce Fc receptors on resident and elicited peritoneal macrophages. The possibility that the production of CSF is cell specific is discussed together with two models to explain the way in which these molecules can participate as proliferative (MGI-1) and differentiative (MGI-2) function in normal myeloid cell differentiation. Finally a new terminology is proposed to classify this family of molecules.

Introduction

Since the discovery of an assay to measure the factor responsible for the proliferation of myeloid precursors 23 years ago by the group of Leo Sachs (1), a powerful tool for *in vitro* research was made available to study the mechanisms of myeloid cell differentiation. Even though this group was the first to report the formation of colonies from hematopoietic precursors using a double semisolid culture media (1) was the group of Donald Metcalf (2) that one year later by using a similar culture system but with bone marrow cells instead of spleen cells, established the basis for the assays that have been in use all these years to study the differentiation of granulocytes and macrophages. It was this last group that coined several years later the name colony stimulating factor (CSF) (3) for the molecule responsible for this property. Even though 2 years later the Sachs group named the same factor macrophage and granulocyte inducer (MGI) (4), and another group colony stimulating activity (CSA) (5), the term CSF is the most widely accepted, and the majority of the work done in this area uses this name (6-20).

The MGI school postulates the existence of a family of proliferation inducing molecules called MGI-1, and another with differentiation properties called MGI-2 produced by the cells in response to MGI-1 (21-23). On the other hand the CSF school maintains that hematopoiesis is regulated by a limited series of growth factors which are progressively restricted in their biological activities and target cells (24-27). It is important to mention that the best known CSFs (CSF-1, GM-CSF and multi-CSF) were originally produced from cells that do not belong to the myeloid compartment, and that on the other hand the differentiating molecules MGI-2 were obtained strictly from proliferating myeloid cells. Thus we think there is some ground to suppose that the proliferation of the myeloid cells is controlled by cells from outside the myeloid compartment, while the differentiation is autoregulated by the cells themselves.

In this work we have attempted to provide evidences by using liquid cultures, that there are cell specific CSFs produced by non myeloid cells (one from fibroblasts and another one from epithelial cells) which are excellent proliferative factors, while there is at least one CSF molecule produced by the myeloid cells themselves (from macrophages), with strong differentiative capabilities. For these purposes we have produced conditioned media from fibroblasts, from epithelial cells and from bone marrow cells activated for proliferation, and determine by gel chromatography the molecular weights of the different proliferative factors. The differentiation inducing property was evaluated by determining the induction of Fc receptors on resident and induced peritoneal macrophages.

Materials and Methods

Mice. Mice of either sex, strain CD-1, were used at 7-10 days of age as donors of lungs and kidneys, and at 4-8 weeks as donors of fibroblasts, epithelial cells, resident and induced macrophages and bone marrow cells.

Cell culture. All the cells were cultured under a 10% CO₂ atmosphere, at 37 °C and with 95% relative humidity in minimal essential medium (MEM) (Gibco Labs., Grand Island, NY) supplemented with either 10% fetal bovine serum (FBS) (MicroLab, Mexico), or horse serum (HS) (MicroLab) previously inactivated at 56 °C for 30 min. Streptomycin 100 µg/ml, penicillin 6 100 U/ml, and sodium bicarbonate 3.7 g/liter were added to the MEM before culture. All the cultures were done using 60 x 15 mm tissue culture dishes with a final volume of 5 ml.

Cells. Lung fibroblasts were obtained after an enzymatic dispersion with 0.05% of collagenase type IV in a phosphate-buffered saline solution (PBS) at 37 °C. On the other hand to obtain epithelial cells from kidneys and lungs, the organs were subjected to enzymatic dispersion with 0.25% of crude trypsin from pig pancreas, in PBS at room temperature. Finally the cells were always resuspended in culture media containing FBS.

To obtain resident macrophages from the peritoneal cavity, the mice were sacrificed and the cells removed by flushing the cavity with 10 ml of PBS. This operation was repeated two more times with 5 ml of PBS to recover as many cells as possible. The cells were then washed three times with PBS at 500 g for 5 min, and finally 8x10⁶ cells were seeded in culture media containing HS.

To obtain induced macrophages from the peritoneal cavity, the mice were injected ip with 3 ml of sodium caseinate (Difco Labs., Detroit, MI) at 10% in PBS. After 4 days the animals were sacrificed and the peritoneal exudates recovered by flushing the cavity with 20 ml of PBS. The cells were washed three times and 8x10⁶ cells seeded with culture media. In order to enrich the macrophage populations, the cells were incubated for 1 h at 37 °C, followed by the removal of those cells that did not adhere to the culture substrate. Subsequently was added culture medium containing HS.

