

21
2 ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
" ZARAGOZA "

EFECTO DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO
HEMATOPOYETICO rhIL-1, rhIL-2, rhGM-CSF Y
rhG-CSF EN LA PROLIFERACION Y DIFEREN-
CIACION DE CELULAS DE PACIENTES CON
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA Y EN DOS
LINEAS LEUCEMICAS DE RATON.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
B I O L O G O
P R E S E N T A :
REBECA LOPEZ MARURE



México, D. F.

1990.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

RESUMEN	1
OBJETIVOS	2
INTRODUCCION	3
MARCO TEORICO	
Hematopoyesis	6
Células tallo hematopoyéticas pluripotenciales	7
El sistema hematopoyético	8
Sistemas para el estudio <u>in vitro</u> de la hematopoyesis	10
Factores de crecimiento hematopoyético	12
Papel de los factores de crecimiento en la hematopoyesis	14
Aplicaciones terapéuticas de los factores de crecimiento	14
MATERIAL Y METODO	
Material biológico	19
Obtención de células leucémicas	19
Obtención de macrófagos residentes e inducidos	20
Condiciones de cultivo celular	20
Ensayo de proliferación celular	21
Ensayo de diferenciación celular	22
RESULTADOS	24
DISCUSION	42
REFERENCIAS	47
APENDICES	
Apéndice 1	58
Apéndice 2	60
Apéndice 3	63

ABREVIACIONES

Término	Siglas en español	Siglas en inglés
MGI	Inductor de macrófagos y granulocitos	Macrophage-granulocyte inducer
CSF	Factor estimulador de colonias	Colony stimulating factor
HGF	Factores de crecimiento hematopoyético	Hematopoietic growth factors
CSA	Actividad estimuladora de colonias	Colony stimulating activity
IL-1	Interleucina-1	Interleukin-1
IL-2	Interleucina-2	Interleukin-2
IL-3	Interleucina-3	Interleukin-3
IL-4	Interleucina-4	Interleukin-4
IL-5	Interleucina-5	Interleukin-5
IL-6	Interleucina-6	Interleukin-6
IL-7	Interleucina-7	Interleukin-7
IL-8	Interleucina-8	Interleukin-8
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos	Colony stimulating factor for granulocytes
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos	Colony stimulating factor for macrophages
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos	Colony stimulating factor for macrophages-granulocytes
TNF	Factor de necrosis tumoral	Tumor necrosis factor
TGF	Factor de crecimiento transformante	Factor growth transforming
INFs	Interferones	Interferones
CFU	Unidad formadora de colonias	Colony forming unit
CFC	Célula formadora de colonias	Cell forming colony
rh	Molécula recombinante humana	Recombinant human

RESUMEN

Las interleucinas 1 y 2 (rhIL-1 e rhIL-2), fueron primeramente descritas como factores que afectaban la proliferación de linfocitos T. Actualmente se conoce, que estas dos interleucinas pueden influir aunque de manera indirecta, en la proliferación y diferenciación de células mieloides.

Con la finalidad de determinar el efecto de la rhIL-1 y rhIL-2 en la proliferación y diferenciación de células mieloides, se cultivaron células de las líneas leucémicas murinas WR19M.1 de tipo macrófágico y WEHI3BD⁻ de tipo mielomonocítico en presencia de estos 2 factores. Asimismo se observó el efecto de la rhIL-1 sobre la diferenciación de células de leucemia mieloide humana. Por último se determinó el efecto proliferador y diferenciador de ambas interleucinas en macrófagos residentes e inducidos de la cavidad peritoneal de ratón.

Para ello, se utilizaron cultivos en suspensión y en bicapa de agar. La proliferación celular fué evaluada por conteo celular y de colonias; la diferenciación celular fué determinada por medio de la aparición de receptores para Fc a través de la formación de rosetas, por fagocitosis de partículas de látex y secreción de lisozima.

Los resultados obtenidos muestran que la rhIL-1 es un fuerte inductor de la aparición de receptores para Fc en las líneas WR19M.1 y WEHI3BD⁻ y ligeramente en las células leucémicas de 3 pacientes con leucemia mieloide. Además, estimula la fagocitosis inespecífica de partículas de látex en la línea leucémica WEHI3BD⁻ y no presenta ningún efecto en estimular la proliferación celular de estos tipos de leucemias. Por otro lado, se encontró que la rhIL-2 es un fuerte factor mitogénico, ya que estimula la proliferación celular tanto de la WR19M.1 como de la WEHI3BD⁻, pero un factor mitogénico pobre cuando se evaluó su efecto tanto en macrófagos residentes como inducidos de la cavidad peritoneal.

Consideramos que estos resultados revisten de cierta importancia pues si la rhIL-1 fuese capaz de inducir en forma general la diferenciación funcional de células leucémicas de tipo mieloide, entonces este factor tendría una muy útil aplicación clínica en pacientes con este tipo de enfermedades, debido a su efecto sobre el incremento en la expresión de receptores para Fc, así como del aumento de la actividad fagocítica de este tipo de células.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

1. Determinar el efecto de los factores de crecimiento hematopoyético rhIL-1 y rhIL-2 sobre la proliferación y diferenciación de células leucémicas mieloides de ratón.
2. Determinar el efecto de la rhIL-1 sobre la diferenciación de células leucémicas mieloides humanas.
3. Determinar el efecto de la rhIL-1 y rhIL-2 sobre la proliferación y diferenciación de células macrofágicas normales de la cavidad peritoneal de ratón.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.1 Determinar el efecto de la rhIL-1 y rhIL-2 sobre la proliferación celular, la aparición de receptores para Fc, la fagocitosis de partículas de látex y la secreción de lisozima en la línea de tipo macrofágico WR19M.1 y en la línea de tipo mielomonocítico WEHI3BD⁻.
- 2.1 Determinar el efecto de la rhIL-1 sobre la aparición de receptores para Fc en células de pacientes con leucemia mielóide aguda (LMA) y leucemia mielóide crónica (LGC).
- 3.1 Determinar el efecto de la rhIL-1 sobre la aparición de receptores para Fc en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón.
- 3.2 Determinar el efecto de la rhIL-2 sobre la proliferación celular de macrófagos residentes e inducidos de la cavidad peritoneal de ratón.

INTRODUCCION

La hematopoyesis, es el proceso mediante el cual células sanguíneas maduras se derivan de células tallo multipotenciales localizadas en la médula ósea (1,2). Debido a que las células sanguíneas tienen un tiempo de vida corto (1,3), la regulación de su producción es el resultado de un fino balance entre las moléculas estimuladoras e inhibidoras y de las células producidas que responden a éstas moléculas (4,5).

Estas moléculas que regulan de manera positiva o negativa la hematopoyesis son conocidas como factores de crecimiento hematopoyético (HGFs del inglés, hematopoietic growth factors), los cuales tienen un papel primordial en la sobrevivencia, proliferación, diferenciación y activación funcional de las células hematopoyéticas (6). La acción de los HGFs es regulada por receptores para los factores de crecimiento sobre células precursoras y células efectoras maduras (7). A través del transcurso del tiempo, distintos HGFs han sido identificados y agrupados de acuerdo a sus actividades específicas sobre poblaciones de células blanco. Actualmente los HGFs se han clasificado en 3 grupos de acuerdo al efecto que presentan sobre un cierto tipo de célula blanco (8): 1) en el primer grupo se incluye a los factores que por si mismos no tienen ningún efecto directo en la proliferación celular hematopoyética, pero al actuar sobre las células tallo las hacen más susceptibles de responder a estos factores de crecimiento (9,10), tal es el caso de interleucina-1 (IL-1), interleucina-4 (IL-4) e interleucina-6 (IL-6); 2) en el segundo grupo se incluye a los factores que afectan de manera directa la proliferación celular hematopoyética a nivel de células progenitoras, tales como interleucina-3 (IL-3) y el factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CSF del inglés, colony stimulating factor for macrophages-granulocytes) (11,12) y 3) en este grupo se incluyen a los HGFs que afectan exclusivamente la diferenciación terminal de células hematopoyéticas hacia células efectoras maduras y que actúan en linajes específicos, tales como factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF del inglés, colony stimulating factor for macrophages), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF del inglés, colony stimulating factor for granulocytes), interleucina-5 (IL-5) y eritropoyetina (Epo) (13,14). Asimismo, han sido descritos otros factores que regulan de manera negativa la

proliferación hematopoyética (5), tales como factor de necrosis tumoral (TNF del inglés, tumor necrosis factor), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β del inglés, transforming growth factor beta), lactoferrina (LF), transferrina (TF), isoferitinas ácidas (AIF del inglés, acidic isoferitins), prostaglandinas del tipo-E y todos los tipos de interferones conocidos (IFNs) (15,16,17).