Conditioned media. The sources for the CSF's were the media conditioned (CM) by the different cell types employed. CSF from fibroblasts and epithelial cells were produced by cultures in their second passages, either by seeding 2.7 x 10⁶ lung fibroblasts and collecting the CM after 12 days, or 3 x 10⁶ lung epithelial cells also after 12 days, or 1.5 x 10⁶ kidney epithelial cells after 11 days. The media conditioned by 8 x 10⁶ bone marrow cells stimulated with 2 ml of either the CM from fibroblasts or epithelial cells, as a source of CSF, were collected after 4 days in culture. All the CM were stored at -20 °C until use.

Gel chromatography. A total of 2 ml of CM from either fibroblasts, epithelial cells or from bone marrow cells, were chromatographed in Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) in a 2.5 x 90 cm column, and eluted with 75 mM Tris - HCl buffer, pH 7.7, at 4 C and with a flow rate of 4 cm/h. Fractions of 5.5 ml were collected and stored at -20 IC until use. Transferrin, ovalbumin, myoglobin, half hemoglobin and cytochrome C were used as external standards. For the biological assays, aliquots of 0.5 ml from each fraction were employed.

CSF assay. For the colony stimulation assay the double agar layer technic was employed (1). Briefly, in a 30 x 15 mm Petri dish a first layer with 0.6% of agar was added with the medium to be tested, and a second layer with 0.3% of agar was overlaid with approximately 5×10^5 bone marrow cells. After 7 days of incubation, all the colonies with more than 20 cells were counted using an inverted microscope.

Cell proliferation assay in liquid cultures. For the cell proliferation assay the liquid culture technic was employed. Briefly, in a 35 x 10 mm Petri dish 0.25 ml of the medium to be tested was added with approximately 5×10^5 bone marrow cells and 10% of FS. After 4 days of incubation, the number of cells was evaluated in each culture by means of a hemocytometer.

Assay for Fc receptors. The Fc receptors were measured by the rosette technic (28). Briefly, IgG against sheep red blood cells (SRBC) (Cordin, Labs., Miami Fla.) was diluted 1:1600 in FRS and mixed with a nonagglutinating concentration of SRBC previously washed in FRS and incubated at 37 IC for 30 min. The erythrocytes coated with antibody (EA) were washed three more times in FRS to get rid of free IgG and stored in FRS for a maximum of 4 days at 4 IC until used in the Fc receptor assay. The cells to be tested for Fc receptors were resident and elicited peritoneal macrophages that were cultured during 4 days with and without the test media. For the assay 1 ml of EA was added to the culture dishes diluted 1:1 with FRS, and incubated during 30 min at 37 IC, finally the nonattached erythrocytes were removed and the dishes fixed and dyed with May Greenwald-Giemsa. The percentage of rosettes was evaluated by determining the macrophages with more than 4 erythrocytes attached to them. A minimum of 300 cells were counted for each determination.

Miscellaneous. The results are the averages of duplicates of two independent assays, that did not depart more than 15% from each other. A culture without CM was always added as control. All the chemicals were from Sigma Chemical Co unless otherwise specified.

Results

Production of proliferation factors for myeloid cells by epithelial cells and fibroblasts

Conditioned media (CM) from cultures of kidney epithelial cells and from lung fibroblasts, were chromatographed and the different fractions evaluated for myeloid cell proliferation and colony stimulating activity. Half a milliliter of each fraction was employed either to activate proliferation in liquid cultures of 5×10^5 bone marrow cells during 4 days, or to induce colony formation in 5×10^5 during 7 days. When using epithelial cells CM we obtained for both activities a single peak that corresponded to a mol wt of 22 000 d (Fig 1), while for the fibroblasts CM another single peak of 70 000 d (Fig 2). Taking into consideration that until today there have been no reports in the scientific literature of indirect CSF inducing agents with these mol wts, that on the other hand there are other well known CSFs with mol wts of 70 000 d and 22 000 d (CSF-1 and GM-CSF) (6, 27), and that the 70 000 d molecule is known to be produced by a fibroblast cell line, we think that the colony stimulating activities measured in this work represent true CSFs. In order to determine if the 22 000 d CSF molecule found in the CM of epithelial cells from the kidneys is also produced by similar cells from other organs, we evaluated the presence of a proliferative activity in a CM obtained from epithelial cells from lungs. Using the same methods we found a single peak of activity with 22 000 d (Fig 3).