Más recientemente, los genes de algunos factores de crecimiento hematopoyético humanos y de ratón han sido molecularmente clonados y sus secuencias de ácidos nucleicos y proteínas han sido comparadas (3,18,19,20,21). En ciertos casos las secuencias de los genes de los HGFs han sido sintetizados en células animales, bacterianas y en sistemas de expresión utilizando levaduras (22,23). La caracterización molecular de estos factores ha permitido estudiar su efecto tanto en la mielopoyesis como en la linfopoyesis en sistemas animales y en cultivos celulares in vitro, permitiendo asimismo evaluar su posible aplicación terapéutica (8,24).

El aislamiento de líneas celulares y la disponibilidad de los HGFs recombinantes, hacen posible el estudio del papel que juegan estos factores sobre la actividad biológica en células hematopoyéticas normales como transformadas (25). Dos ejemplos de líneas celulares aisladas son la línea transformada de tipo macrófágico WR19M.1 y la línea leucémica mielomonocítica WEHI3BD⁻ (26,27), de las cuales se conoce relativamente poco acerca del efecto de los HGFs sobre su actividad proliferadora y diferenciadora; siendo de vital importancia el estudio de estas líneas, ya que pueden aportar alguna aplicación a nivel terapéutico en pacientes con algún tipo de leucemia. Asimismo, recientemente ha sido descrito que otra serie de factores que en un inicio se creía que afectaban exclusivamente al sistema linfoide, como es el caso de IL-1 e IL-2, ahora es conocido que también tienen un efecto en el sistema mieloides (28,29). En el caso de IL-1 originalmente fué descrita como un factor cooperante para inducir la proliferación de células T (30), así como de mediar ciertas respuestas inmunes e inflamatorias (31,32); sin embargo, ahora es conocido su efecto en células mieloides debido a que hace más susceptibles a células progenitoras indiferenciadas hematopoyéticas a responder a factores de crecimiento específicos (10,33), pero no es conocido que por sí misma tenga efecto en la proliferación y en la diferenciación celular. Por otro lado IL-2, aunque en un inicio fué descrita como un factor de crecimiento exclusivo de linfocitos T (34,35), actualmente se sabe que puede afectar la proliferación de células mieloides del linaje monocítico en

cultivos no homogéneos de células de médula ósea, en conjunción con interferon gamma (IFN- γ) (29).

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo tuvo como finalidad evaluar si las interleucinas 1 y 2 recombinantes humanas (rhIL-1 y rhIL-2), pueden participar en la inducción a la proliferación o a la expresión de receptores Fc en poblaciones homogéneas de células mieloides, para ello, se utilizaron dos líneas leucémicas de ratón : la WR19M.1 de tipo macrofágico y la WEHI3BD de tipo mielomonocítico, así como de células provenientes de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA). Esto permitirá conocer por un lado si estos factores tienen alguna propiedad diferente a las ya descritas y por otro lado, dependiendo del efecto que presenten en estos tres tipos de leucemias, su posible utilización con fines terapéuticos.

Con ello se pretende contribuir al conocimiento de la actividad biológica que tienen estas interleucinas sobre la proliferación y diferenciación de células leucémicas mieloides y que aun no han sido descritas, tratando de aportar alguna aplicación clínica para los pacientes leucémicos, utilizando estos factores de crecimiento y por medio de la manipulación de niveles de regulación.

MARCO TEORICO

HEMATOPOYESIS

En el hombre adulto normal, todos los eritrocitos, granulocitos y plaquetas que circulan en la sangre periférica, son producidos en la médula ósea mediante un proceso llamado hematopoyesis (36) (Figura 1).

UN MODELO DE HEMATOPOYESIS

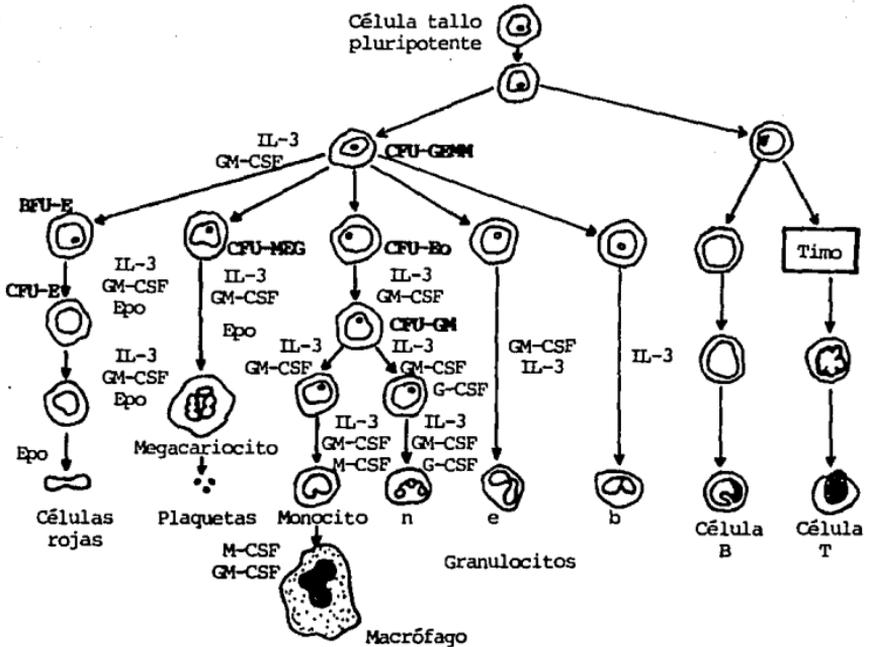


Figura 1. Este modelo de hematopoyesis, ilustra el principio aceptado generalmente, de que todas las células sanguíneas se derivan de una célula tallo común a través de un número de

linajes discretos de células progenitoras. La célula tallo hematopoyética pluripotencial en el eje del diagrama se presenta en un sistema hematopoyético maduro. La división de esta célula da origen a células tallo hematopoyéticas pluripotenciales y a series de células progenitoras que generan los diferentes linajes (18,39,48,49). Las diferentes células progenitoras las cuales son identificadas en los sistemas de cultivos in vitro son la unidad formadora de colonias de granulocito, eritrocito, monocito, megacariocito (CFU-GEMM del inglés, colony forming unit, granulocyte, erythrocyte, monocyte, megakaryocyte), la de eosinófilos (CFU-Eo del inglés, colony forming unit-eosinophil, la de granulocitos y macrófagos (CFU-QM del inglés, colony forming unit, granulocyte-monocyte, la de eritrocitos (CFU-E del inglés, colony forming unit-erythrocyte) y la de grupos eritroides (BFU-E del inglés burst forming unit-erythrocyte). Las abreviaciones para los linajes hematopoyéticos son n, neutrófilos; e, eosinófilo; b, basófilo; m, monocito/macrófago; E, eritrocito y M, megacariocito (50).

La médula ósea está involucrada no solo en la generación de las células de la sangre (18,37), sino también de linfocitos B, precursores de linfocitos T (38,39) y de varios tipos de células asociadas con la operación del sistema inmune (Figura 1). Estas células accesorias incluyen células especializadas que presentan antígeno, tales como; macrófagos (37), células dendríticas (40), células intratímicas (41), células de Langerhans (42,43) y células efectoras asociadas con las defensas inmunológicas tales como neutrófilos, eosinófilos (18,37), basófilos (37), monocitos (18,37), células mast (basófilos) (44,45) y células asesinas naturales (NK del inglés, natural killer) (46,47).

Células tallo hematopoyéticas pluripotenciales

La evidencia de la existencia de células tallo hematopoyéticas pluripotenciales se deriva de experimentos in vivo en los cuales células de

médula ósea fueron transferidas a hospederos irradiados. Marcadores cromosómicos únicos han sido usados para demostrar que las células mieloides y linfocitos T y B en estos animales hospederos pueden provenir de una célula tallo común (39,51). El ensayo estándar para las células tallo hematopoyéticas pluripotenciales ha sido el ensayo de la unidad formadora de colonias del bazo (48) o CFU-s, el cual se basa en la observación, de que la inyección de números graduados de células de médula ósea a ratones hospederos irradiados, resulta en la aparición de colonias macroscópicas discretas en el bazo.

Es importante mencionar, que las células progenitoras que dan lugar a los 8 tipos sanguíneos conocidos, han sido detectados por medio del ensayo del CFU-s; así tenemos que se conocen dos tipos de progenitores para la serie eritroide, uno designado como temprano; conocido como BFU-E, el cual se caracteriza por originar colonias macroscópicas eritroides en el bazo con poco potencial de autorrenuevo, y el otro designado como tardío o CFU-E, el cual origina colonias eritroides pequeñas con un alto potencial de autorrenuevo (52,53). Asimismo, se han detectado células unipotentes porque dan lugar a un solo tipo de célula diferenciada, tales como las células progenitoras para megacariocitos o CFU-Meg (54), para eosinófilos o CFU-Eos y bipotenciales por su capacidad de dar origen a más de un tipo celular sanguíneo, como la unidad formadora de colonias de macrófagos-granulocitos o CFU-GM (56).

El sistema hematopoyético

Todas las células sanguíneas maduras se derivan de células tallo, las cuales se originan durante el desarrollo embrionario. Estas células tallo, las cuales en el adulto están localizadas en la médula ósea, son capaces de proliferar y producir más células tallo (un proceso llamado auto-renovación) o dan origen a células más diferenciadas (un proceso conocido como comprometimiento) (18,37). Estas células progenitoras comprometidas pueden entonces experimentar posteriormente proliferación y desarrollarse para producir células sanguíneas maduras (2) dentro de ambientes especializados localizados en la médula ósea, la cual provee de un soporte estromal, que permite a las células tallo que se desarrollen y maduren hacia células diferenciadas (Figura 2). Estudios in vitro de la capa estromal de cultivos de médula ósea a largo plazo, han demostrado que está compuesta de fibroblastos, células endoteliales, adipocitos y macrófagos, además de una

matriz extracelular conteniendo los tipos I y IV de colágena, glucosaminoglucanos, fibronectina y laminina (56,57). Las células tallo hematopoyéticas totipotentes se localizan dentro de la capa estromal y dan lugar a células progenitoras con una función específica y entonces son liberadas en el torrente sanguíneo (58). Esta secuencia de eventos, ha sugerido la posibilidad de que las células tallo totipotentes puedan permanecer en la médula ósea debido a un enlace selectivo a receptores específicos de superficie celular presentes en células estromales o a la adhesión a moléculas presentes en la matriz extracelular (59). El microambiente de la médula ósea juega un importante papel en la regulación para liberar la progenie hematopoyética madura a través de la modulación de proteínas de adhesión específicas, y ésto es un área de investigación activa en el presente (59).

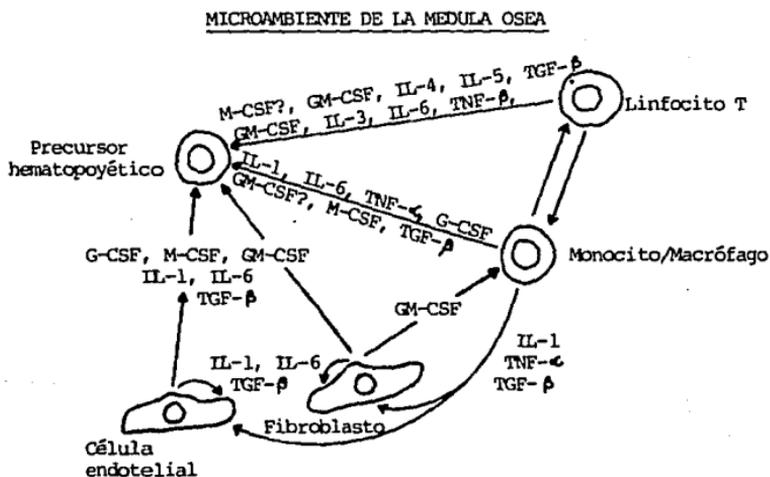


Figura 2. Interacciones moleculares en el microambiente de la médula. Tomado de Ref. 60.

Es claro por lo anteriormente descrito, que actualmente el sistema hematopoyético sea considerado como un compartimiento dinámico, en el cual se encuentran células en varias etapas de diferenciación, comprometimiento y desarrollo, interaccionando con moléculas presentes tanto en la superficie de las células estromales como de aquellas presentes en la matriz extracelular. El resultado final de este proceso, es que los números apropiados de tipos celulares sanguíneos maduros son producidos de acuerdo a la necesidad del organismo. Evidentemente, el sistema hematopoyético está organizado para asegurar que esta capacidad regenerativa persista a través de la vida y que exista flexibilidad suficiente para mantener el estado normal de la producción de uno o más tipos celulares, además de su capacidad de responder a ciertas situaciones de stress tales como; hemorragias, hipoxia o infecciones (2).

Sistemas in vitro para el estudio de la hematopoyesis

El crecimiento y diferenciación de células hematopoyéticas, ha sido estudiado in vitro en 2 clases de sistemas: 1) cultivos a corto plazo (menos de 3 semanas) en los cuales, el crecimiento y la diferenciación es demostrada fácilmente con factores de crecimiento solubles y 2) cultivos a largo plazo (cultivos Dexter) (3 meses o más) (61), los cuales dependen de una monocapa de células estromales, dentro de las que se incluyen células endoteliales, fibroblastos, adipocitos y macrófagos, los cuales mantienen la proliferación continua de células tallo hematopoyéticas pluripotenciales asegurando de esta manera su progenie. Asimismo es interesante destacar la existencia de un tercer sistema más reciente para el estudio de la diferenciación hematopoyética y que ha sido el desarrollo de líneas de células progenitoras hematopoyéticas factor-dependientes (62).

1) Evaluación de colonias para progenitores hematopoyéticos.

El descubrimiento de la formación de colonias in vitro para células progenitoras hematopoyéticas fué un evento clave para el estudio de los mecanismos involucrados en el desarrollo, proliferación y maduración in vitro de células de médula ósea. Pluznik y Sachs (63) y Bradley y Metcalf (64), observaron que progenitores hematopoyéticos podían dar origen a colonias

discretas de células diferenciadas cuando eran sembrados en presencia de una capa alimenticia de fibroblastos de origen embrionario. El crecimiento de estas colonias fue absolutamente dependiente de la presencia de la capa alimenticia de fibroblastos. Subsecuentemente se mostró que el papel de la capa alimenticia era producir factores de crecimiento solubles, y que estas células podían ser reemplazadas por su medio condicionado (65,66).

2) Cultivos de médula ósea a largo plazo.

El sistema de cultivo de médula ósea a largo plazo desarrollado por Dexter y colegas (61), está basado en el establecimiento in vitro de una capa adherente constituida de una mezcla de células estromales derivadas de médula ósea. La selección cuidadosa de suero de caballo y la adición de suero fetal de caballo e hidrocortisona (67,68), son factores importantes en el establecimiento de capas adherentes efectivas, capaces de mantener el crecimiento de células hematopoyéticas. En el procedimiento original de Dexter (61,68), después del establecimiento de una monocapa de células estromales de un inóculo inicial de células de médula ósea, un segundo inóculo de células de médula ósea fue adicionado. La temperatura óptima para la producción de células tallo fue de 33 °C, y típicamente los cultivos fueron depletados de la mitad de las células no adherentes y el medio cambiado semanalmente. Tales cultivos suponen proliferación de células tallo hematopoyéticas pluripotenciales incluyendo CFU-s (69) y células capaces de generar linfocitos en hospederos irradiados (69,70).

3) Líneas de células progenitoras hematopoyéticas dependientes de factores de crecimiento.

Una importante avance para el estudio in vitro de la diferenciación de células de médula ósea, ha acontecido a partir del descubrimiento, de que células progenitoras hematopoyéticas pueden crecer in vitro como poblaciones clonales, cuando factores de crecimiento específicos están presentes. Estas líneas se dividen en dos grupos; el mejor caracterizado está formado por líneas que consisten de poblaciones homogéneas de células relativamente bien diferenciadas y que comparten muchas características con células mast

(basófilos) (10,39,40). El segundo grupo está compuesto de líneas con poblaciones heterogéneas de células, las cuales muestran una variedad en su comprometimiento y potencial diferenciador; por ejemplo, una línea puede diferenciarse a basófilo o megacariocito (71,72). El crecimiento y la capacidad de autorrenovación de estos dos grupos de líneas difiere, pero ambas muestran el requerimiento común para un factor de crecimiento que ha sido llamado factor estimulador de células persistentes (73).