Production of proliferation factors by bone marrow cells induced by CM containing CSF from fibroblasts and epithelial cells

Once that we have determined that fibroblasts and epithelial cells can secrete specific CSFs, we used CM containing these molecules to evaluate whether bone marrow cells could be induced to secrete new proliferating molecules. For this purpose we induced for proliferation 8×10^5 bone marrow cells with 2.0 ml of each CM, and after 4 days in culture we collected the new CM. We found 4 peaks with proliferative activity in the chromatographic fractions from the CM of the bone marrow cells that were induced by fibroblast CM. Once again the proliferation inducing activity also corresponded in mol wt to the peaks with colony stimulating activity (Fig 4). Apart from the 70 000 d peak similar in mol wt to the fibroblasts CSF we obtained three new ones, with 45 000, 30 000 and 17 000 d respectively. Taking into consideration that we have previously found that a macrophage cell line produces a CSF with 45 000 d (29), that alveolar and peritoneal macrophages are known to produce a CSF with a similar mol wt (30), and that fibroblast CSF is known to induce monocyte-macrophage proliferation, we think that this 45 000 d molecule was secreted by the proliferating monocytes in the bone marrow cultures. We do not know at this stage whether the 30 000 and the 17 000 d molecules represent true CSFs molecules, or if they are factors that could have been induced indirectly. In fact there is a 17 000

d molecule known as IL-1 (31), that is secreted by macrophages (32), and can induce the secretion of CSF (33-35).

When under similar experimental conditions epithelial cell CM was used as an activator for bone marrow cell proliferation, we obtained three peaks of activity (Fig 5). Once again the 45 000, the 30 000 and the 17 000 d molecules were present with both a proliferative and a colony stimulating activity.

Production of proliferating factors by bone marrow cultures induced by the 45 000 d proliferating and colony stimulating factor.

In order to determine whether all the three new peaks of proliferative and colony stimulating activities found in bone marrow cultures were induced by fibroblasts CSF (MGI-1), or by the 45 000 d molecule (MGI-2) induced by the 70 000 d containing fibroblast CM, we proceeded to activate bone marrow cells to proliferate by 0.5 ml of a pool of the fractions containing the 45 000 d molecule (Fig 6) during 5 days in culture. When evaluating the presence of new proliferating and colony stimulating activities in the chromatographed fractions of this new CM, we found apart from the 45 000 d peak the 30 000 and 17 000 d ones. Thus we interpret that the 45 000 d molecule is the inducer of those new molecules.

The 45 000 proliferative and colony stimulating activity induces the expression of Fc receptors on resident and elicited peritoneal macrophages

In order to determine if the 45 000 d molecule could represent a true MGI-2 molecule, that is with strong differentiating properties, we evaluated the property of inducing Fc receptor expression by adding 0.5 ml of the 45 000 d fraction pool to either 1 x 10 elicited or resident peritoneal macrophages during 4 days in culture. We obtained that both groups of macrophages were strongly induced for Fc receptor expression (Table 1). Thus our results provide evidences that the 45 000 d molecule has aside from a proliferative activity a strong differentiative one.

Discussion

Two different phenomena have to occur in order to maintain a continuous supply of mature blood cells. First there has to be a mechanism that assures the existence of sufficient numbers of a particular cell type, and second a mechanism for the differentiation of these cells into functional ones. In fact taking into consideration that proliferation of precursor cells goes simultaneously with their maturation, in such a way that in normal cells the more the maturation level achieved the less the proliferative capabilities, then we can expect that these two mechanisms are simultaneously regulated. In consequence proliferation has to be linked to differentiation, because proliferation without differentiation would give rise to leukemia, while differentiation without proliferation would give rise to anemia.

We can think of two mechanisms by which differentiation could be linked to proliferation. First, that the proliferating or mitogenic inducing factors induce the expression of receptors to differentiation factors, thus making the cells susceptible to respond to exogenous regulatory molecules for the expression of mature properties. And second, that proliferation induces the production of endogenous factors that in turn induce the cell to present a mature phenotype.

We consider that there are nowadays two main schools of thought that have provided considerable data to support each one of the ideas in regards to the way in which proliferation could be linked to the differentiation of granulocyte and macrophages. The MGI school maintains that endogenous factors (MGI-2) are produced in response to exogenous mitogenic factors (MGI-1) that are responsible for cell differentiation (21-23). On the other hand the CSF school affirms that four different exogenous factors (Multi-CSF, GM-CSF, CSF-1 and G-CSF) control the proliferation and differentiation of these blood cells, depending on a programmed expression of membrane receptors to each one of them (24). Regardless of the fact of whether the MGI or CSF school turn to be correct or if they complement each other, we think that a consensus has to be obtained to assign names to these, and all the other hematopoietic factors. First in regards to the CSF nomenclature we have to take into consideration that there are many other factors that also induce the formation of hematologic colonies in vitro, like erythropoietin (25), interleukin 2 (37), interleukin 3 (25), and megakaryopoietin (38), and that there is no clear evidence that there is colony formation in vivo. In fact as shown in this work the proliferative capabilities of CSF can also be measured in liquid cultures where there is obviously no colony formation. On the other hand and as far as the MGI terminology is concerned, there is strong evidence that one type of hemopoietic factor, once thought to be specific for one cell type, can contribute to the differentiation and proliferation of

another one. Thus we feel that there is need to redefine terms by employing a more uniform nomenclature. There is a terminology using the interleukin nomenclature that does not offer a solution to this problem, because obviously it does not account for the proliferating and differentiation factors that are produced by other cell types aside from leukocytes.