FACTORES DE CRECIMIENTO HEMATOPOYÉTICO

A partir de los estudios realizados por Leo Sachs y por Donald Metcalf en la década de los 60s, se hizo evidente que en la regulación de la maduración, sobrevivencia, proliferación y diferenciación de las células mieloides, participan ciertos factores humorales de naturaleza glucoproteica, actualmente designados como factores de crecimiento hematopoyético o HGFs (23). Estos inductores del crecimiento hematopoyético, comprenden una familia de polipéptidos glucosilados, muchos de los cuales han sido definidos por su habilidad para inducir el crecimiento y desarrollo de colonias de células hematopoyéticas de varios linajes *in vitro*, comúnmente usando sistemas de cultivo en gel suave (64,65). El grupo de Leo Sachs, fué el primero en reportar la formación de colonias de precursores hematopoyéticos, las cuales consistían principalmente de macrófagos y granulocitos por lo cual designó al factor responsable de esta propiedad como inductor de macrófagos y granulocitos (MGI del inglés, macrophage and granulocyte inducer) (74), un año más tarde el grupo de Donald Metcalf usando un sistema de cultivo similar pero empleando células de médula ósea en lugar de células de bazo, designó a esta misma molécula como factor estimulador de colonias (CSF del inglés, colony stimulating factor) por su habilidad de soportar el crecimiento de células de médula ósea en cultivos semisólidos (75,76,77,78), por lo que también fué llamado por el grupo de Austin, McCulloch y Till como actividad estimuladora de colonias (CSA del inglés, colony stimulating activity) (79).

A partir de estos estudios clásicos realizados por estos dos grupos de investigación, se hizo evidente que en la regulación de la hematopoyesis participaban al menos dos tipos de factores humorales. Sin embargo, más recientemente ha sido descrito que en la regulación humoral de la

hematopoyesis pueden participar otra serie de factores que inicialmente se sabía solo afectaban al sistema linfóide tales como; interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-6 (IL-6) (80,81).

Actualmente existen dos escuelas principales de pensamiento que explican la manera en que estos factores controlan la proliferación y diferenciación del sistema hemato-linfóide. La escuela de Leo Sachs postula la existencia de una familia de moléculas que estimulan principalmente la proliferación celular del compartimiento mieloide designadas como MGI-1 (82,83), y otras con propiedades principalmente diferenciadoras llamadas MGI-2 (82,84), producidas por las células mieloides en respuesta al MGI-1. Por otro lado, la escuela de Donald Metcalf afirma que la hematopoyesis es regulada por una serie limitada de factores de crecimiento (85,86), los cuales actúan en diferentes estadios del desarrollo hematopoyético, así tenemos que interleucina-3 (IL-3) (87), ha sido descrita como un factor que estimula la proliferación y desarrollo de células progenitoras inmaduras; el factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CSF) (22,88), el cual estimula la proliferación de células mieloides en etapas intermedias de su desarrollo; el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) (89) y factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) (77,90), los cuales participan principalmente en la diferenciación terminal de este tipo de células.

Recientemente, los genes que codifican para muchas de estas moléculas han sido clonados y expresados tanto en sistemas bacterianos como en levaduras (22,23), obteniéndose de esta manera los factores de crecimiento hematopoyético en forma recombinante. La disponibilidad de estas moléculas en forma recombinante ha permitido evaluar su posible potencial como reguladores de la hematopoyesis in vivo, así como evaluar su utilidad con fines terapéuticos en cierto tipo de enfermedades congénitas, síndromes mielodisplásicos y en leucemias mieloides agudas (2,24).

Los HGFs son activos in vitro a concentraciones nanogramáticas (23) y pueden servir como cofactores para estimular células en diferentes etapas de la diferenciación hematopoyética, y en muchos casos sobre linajes diferentes (23,91,92). Algunos de estos factores de crecimiento promueven la proliferación y diferenciación de células tallo multipotentes (2,93); sin embargo, existen otras moléculas que por sí mismas no son promotoras del crecimiento de estas células, pero que pueden sinergizar con los HGFs (22) y producir la proliferación y desarrollo de células primitivas (2,94).

Papel de los factores de crecimiento en la hematopoyesis

Relativamente poco es conocido acerca del papel de los HGFs en la regulación de la hematopoyesis in vivo. Se sabe que es necesario suministrar grandes cantidades de estos factores al interior del organismo, para observar un efecto biológico (95,96). Sin embargo, es importante mencionar que de los diversos HGFs utilizados en estudios clínicos, en la gran mayoría de los mismos se ha correlacionado el efecto observado tanto in vitro como in vivo (Tabla 1).

Aplicaciones terapéuticas de los factores de crecimiento

Los resultados de estudios clínicos con factores de crecimiento hematopoyético son alentadores y las aplicaciones potenciales son numerosas (97) (Tabla 2).

En el largo contexto de la defensa del organismo, esta capacidad puede ser vista como un mayor avance en Medicina. Por primera vez, los médicos pueden regular el comportamiento de las células sanguíneas de sus pacientes; esta regulación, provee una única forma de tratamiento que permite incrementos generalizados en la defensa del organismo y también incrementos específicos en el número de células efectoras para contrarrestar infecciones y supresión de médula ósea (98).

Tabla 1. FACTORES DE CRECIMIENTO HEMATOPOYETICO (HGFs) Y SU FUNCION EN CELULAS EFECTORAS.

Moléculas	Sinónimos	Localización Cromosómica	Función
IL-1- α	Hematopoyetina-1	2q14	Estimula a las células T a producir IL-2, estimula a las células del médula ósea a producir CSFs, induce estado antiviral celular, mitogénico y citostático para varias células, citostático para células tumorales, estimula actividad de granulocitos, estimula proliferación y diferenciación de células B, activa a células T y células endoteliales, estimula reabsorción de osteoclastos de hueso, forma membrana, induce fiebre, induce proteínas en fase aguda, adjuvanticidad, actividad anti-tumoral, estimula hematopoyesis <u>in vivo</u> .
IL-1- β	"	2q14	
IL-2	Hematopoyetina-2	4	Estimula crecimiento de células B, co-estimula diferenciación de células B y monocitos, mitogénico para varias células, activa macrófagos, estimula actividad de células NK y actividad de LAK, activa células T, estimula proliferación y diferenciación de células T, induce fiebre, adjuvanticidad, actividad anti-tumoral.
IL-3	Multi-CSF	5q	Factor de crecimiento de células hematopoyéticas multipotenciales, estimula algunas células tempranas del linaje linfóide, mitogénico para varias células, estimula actividad de eosinófilos, adjuvanticidad, estimula hematopoyesis <u>in vivo</u> .
IL-4	Factor estimulador de células B	5q	Co-estimula la proliferación de células B y T y de múltiples tipos de células progenitoras hematopoyéticas, estimula la producción de IgG1 e IgE, inhibe algunas líneas celulares de macrófagos, estimula a fibroblastos a producir CSFs, mitogénico para varias células, activa macrófagos, estimula actividad LAK, induce receptores IgG sobre células B.
IL-5	Factor de crecimiento de células B-II	5q	Estimula <u>in vivo</u> respuestas de anticuerpos, estimula la formación de colonias de eosinófilos <u>in vitro</u> y aumenta su diferenciación, estimula a células T, estimula producción de IgM e IgA, mitogénico para varias células, activa

IL-6	Interferon-B2 Factor estimulador de células B II	7q	células B de ratón induciendo su proliferación y diferenciación.
IL-7	Interleucina-7	-	Estimula formación de colonias de granulocitos, sinergiza con IL-3 para estimular células hematopoyéticas muy primitivas (formación de colonias blásticas), activa producción de IL-2 por células T y aumenta citotoxicidad de linfocitos T, estimula liberación de proteínas en fase aguda por hepatocitos, mitogénico y citostático para varias células, estimula la diferenciación de células B, activa células T e induce su diferenciación y proliferación, adjuvanticidad.
IL-8	Interleucina-8	-	Mitogénico para varias células, estimula proliferación de células B, estimula proliferación de células T.
Epo	Eritropoyetina	7q11;q22	Estimula actividad de granulocitos, induce migración quimiotáctica de células.
TNF	Cachectina Linfotoxina	6p23;q12	Estimula a precursores eritroides a proliferar y madurar a eritrocitos.
IFN- α	Interferon alfa	12	Induce estado antiviral celular, mitogénico para varias células, citostático para varias células normales y tumorales, activa macrófagos, estimula actividad de granulocitos y eosinófilos, estimula proliferación y diferenciación de células B, estimula proliferación de células T, induce migración quimiotáctica de células, activa células endoteliales, estimula resorción de osteoclastos de hueso, forma membrana, induce fiebre, induce proteínas en fase aguda, adjuvanticidad, estimula angiogénesis <u>in vivo</u> , actividad antitumoral.
IFN- β	Interferon beta	12	Induce estado antiviral celular, citostático para células normales y tumorales, estimula actividad de células NK, estimula proliferación y diferenciación de células B, induce fiebre, actividad anti-tumoral.
IFN- γ	Interferon gamma	12	Induce estado antiviral celular, mitogénico para varias

células, citostático para células normales y tumorales, activa macrófagos, estimula actividad de células NK, estimula actividad LAK, estimula proliferación y diferenciación de células B y T, estimula la selección isotipo de IgG2a, activa células T y endoteliales, induce fiebre, induce proteínas en fase aguda, adjuvanticidad, actividad anti-tumoral.

GM-CSF	CSF- α	5q21;q32	Estimula a múltiples células progenitoras hematopoyéticas a proliferar y formar colonias de células maduras <u>in vitro</u> , activa neutrófilos y monocitos, mitogénico para varias células, estimula actividad de eosinófilos, estimula proliferación de células B, induce migración quimiotáctica de células, estimula hematopoyesis <u>in vivo</u> .
G-CSF	CSF- β	17q11;q22	Estimula el crecimiento de colonias granulocíticas, activa neutrófilos, mitogénico de varias células, estimula hematopoyesis <u>in vivo</u> .
M-CSF	CSF-1	5q33	Estimula la formación de colonias de macrófagos (actúa sobre células progenitoras humanas), mitogénico para varias células, activa macrófagos.

Tabla 2. Aplicaciones terapéuticas de los factores de crecimiento hematopoyético.

Factores	Aplicaciones clínicas
G-CSF	<ul style="list-style-type: none"> - Neutropenia inducida por quimioterapia. - Neutropenia asociada con trasplante de médula ósea autóloga. - Neutropenia asociada con leucemia de las células velludas. - Síndromes mielodisplásicos. - Neutropenia clínica. - Neutropenia idiopática. - Neutropenia congénita.
M-CSF	<ul style="list-style-type: none"> - Neutropenia inducida por quimioterapia. - Neutropenia asociada con trasplante de médula ósea autóloga. - Neutropenia crónica de niños. - Terapia de melanoma y neuroblastoma.
GM-CSF	<ul style="list-style-type: none"> - Neutropenia inducida por quimioterapia. - Neutropenia asociada con trasplante de médula ósea. - Síndromes mielodisplásicos. - Anemia aplástica. - Leucopenia en SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida). - Progenitores circulantes incrementados para uso en trasplante en médula autóloga.
IL-1	<ul style="list-style-type: none"> - Tratamiento del cáncer de colon con 5-fluoracilo
IL-3	<ul style="list-style-type: none"> - Tratamiento de pacientes con fallas en la médula ósea.
Epo	<ul style="list-style-type: none"> - Anemia asociada con la etapa final de enfermedad renal.

MATERIAL Y METODO

MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico utilizado en este trabajo consistió en ratones de la cepa CD1-Zaragoza, los cuales se usaron como fuente de macrófagos residentes e inducidos de la cavidad peritoneal. Se utilizaron 25 ratones aproximadamente de los cuales solo 20 fueron empleados debido a pérdida de los mismos por muerte al ser mal inyectados y por contaminación con eritrocitos al momento de la extracción de las células. Cerca de 9×10^5 y 2×10^6 células fueron obtenidas de la cavidad peritoneal de los ratones, de las cuales el 50% eran macrófagos residentes e inducidos respectivamente. Asimismo, se emplearon dos líneas leucémicas de ratón; la línea transformada de tipo macrofágico WR19M.1 (gentilmente donada por el Dr. Jay C. Unkless; Mount Sinai School of Medicine, New York, EEUU) y la línea mielomonocítica WEHI3BD⁻ (gentilmente donada por el Dr. Michael Dexter; Paterson Institute for Cancer Research Manchester, Inglaterra).

El material humano empleado consistió en 2 muestras de sangre periférica de pacientes con leucemia mieloide aguda (IMA), proporcionadas por el Hospital de Especialidades "La Raza" (IMSS) y de un paciente con leucemia granulocítica crónica (LGC), la cual fue proporcionada por el Hospital General de México (SSA).

OBTENCIÓN DE CÉLULAS LEUCÉMICAS

Sangre periférica de pacientes con IMA fue obtenida utilizando jeringas hipodérmicas heparinizadas con una solución de heparina a una concentración de 1000 U/ml (Elkins-Sinn, Inc., EEUU). Para la obtención de las células mononucleares (leucémicas), se utilizó un gradiente de densidad de Ficoll-Histopaque a una densidad de 1.077 (Sigma Chemical Company, EEUU) (100). Para ello 5 ml de sangre periférica diluida 2:1 con medio esencial mínimo de Eagle (MEM) fue centrifugada a 800 g por 30 minutos; después de transcurrido este periodo de tiempo, la capa de células blancas mononucleares fue retirada de la interfase con la ayuda de una pipeta estéril. Las células así obtenidas, fueron lavadas 2 veces para eliminar el exceso de ficoll.

Los tipos leucémicos fueron diagnosticados de acuerdo a la clasificación de la FAB (French-American-British) de LMA (101) (Apéndice 1).

OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS RESIDENTES E INDUCIDOS

Para la obtención de macrófagos inducidos de la cavidad peritoneal, 3 ml de una solución de caseinato de sodio (Laboratorios Difco, Michigan, EEUU) al 10% en solución amortiguadora de fosfatos (SAF), fué inyectada intraperitonealmente en ratones. Después de 4 días, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Para obtener las células de la cavidad peritoneal, 10 ml de SAF se inyectaron y las células fueron recuperadas al retirar este mismo volumen. Esta operación fué repetida 2 veces mas para obtener la máxima cantidad de células posibles.

En la obtención de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y las células de la cavidad son obtenidas al inyectar 10 ml de SAF y recuperar este mismo volumen. Esta operación es repetida al menos 5 veces para colectar la máxima cantidad de células posibles.

Con la finalidad de enriquecer la población macrofágica, las células obtenidas fueron incubadas a 37 °C por 1 hr, después de transcurrido este tiempo las células no adheridas son retiradas de las cajas de cultivo y únicamente las células adherentes con morfología típicamente macrofágica fueron utilizadas.

CONDICIONES DE CULTIVO CELULAR

Las células de las líneas WR19M.1 y WEHI3BD⁻, fueron cultivadas en suspensión durante 4 días en MEM suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB: Microlab, Mexico). Estreptomicina (100 ug/ml), penicilina G (100 U/ml) y bicarbonato de sodio (3.7 g/l) fueron adicionados al MEM antes del cultivo, ajustado a un pH de 7.2 y esterilizado por medio de filtración a través de membranas (Millipore, EEUU) con diámetro de 0.22 micras. Los cultivos celulares fueron realizados tanto en platos de cultivo de 35 x 10 mm utilizando 2.5×10^4 células de WEHI3BD⁻ (2.5 ml) (Nuncion, Dinamarca) como en

placas de 96 micropozos (250 ul) (Nunc) utilizando 2.5×10^3 células de WR19M.1 en presencia de 12 ng/ml de rhIL-1, 1000 U/ml de rhIL-2, 200 U/ml de rhGM-CSF y 20 ug/ml de rhG-CSF (gentilmente donados al laboratorio por David L. Urdal, Immunex Corporation, Seattle, EEUU).

Por otra parte, las células mononucleares provenientes de sangre periférica de LMA se cultivaron en suspensión en RPMI 1640 (Sigma Chemical) suplementado con 2mM de L-glutamina (Sigma Chemical) y 10% de SFB, en presencia de 0.8 ng/ml de rhIL-1 durante 4 días.

Finalmente, los macrófagos residentes e inducidos de la cavidad peritoneal de ratón, se cultivaron en suspensión de 4 a 6 días y en cultivo en bicapa de agár por espacio de 7 días (102,103). Para los cultivos en agár se utilizó agár (Bacto agár, laboratorios Difco) y MEM suplementado con 10% de Suero de Caballo (SC: Lab. de Dif. Cel. y Cánc., Mexico) y MEM a una doble concentración durante 7 días. El cultivo en suspensión se realizó en micropozos de 96 (250 ul) (Nunc) y el número de células sembradas varió de acuerdo a la cantidad de células extraídas de la cavidad peritoneal. Los cultivos en bicapa de agár se realizaron en pozos de 24 (0.75 ml) (Costar, Mark II, EEUU) y el número inicial celular fue de 1×10^5 células/pozo de macrófagos residentes e inducidos, en presencia de 2 ng/ml de rhM-CSF, 1000 U/ml de rhIL-2 y 2000 U/ml de rhIFN- γ .