In this work we have attempted to provide some evidences that the CSFs are cell specific. That one cell type is capable of producing and secreting only one type of CSF, and different from the one produced by another cell type. We think that under certain circumstances the cells could be induce to produce other factors, but that under normal physiological conditions the majority of the CSF production is of one type. We have provided evidences that fibroblasts from different organs secrete a 70 000 d CSF molecule similar in mol wt to the already known CSF-1 also from a fibroblasts cell line (6). We have also shown that epithelial cells from different organs produce a CSF with 22 000 d similar in mol wt to the known GM-CSF (27). Finally evidence is provided that monocytes produce a 45 000 d CSF molecule similar in mol wt to the already known molecule from a macrophage cell line (29) from peritoneal and alveolar macrophages (30), and from human monocytes (39). Throughout this work we have stated that our molecules were similar in mol wt and not identical to the already existing CSFs, because we have not make cross experiments with antibodies to the already existing factors to prove identity.

We feel that liquid cultures should be more extensively used to complement the data of colony formation, to evaluate aside from an indication of colony forming units, the proliferating and differentiating inducing properties of the different factors. We have previously shown (29) that CSF can induce colony formation on bone marrow cells but was unable to induce the expression of Fc receptors, a mature cell property, while another factor was capable of inducing Fc receptors and not colony formation. Thus we think that there is a family of molecules some, with proliferative properties while other with differentiative ones that contribute to the production of functional mature blood cells. In this work we have shown that differentiative factors can be produced by cells in response to proliferative ones, and provided evidences that this is an endogenous phenomena in accordance with the MGI-2 theory. It has to be mentioned that MGI-2 has been associated with G-CSF (40), thus if the 45 000 d molecule described in this work is a true monocyte-macrophage secreted CSF, we can speculate that macrophages secrete under the action of exogenous mitogens (CSF-1 or GM-CSF), endogenous factors that are aside from mitogens to other cell types also strong autodifferentiating ones (Figure 7). Even though we have shown that the 45 000 d molecule induces cell proliferation and the secretion by bone marrow cells of other colony stimulating activities, we do not know at this stage the target cells for all these factors, or whether the induced colony stimulating activities represent true CSFs, or if they are the product of indirect inducing mechanisms like the one associated with IL-1. Thus we do not know if there is a chain reaction in

which one exogenous mitogen induces the appearance of an endogenous mitogen on another cell type (Figure 8), or if this secondary molecule only contributes to the proliferation and differentiation of the cell that produces it (Figure 7).

If the hypothesis presented in this work concerning the specificity of CSF production by cell types is correct, then we can offer an alternative for the nomenclature of this family of molecules. We propose that the name be associated to the cell that produces the factor and not to the target cell. Thus proliferating and differentiating factors would be classified according to their origin and not to their different functions. Finally we would like to mention that even though the myeloid precursors are the targets for fibroblast and epithelial produced CSF we do not know if they act on the same cells or in different subgroups of myeloid precursors. Obviously much work would have to be done to prove the evidences discussed here, but we think that they offer an alternative explanation for what is known on the mechanisms involved in myeloid cell differentiation.

Legends to Figures.

- FIGURE 1. Elution profile of the media conditioned by kidney epithelial cells. Colony formation on bone marrow cells (). Proliferation of bone marrow cells in liquid cultures ().
- FIGURE 2. Elution profile of the media conditioned by lung fibroblasts. Colony formation on bone marrow cells (). Proliferation of bone marrow cells in liquid cultures ().
- FIGURE 3. Elution profile of the media conditioned by lung epithelial cells. Proliferation of bone marrow cells in liquid cultures ().
- FIGURE 4. Elution profile of the media conditioned by bone marrow cells induced by the media conditioned by cultures of lung fibroblast. Colony formation on bone marrow cells (). Proliferation of bone marrow cells in liquid cultures (). The 45 000 d pool was taken from the fractions represented by the shaded area.
- FIGURE 5. Elution profile of the media conditioned by bone marrow cells induced by the media conditioned by cultures of kidney epithelial cells. Proliferation of bone marrow cells in liquid cultures ().
- FIGURE 6. Elution profile of the media conditioned by bone marrow cells induced by the pooled fractions containing the 45 000 d peak. Proliferation of bone marrow cells in liquid cultures ().
- FIGURE 7. Model representing a chain reaction in which the CSF produced by either fibroblasts or epithelial cells (MGI-1) can induce a myeloid precursor to produce another CSF (MGI-2) with proliferative and auto-differentiative inducing properties.
- FIGURE 8. Model representing a system in which the CSF produced by either fibroblasts or epithelial cells (MGI-1) can induce several myeloid precursors to produce other CSF (MGI-2) with auto-differentiative inducing properties.