Todos los cultivos celulares fueron realizados en una atmósfera al 10% de CO₂ a 37 °C y con una humedad relativa del 95% en incubadora (Forma Scientific, EEUU). Todos los sueros utilizados en los cultivos fueron inactivados a 56°C durante 30 minutos previamente a su uso. Los cultivos se realizaron por duplicado en ensayos independientes.

ENSAYO DE PROLIFERACION CELULAR

En los cultivos en bicapa de agár, la proliferación celular fue evaluada a los 7 días de cultivo por conteo de las colonias formadas. Se consideró como una colonia a aquel grupo formado por mas de 20 células. Las colonias fueron evaluadas con la ayuda de un hemocitómetro (Clay Adams, EEUU) y un microscopio invertido (American Optical, EEUU).

Para los cultivos en suspensión, las células fueron removidas de los platos de cultivo por medio de pipeteo y centrifugadas a 500 g/10 minutos. Las células obtenidas se contaron utilizando un hemocitómetro (Clay Adams) y un

microscopio compuesto (Carl Zeiss, Alemania). La viabilidad celular (% de mortalidad) se determinó por el método de exclusión de azul tripano (Sigma Chemical).

ENSAYO DE DIFERENCIACION CELULAR

La diferenciación celular fué evaluada por medio de 3 métodos: 1) determinación de receptores Fc, 2) fagocitosis de partículas de látex y 3) secreción de lisozima.

1) Determinación de receptores Fc

Los receptores Fc fueron evaluados mediante la técnica de formación de rosetas (EA) (104). Para ello IgG de conejo dirigida contra eritrocitos de carnero (Laboratorios Cordis, Miami Florida, EEUU), fué diluído 1:1600 en SAF e incubado con eritrocitos de carnero a 37 °C durante 30 minutos. Los eritrocitos recubiertos con anticuerpo (EA) fueron lavados 3 veces en SAF para eliminar el exceso de IgG. Finalmente el EA fue resuspendido en 2 ml de SAF.

Para la evaluación de receptores Fc tanto las células leucémicas humanas, así como las células leucémicas de ratón WR19M.1 y WEHI3BD⁻ se colocaron en presencia de 100 ul de EA por cada ml de muestra empleada. Posteriormente se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos y se incubaron en botón a 37 °C durante 30 minutos. Por último el botón celular fué cuidadosamente resuspendido y el porcentaje de rosetas evaluado mediante la ayuda de un hemocitómetro (American Optical, EEUU).

Se consideró como una roseta a aquella célula en la que se encontraban más de 2 eritrocitos adheridos a su superficie; una roseta débil aquella con 2-5 eritrocitos y una roseta fuerte aquella con más de 5 eritrocitos, evaluándose el total como la suma de débiles y fuertes. Las rosetas se cuantificaron con la ayuda de un hemocitómetro (Clay Adams) y un microscopio compuesto (Carl Zeiss).

2) Fagocitosis de partículas de látex

Para la evaluación de fagocitosis (105), se utilizaron partículas de látex con un diámetro de 0.460 μ (Sigma Chemical). Se lavaron 3 veces en SAF y fueron resuspendidas en MEM a una densidad de 5×10^8 partículas/ml. Tanto las células de WR19M.1 como de WEHI3BD⁻ fueron incubadas durante 60 minutos a 37°C con 100 μ l de latex/ml de células diluidas. Posteriormente, las células fueron lavadas y resuspendidas en MEM. Finalmente, de la suspensión obtenida a una densidad de 1×10^6 células/ml, se realizó un Cytospin (Shandon Southern, EEUU) a 500 g durante 5 minutos. Las preparaciones fueron fijadas en metanol durante 3 minutos y teñidas con Giemsa (Sigma Chemical) a una concentración del 20% durante 20 minutos. Se consideró que una célula había fagocitado, cuando presentaba más de 2 partículas de látex en su interior, el conteo se realizó en un microscopio de fase (Zeiss, Mexico).

3) Secreción de lisozima

Para la evaluación de secreción de lisozima se utilizó el medio condicionado (MC) producido durante 4 días de cultivo por las células de WR19M.1 y WEHI3BD⁻. La secreción de lisozima fue evaluada por el método espectrofotométrico (106) (Apéndice 2); para ello se utilizaron 2.5 ml de una solución de Micrococcus lysodeikticus (Sigma Chemical) en presencia de 0.1 ml de MC de cada línea celular, se mezclaron y se evaluó el decremento de la absorbancia por un intervalo de 1 a 3 minutos en un espectrofotómetro (SP 8-100 Ultraviolet Spectrophotometer, Pye Unicam, EEUU) a una longitud de onda de 450 nm.

Para cuantificar la cantidad de lisozima presente en cada uno de los MCs, los valores fueron comparados con los obtenidos en una curva patrón en donde se utilizaron diferentes concentraciones (de 0.5 a 20 μ g/ml) de una solución patrón de Lisozima de albumina de huevo de gallina (Merck, Alemania) ajustada por regresión potencial (107) (Apéndice 3).

RESULTADOS

Es conocido que en la proliferación y diferenciación de las células mieloides participan diversos factores conocidos como factores estimuladores de colonias o CSFs. Recientemente, ha sido descrita otra serie de factores conocidos como interleucinas; dentro de las que se incluyen la 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, que también participan de manera importante en la regulación de la mielopoiesis (81). Asimismo según avanzan las investigaciones en esta área, nuevas interleucinas van siendo descritas de tal forma que se ha llegado a la número nueve y es probable que en corto tiempo se tengan varias decenas. En un inicio, las interleucinas fueron descritas en relación a una sola función muy específica, recientemente se ha encontrado que participan o coparticipan en otras más. En los resultados que a continuación se analizan, se presentan justamente nuevas propiedades asociadas a las interleucinas 1 y 2. Debido a que existe una gran heterogeneidad en la forma como se designan todos estos factores, a lo largo de este trabajo utilizamos una nomenclatura que actualmente se emplea y que abarca a todos los factores de crecimiento hematopoyético (HGFs).

EPCO DE LAS INTERLEUCINAS 1 Y 2 RECOMBINANTES HUMANAS (rhIL-1 E rhIL-2) EN LA PROLIFERACION DE CELULAS LEUCEMICAS DE BRYON.

La IL-1 fué originalmente descrita como una molécula producida por los macrófagos (108) que participaba en la inducción a la proliferación de linfocitos T, mediada por la IL-2 (109). Sin embargo recientemente, estas dos moléculas han sido asociadas tanto en la proliferación como en la diferenciación de células mieloides. Con la finalidad de determinar si las interleucinas 1 y 2 recombinantes humanas (rhIL-1, rhIL-2) tienen algún efecto de inducción a la proliferación en células mieloides, se utilizaron las líneas leucémicas WR19M.1 de tipo macrófágico y la WEHI3BD⁻ de tipo mielomonocítico. Para ello, se incubaron durante 4 días 2.5×10^3 células de la WR19M.1 y 2.5×10^4 de la WEHI3BD⁻ en presencia de 12 ng/ml de rhIL-1 y de

1000 U/ml de rhIL-2. Como control negativo se utilizó un cultivo sin inductores y como controles positivos 200 U/ml de rhGM-CSF y 20 ug/ml de rhG-CSF. Al término del periodo de incubación la proliferación fué evaluada mediante conteo celular.

Los resultados obtenidos muestran que la rhIL-2 tiene un fuerte efecto de inducción a la proliferación en ambas líneas leucémicas (Tabla 1). En efecto el número celular se incrementa respecto a los cultivos sin inductores en ambas líneas en casi el doble para la WEHI3BD⁻ y casi tres veces en la NR194.1. Como era de esperarse, ambas líneas celulares también presentaron un importante efecto inductor con el rhGM-CSF y con rhG-CSF. Asimismo, es importante comentar que la rhIL-1 aparte de que no estimula la proliferación de estas dos líneas leucémicas, resultó ser inhibitoria para la WEHI3BD⁻.

EFFECTO DE LAS INTERLEUCINAS 1 Y 2 RECOMBINANTES HUMANAS (rhIL-1 Y rhIL-2) EN LA INDUCCIÓN DE RECEPTORES PARA Fc EN CÉLULAS LEUCÉMICAS DE RATÓN.