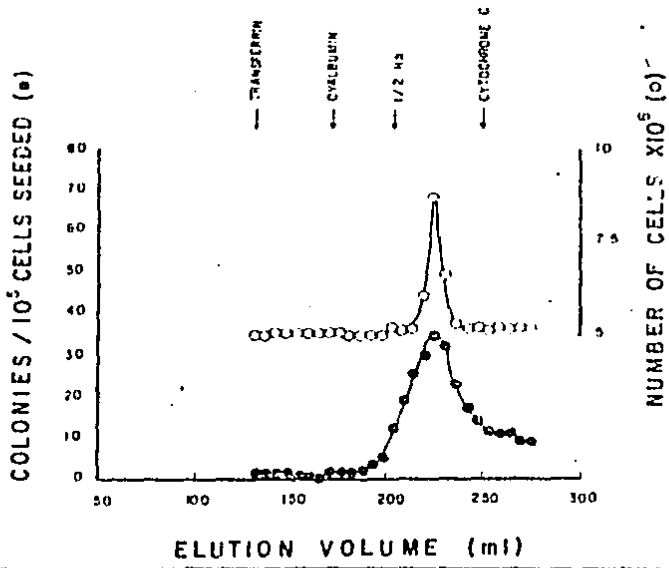


FIGURE 1.

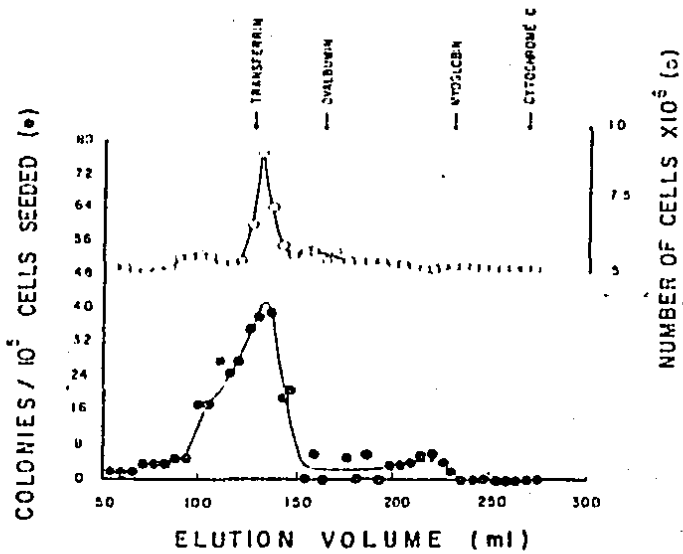


FIGURE 2.

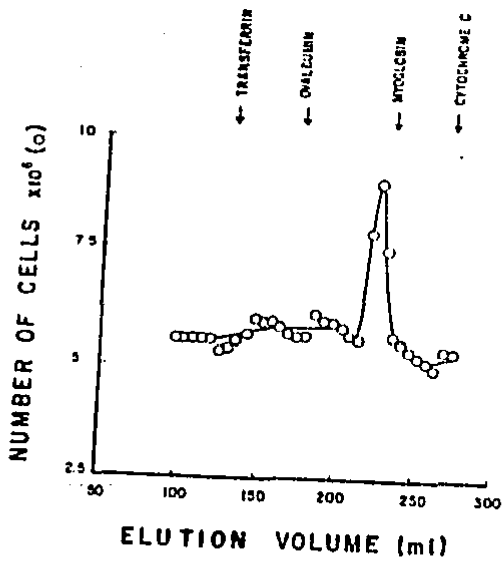


FIGURE 3.