Una vez encontrado que la rhIL-2 es capaz de estimular la proliferación de células leucémicas de tipo mielóide, se procedió a evaluar la posible capacidad de inducción a la diferenciación sobre estas mismas células tanto por la rhIL-1 como por la rhIL-2. Para estos experimentos se emplearon las mismas concentraciones de los factores recombinantes, así como de los controles positivos durante 4 días de cultivo. En esta ocasión, para evaluar el efecto diferenciador de los diversos factores recombinantes se determinó la aparición de receptores para Fc en la membrana de las células. Esta inducción fué evaluada mediante la técnica de rosetas para EA. La actividad de inducción de receptores Fc se vió fuertemente incrementada cuando las células de NR194.1 y WEHI3BD⁻ se cultivaron en presencia de rhIL-1 (Tabla 2). Para esta evaluación se utilizó el criterio de llamar roseta débil cuando se encontraban adheridos a las células entre 2 y 5 eritrocitos, mientras que rosetas fuertes cuando el número de eritrocitos adheridos era superior a 5. Es importante mencionar, que aunque los valores de receptores para Fc en las células sin inductor fué variable para la línea NR194.1 en los ensayos realizados, los valores de estos receptores inducidos por la rhIL-1 fueron muy homogéneos y mucho mayores que para el control negativo (Tabla 2). Por otro lado, mencionaremos que la línea WEHI3BD⁻ presentaba muy bajos niveles de receptores para Fc en ausencia de inductores y que ésta aumento a casi el 90% en

Tabla 1. Efecto de los factores de crecimiento hematopoyético rhIL-1, rhIL-2, rhGM-CSF y rhG-CSF sobre la proliferación celular de la línea transformada de tipo macrófagico WR194.1 y de la línea leucémica mielomonocítica WEHI3B⁻.

* Inductores	Número Celular	
	WR194.1 x 10 ²	WEHI3B ⁻ x 10 ⁴
-	116 ± 5	135 ± 15
rhIL-1	123 ± 7	13 ± 1
rhIL-2	290 ± 29	255 ± 15
rhGM-CSF	297 ± 22	265 ± 15
rhG-CSF	285 ± 10	200 ± 10

* (-), Control sin inductores; (rhIL-1), Interleucina-1 recombinante humana; (rhIL-2), Interleucina-2 recombinante humana; (rhGM-CSF), Factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos recombinante humano; (rhG-CSF), Factor estimulador de colonias de granulocitos recombinante humano.

Tabla 2. Efecto de los factores de crecimiento hematopoyético rhIL-1, rhIL-2, rhGM-CSF y rhG-CSF sobre la aparición de receptores para Fc por medio de rosetaje de eritrocitos de carnero cubiertos con anticuerpo (EA) en la línea transformada de tipo macrófágico WR19M.1 y en la línea leucémica mielomonocítica WEHI3BD⁻.

Línea	Inductores *	Rosetas (%)					
		Ensayo No. 1			Ensayo No. 2		
		Débiles	Fuertes	Totales	Débiles	Fuertes	Totales
WR19M.1	-	18 ± 2	10 ± 5	28 ± 2	5 ± 0	5 ± 1	10 ± 1
	rhIL-1	33 ± 1	29 ± 3	63 ± 3	27 ± 1	33 ± 3	61 ± 2
	rhIL-2	16 ± 3	7 ± 2	22 ± 5	7 ± 1	3 ± 1	10 ± 2
	rhGM-CSF	16 ± 1	7 ± 1	23 ± 1	12 ± 0	2 ± 0	14 ± 0
	rhG-CSF	13 ± 1	11 ± 1	23 ± 1	13 ± 5	10 ± 5	22 ± 0
WEHI3BD ⁻	-	2 ± 0	1 ± 1	3 ± 1	2 ± 1	0	2 ± 1
	rhIL-1	20 ± 4	66 ± 13	86 ± 9	26 ± 4	50 ± 1	76 ± 5
	rhIL-2	0	0	0	0	0	0
	rhGM-CSF	0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 0	2 ± 1
	rhG-CSF	0	0	0	1 ± 1	0	1 ± 1

* (-), Control sin inductores; (rhIL-1), Interleucina-1 recombinante humana; (rhIL-2), Interleucina-2 recombinante humana; (rhIL-2), Interleucina-2 recombinante humana; (rhGM-CSF), Factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos recombinante humano; (rhG-CSF), Factor estimulador de colonias de granulocitos recombinante humano.

Rosetas débiles de 2 a 5 eritrocitos de carnero adheridos a la superficie celular; rosetas fuertes, más de 5 eritrocitos de carnero adheridos; rosetas totales, suma de rosetas débiles y fuertes.

presencia de rhIL-1. Es interesante hacer notar que los factores recombinantes que fueron buenos inductores a la proliferación fueron malos inductores a la diferenciación, al menos de la inducción de receptores para Fc.

Es conocido que algunos factores hematopoyéticos como los CSFs tienen que estar presentes durante todo el periodo de inducción para que su efecto se lleve a cabo (110), mientras que otros como la eritropoyetina (Epo) solo tienen que estar presentes durante las etapas iniciales de inducción. Con la finalidad de determinar si la presencia de la rhIL-1 era necesaria durante todo el periodo de incubación para inducir la aparición de receptores Fc en las células de la WEHI3BD⁻, se cultivaron nuevamente 2.5×10^4 de estas células durante cuatro días en presencia de 12 ug/ml de rhIL-1, para posteriormente dividir en dos el cultivo colocando la mitad de las células por cuatro días más en ausencia de rhIL-1 y la otra mitad en presencia del factor. Nuestros resultados indican que la presencia del factor es necesaria durante todo el proceso de inducción, puesto que en el cultivo en el cual la rhIL-1 fue eliminada, el porcentaje de receptores para Fc disminuyó fuertemente a solo 3% (Tabla 3). Este experimento fue repetido utilizando solo 6 ug/ml de rhIL-1, encontrándose el mismo tipo de resultado aunque como era de esperarse una inducción menor que cuando se utilizaron 12 ug/ml de dicho factor (Tabla 3).

DOSIS-RESPUESTA DE LA INDUCCIÓN DE RECEPTORES PARA Fc EN MACRÓFAGOS DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATÓN.

Una vez que se determinó que en líneas leucémicas mieloides la rhIL-1 era capaz de inducir a la aparición de receptores para Fc, se procedió a determinar si este mismo factor era capaz de inducir a células normales; para ello, se utilizaron 4×10^5 macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón y se cultivaron en presencia de 12 ng/ml de rhIL-1 durante 2 días. Nuestros resultados indican, que también células normales de tipo macrofágico son susceptibles de ser inducidas a expresar receptores para Fc por la rhIL-1 (Tabla 4). Por otro lado, para determinar la dosis respuesta de este factor en dicha inducción se sembraron 4×10^5 macrófagos en presencia de 0.0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3, 6 y 12 ug/ml de este factor durante 2 días de cultivo. Los resultados demuestran que dicha inducción requiere de cantidades muy pequeñas del inductor. En efecto con solo 0.2 ug/ml se obtuvo

Tabla 3. Efecto de la rhIL-1 sobre la aparición de receptores para Fc por medio de rosetaje de eritrocitos de carnero cubiertos con anticuerpo (EA) en la línea leucémica mielomonocítica WEHI3BD⁻, después de cultivarse durante 4 días en presencia de rhIL-1.

Inductores *	Rosetas (#)					
	Ensayo No. 1			Ensayo No. 2		
	Débiles	Fuertes	Totales	Débiles	Fuertes	Totales
-	5 ± 2	0	5 ± 2	2 ± 2	1 ± 0	3 ± 2
rhIL-1	21 ± 3	20 ± 4	41 ± 1	29 ± 2	34 ± 2	62 ± 0

* (-), Control sin inductores; (rhIL-1), Interleucina-1 recombinante humana. Rosetas débiles, de 2 a 5 eritrocitos adheridos a la superficie celular; rosetas fuertes, más de 5 eritrocitos adheridos; rosetas totales, suma de rosetas débiles y fuertes. Las células fueron previamente incubadas con 12 ng/ml de rhIL-1 durante 4 días, lavadas y cultivadas nuevamente en ausencia (-) y presencia de 6 ng/ml de rhIL-1 para el ensayo No. 1 y con 12 ng/ml para el ensayo No. 2 durante 4 días.