ESTA TESIS NO DEBE
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

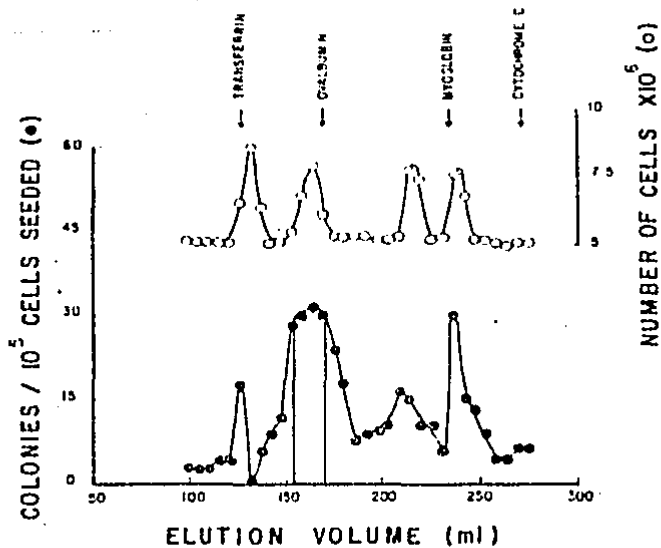


FIGURE 4

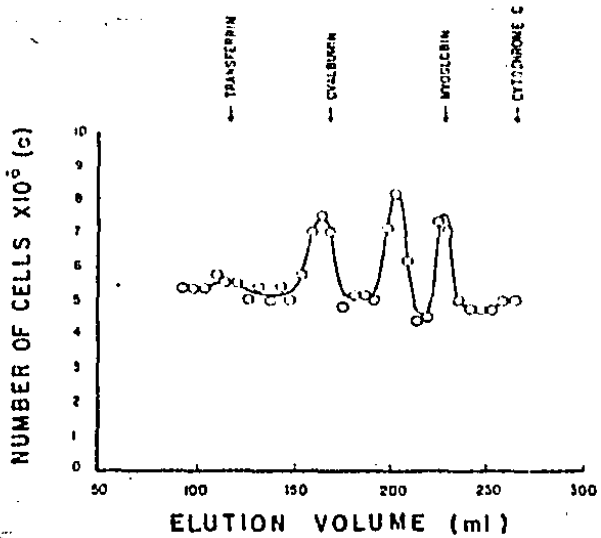


FIGURE 5.

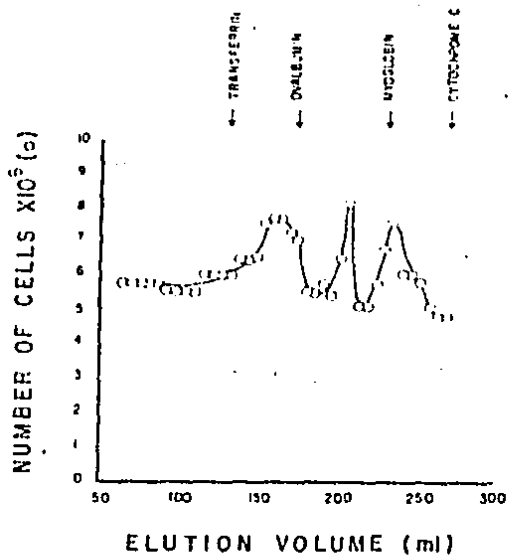


FIGURE 6.

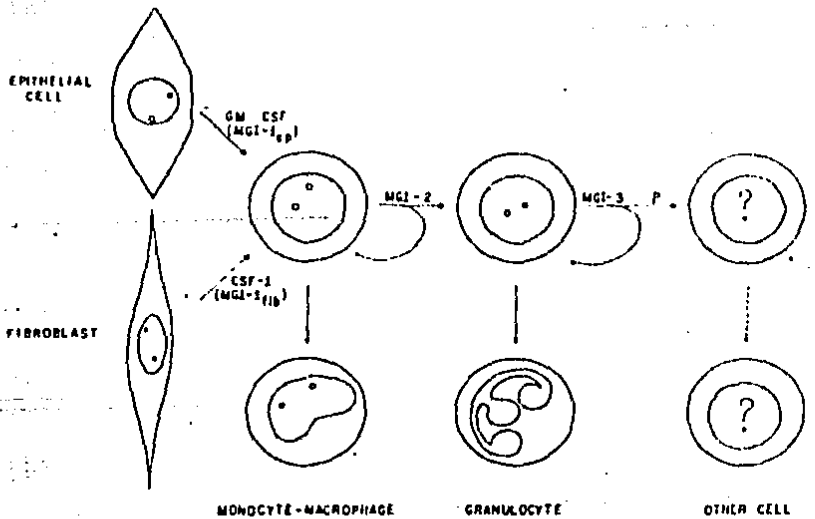


FIGURE 7.

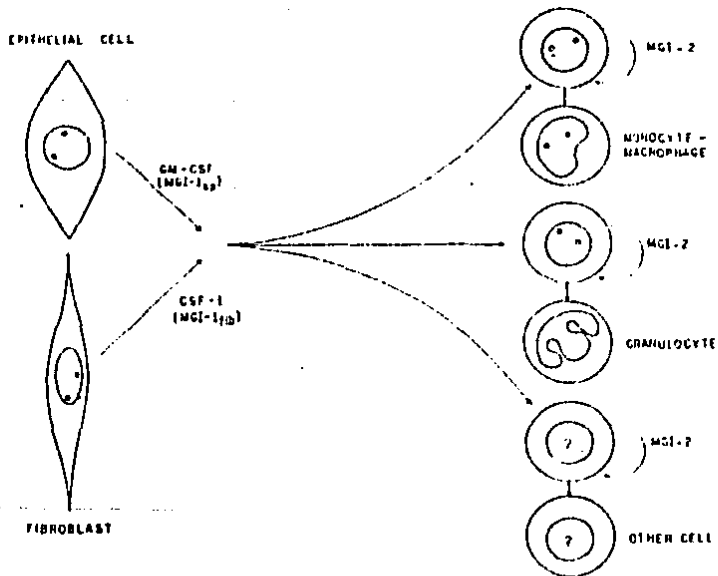


FIGURE 8.

References.

1. Fluznik, D.H. & L. Sachs. 1965. The cloning of normal mast cells in tissue culture. *J. Cell Comp. Physiol.* 66:319-324.
2. Bresley, T. R. & B. Metcalf. 1966. The growth of mouse bone marrow cells *in vitro*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 44:287-299.
3. Metcalf, D., M. A. G. Moore & N. L. Warner. 1969. Colony formation *in vitro* by myelomonocytic leukemic cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 43:983-1001.
4. Landsu, T. & L. Sachs. 1971. Characterization of the inducer required for the development of macrophage and granulocyte colonies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68:2540-2544.
5. Austin, P. E., E. A. McCulloch & J. E. Till. 1971. Characterization of the factor in L-cell conditioned medium capable of stimulating colony formation by mouse bone marrow cells in culture. *J. Cell. Physiol.* 77:121-134.
6. Burgess, A. W., J. Comskaris & B. Metcalf. 1977. Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung conditioned medium. *J. Biol. Chem.* 252 (6):1988-2003.
7. Gough, N. M., J. Gough, D. Metcalf, A. Keise, D. Seill, N. A. Nicola, A. W. Burgess & A. F. Dunn. 1984. Molecular cloning of cDNA encoding a murine haemopoietic growth regulator, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Nature*, 309 (5970):763-767.
8. Stanley, E. R. & L. J. Guilbert. 1981. Methods for the purification assay, characterization and target cell binding of a colony stimulating factor (CSF-1). *J. Immunol. Methods*, 42 (3):253-284.
9. Gasson, J. L., R. H. Weiskopf, S. E. Kaufman, S. C. Clark, B. M. Hawich, G. G. Wong & W. Golde. 1984. Purified human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Direct action on neutrophils. *Science*, 226 (4680):1339-1342.
10. Kawasaki, E. S., M. R. Ledner, A. M. Wang, J. van Arsdale, M. K. Warren, M. Y. Coyne, D. L. Schwickart, M. Lee, K. J. Wilson, A. Boocman, E. R. Stanley, P. Ralph & D. F. Mark. 1985. Molecular cloning of a complementary DNA encoding human macrophage-specific colony-stimulating factor (CSF-1). *Science*, 230 (4723):291-296.
11. DeLamarter, J. F., J. J. Mermod, C. M. Liang, S. F. Eliason & D. Thatcher. 1985. Recombinant murine GM-CSF from *E. coli* has biological activity and is neutralized by a specific antiserum. *EMBO J.* 4 (10):2575-2578.
12. Metcalf, D. & N. A. Nicola. 1983. Proliferative effects of purified granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on normal mouse hemopoietic cells. *J. Cell. Physiol.* 116:198-206.
13. Waheed, A. & R. K. Sheddack. 1979. Purification and properties of L-cell-derived colony-stimulating factor. *J. Lab. Clin. Med.* 74 (1):180-189.
14. Sheddack, R. K., G. Figoli, C. Caramatti, G. Dugliontoni, V. Riczoli, A. Porcellini, A. Waheed & L. Schiffer. 1983. Identification of hemopoietic cells responsive to colony-stimulating factor by autoradiography. *Blood*, 62 (6):1197-1202.
15. Donshue, R. E., E. A. Wang, D. K. Stone, R. Kamen, G. G. Wong, P. K. Sehgal, G. G. Nathan & S. C. Clark. 1986. Stimulation of haemopoiesis in primates by continuous infusion of recombinant

- human GM-CSF. *Nature*. 321(6073):872-875.
16. Tsuda, H., L. M. Neckers & D. H. Pluznik. 1986. Colony stimulating factor-induced differentiation of murine M1 myeloid leukemia cells is permissive in early G1 phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83(12):4317-4321.
 17. Le Beau, M. M., C. A. Westhrook, M. G. Diaz, R. A. Larson, J. B. Rowley, J. C. Gasson, D. W. Golde & C. J. Sherr. 1986. Evidence for the involvement of GM-CSF and FMS in the deletion (5q) in myeloid disorders. *Science*. 231(4741):984-987.
 18. Donahue, R. E., S. G. Emerson, E. A. Wang, S. G. Wang, S. C. Clark & G. Nathan. 1985. Demonstration of burst-promoting activity of recombinant human GM-CSF on circulating erythroid progenitors using an assay involving the delayed addition of erythropoietin. *Blood*. 66(6):1476-1481.
 19. Wang, S. Y., H. Castro-Malaspina, L. Lu & H. A. Moore. 1985. Biological characterization of a granulopoietic enhancing activity derived from cultured human lipid-containing macrophages. *Blood*. 65(7):1181-1190.
 20. Ruzzenbary, F. J., J. N. Ihle & E. McGrath. 1985. The effect of interleukin 3 and GM-CSF-2 on megakaryocyte and myeloid clonal colony formation. *Blood*. 65(1):214-217.
 21. 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 (10):5152-5156.
 22. Symonds, G. & L. Sachs. 1983. Synchrony of gene expression and the differentiation of myeloid leukemic cells: reversion from constitutive to inducible protein synthesis. *EMBO J.* 2 (5):663-667.
 23. Lotem, J. & L. Sachs. 1982. Mechanism that uncouple growth and differentiation in myeloid leukemia: Restoration of requirement for normal growth-inducing protein without restoring induction of differentiation-inducing protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79 (14):4347-4351.
 24. Metcalf, D. 1986. Review. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 62(2):257-267.
 25. Ihle, J. N., J. Keller, L. Henderson, F. Klein & E. W. Palaszynski. 1982. Procedures for the purification of interleukin 3 to homogeneity. *J. Immunol.* 129 (6):2431-2436.
 26. Stanley, E. R. & Howard P. M. 1977. Factors regulating macrophage production and growth: Purification and some properties of colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells. *J. Biol. Chem.* 252(12):4305-4312.
 27. Sparrow, L. G., D. Metcalf, M.W. Hunkapiller, L.E. Hood & A. W. Burgess. 1985. Purification and partial amino acid sequence of avian murine granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82 (2):292-296.
 28. Bianco, C., R. Patrick & V. Nussenzweig. 1970. A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody complement complexes. I. Separation and characterization. *J. Exp. Med.* 132 (4):702-720.
 29. Calcagno, M., J. R. Foray, M.G. Waldo, C. Cabrera & B. Weiss Steider. 1982. Evidence of the existence of a factor that induces

- Fc receptors on bone marrow cells. *Blood*, 59(4):756-760.
30. Lotem, J., J. H. Lipton & L. Sachs. 1980. Separation of different molecular forms of macrophage and granulocyte inducing proteins for normal and leukemic myeloid cells. *Int. J. Cancer*, 25 (4):743-771.
31. Tocci, M. J., N. I. Hutchinson, F. M. Cameron, K. E. Kirk, D. J. Norman, J. Chin, E.A. Rupp, G.A. Limjoco, J. M. B. Argudo & J. A. Schmidt. 1987. Expression in *Escherichia coli* of fully active recombinant human IL 1 beta. Comparison with native human IL 1 beta. *J. Immunol.* 138(4): 1109-1114.
32. Nathan, C. F. 1987. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79 (3):319-326.
33. Tsebo, K. M., U. M. Yuchankoff, S. Schiffer, D. Cheng, E. McCall, C.A. Dinarello, M.A. Brown, B. Albrock & G. C. Bagby. 1988. Vascular endothelial cell and granulopoiesis: Interleukin-1 stimulates release of G-CSF and GM-CSF. *Blood*, 71(1):99-103.
34. Segal, G. M., E. McCall, T. Stueve & G. C. Bagby. 1987. Interleukin-1 stimulates endothelial cell to release multilineage human colony-stimulating activity. *J. Immunol.* 138 (5):1772-1778.
35. Seiff, C. A., S. Tsai & B. V. Faller. 1987. Interleukin-1 induced cultured human endothelial cell production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J. Clin. Invest.* 79(1):48-51.
36. Donahue, R. E., S. G. Emerson, E. A. Wang, G. S. Wong, S. C. Clark & D. G. Nathan. 1985. Demonstration of burst-promoting activity of recombinant human GM-CSF on circulating erythroid progenitors using an assay involving the delayed addition of erythropoietin. *Blood*, 66 (6):1479-1481.
37. Jourdan, M., T. Conner & R. Klein. 1985. Control of human T-colony by interleukin-2. *Immunology*, 54 (3):249-253.
38. Hoffman, R., H. B. Yang, E. Remo & J. E. Straneva. 1985. Purification and partial characterization of a megakaryocyte colony-stimulating factor from human plasma. *J. Clin. Invest.* 74(4):1174-1182.
39. Sullivan, R., F. W. Lipkin, R. Bell, M. E. Larsen & L. A. McCarrroll. 1985. The kinetics of the production of granulocyte-monocyte colony-stimulating activity (GM-CSA) by isolated human monocytes: Response to bacterial endotoxin. *Prog. Clin. Biol. Res.* 184:173-187.
40. Dexter, T. M. 1984. Blood cell development: The message in the medium. *Nature*, 309(28):746-747.

Acknowledgments

We thank Dr. Mario Calceño and Dr. Guillermo Mendoza for help in the biochemistry techniques, and Ranulfo Pedraza and Jose G. Chavarria for excellent technical assistance. This work was supported in part by the DAFRHU of CONACyT, Departamento de Recos.