Tabla 4. Efecto de la rhIL-1 sobre la aparición de receptores para Fc por medio de rosetaje de eritrocitos de carnero cubiertos con anticuerpo (EA) en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón.

* Inductores	Rosetas (%)		
	Débiles	Fuertes	Totales
-	3 ± 1	13 ± 1	16 ± 2.0
rhIL-1	2 ± 0	38 ± 2	40 ± 2.0
rhIL-2	1 ± 0	11 ± 0	12 ± 1.0
rhG-CSF	2 ± 0	11 ± 1	13 ± 1.0
rhM-CSF	4 ± 1	18 ± 1	22 ± 1.0
rhIFN-γ	1 ± 0	19 ± 2	20 ± 1.0
rhIL-1+rhM-CSF	3 ± 2	24 ± 1	27 ± 3.0

* (-), Control sin inductores; (rhIL-1), Interleucina-1 recombinante humana; (rhIL-2), Interleucina-2 recombinante humana; (rhG-CSF), Factor estimulador de colonias de granulocitos recombinante humano; (rhM-CSF), Factor estimulador de colonias de macrófagos recombinante humano; (rhIFN-γ), Interferon gamma recombinante humano.

Se sembraron 4×10^5 células en presencia de 12 ng/ml de rhIL-1.

Rosetas débiles, de 2 a 5 eritrocitos adheridos a la superficie celular; rosetas fuertes mas de 5 eritrocitos adheridos; rosetas totales, suma de rosetas débiles más fuertes.

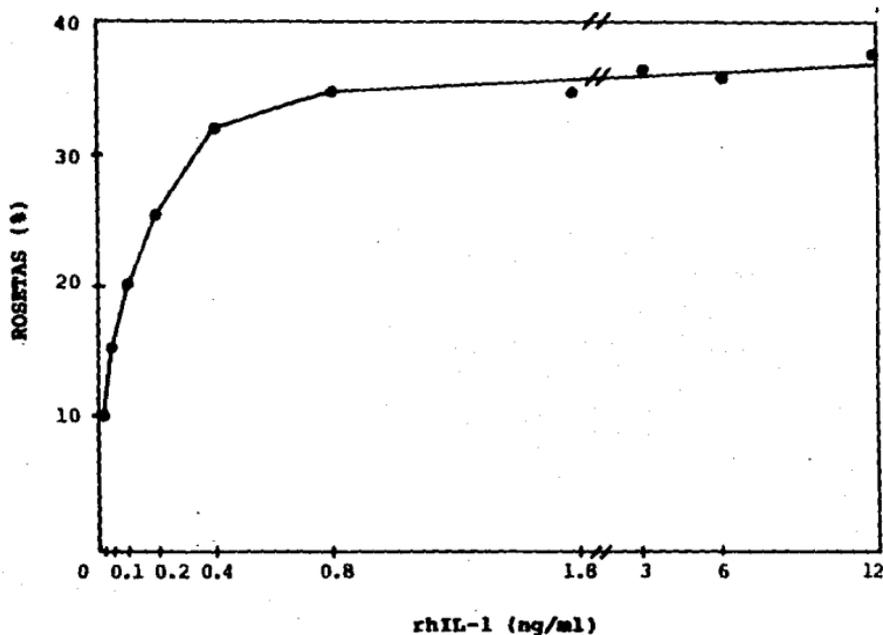
un 50% más de receptores para Fc que en el cultivo sin inductor (Figura 1). Por otro lado, la curva dosis-respuesta nos muestra que con solo 0.8 ug/ml de rhIL-1 era suficiente para llegar a un máximo de inducción, pues es justamente a esta concentración del factor que se llega a obtener un 35% de receptores para Fc en este tipo de células macrofágicas (111).

EFEECTO DE LA rhIL-1 EN LA INDUCCION DE RECEPTORES PARA Fc EN CELULAS LEUCEMICAS HUMANAS.

Uno de los principales problemas que enfrenta un paciente con una leucemia, es el gran riesgo de sufrir un proceso infeccioso (8). Si tomamos en cuenta que la leucemia afecta directamente a las células encargadas de la defensa del organismo contra cuerpos extraños, resulta evidente que el paciente se encuentra más expuesto a los efectos nocivos de agentes patógenos. En la terapia clásica de este tipo de enfermedades se suministra a los pacientes drogas citotóxicas que tienen la función de eliminar a células malignas, pero que simultáneamente eliminan a las normales, aumentando de esta forma el riesgo de infección de dichos pacientes. Como se ha demostrado a lo largo de este trabajo, la rhIL-1 tiene la propiedad de inducir a células leucémicas de ratón a expresar receptores para Fc, por lo que sería de gran interés el evaluar si este mismo factor es también capaz de inducir a células leucémicas humanas. Si tomamos en cuenta que la defensa contra organismos patógenos que afectan a pacientes leucémicos comienza por el reconocimiento de éstos por receptores Fc de membrana, un aumento que pudiera ser inducido por la IL-1 resultaría de grandes ventajas.

Para evaluar el posible efecto inductor a la expresión de receptores Fc en células leucémicas de origen humano se tomaron tres muestras de sangre periférica; dos de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) tipo M2 y una de un paciente con leucemia granulocítica crónica (LGC). El número de células sembradas dependió del tamaño de la muestra obtenida, de tal forma que se pudieron sembrar 6.2×10^5 células en el experimento con la leucemia tipo LGC, mientras que solo 5×10^5 y 4×10^5 células para la LMA. Las distintas células fueron incubadas durante 4 días en ausencia y presencia de 0.8 ug/ml de rhIL-1. Esta dosis de rhIL-1, fué tomada de acuerdo a la dosis de saturación obtenida durante el experimento de dosis-respuesta para la inducción de

Figura 1. Curva dosis-respuesta de la concentración de rhIL-1 sobre la aparición de receptores para Fc en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón.



(rhIL-1), Interleucina-1 recombinante humana.

Se sembraron 4×10^5 macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón en presencia de diferentes concentraciones de rhIL-1 durante 2 días.

receptores para Fc en macrófagos de este trabajo. Como un experimento adicional, en los ensayos con las células de LMA se agregó un cultivo con 20 U/ml rhIFN- γ (del inglés, recombinant human interferon-gamma. La razón de utilizar rhIFN- γ radica en el hecho de que se ha descrito como un inductor de receptores para Fc monomérico (112) y por tanto, se esperaba que funcionara como un control positivo del experimento. Nuestros resultados indican que las células leucémicas humanas presentaban un muy bajo número de receptores para Fc y que aunque hubo un aumento de este número cuando las células se cultivaron en presencia de rhIL-1, éste fué muy pequeño (Tabla 5).

EFFECTO DE LAS INTERLEUCINAS 1 Y 2 RECOMBINANTES HUMANAS (rhIL-1 E rhIL-2) EN LA INDUCCION DE FAGOCITOSIS Y SECRECION DE LISOSOMA EN CELULAS LEUCEMICAS DE RATON.

De las dos líneas leucémicas empleadas a lo largo de este trabajo, la WEHI3BD⁻ resultó ser la más afectada por la rhIL-1. En efecto, cuando se evaluó el efecto de este factor sobre la proliferación celular (Tabla 1), se obtuvo una muy importante inhibición. Como la inhibición a la proliferación está normalmente asociada a un aumento en la diferenciación celular, consideramos que posiblemente este hecho refleje que la rhIL-1 sea un factor capaz de inducir propiedades de diferenciación en estas células. Este hecho se confirmó en parte debido a que las células de la WEHI3BD⁻ resultaron ser extremadamente inducibles a expresar receptores para Fc, observándose una casi total ausencia de estos receptores en los controles sin inductores y valores cercanos al 90% cuando eran estimuladas con rhIL-1 (Tabla 2). Puesto que la expresión de receptores para Fc en una célula mielóide trae como consecuencia el permitir a la célula participar en la inmunofagocitosis, se creyó conveniente el evaluar si también la rhIL-1 podía inducir a la célula mielóide a participar en los procesos de fagocitosis inespecífica. Se ha comprobado, que tanto los granulocitos como los macrófagos pueden fagocitar a través de sus receptores inespecíficos como la Fc y la C3 (113,114,115), pero que también pueden fagocitar inespecíficamente. Esta fagocitosis inespecífica le confiere a la célula mielóide la capacidad de ser la primera línea de defensa para eliminar cuerpos extraños, antes de la participación de los procesos inespecíficos tardíos, garantizando de esta manera la integridad del organismo.

Con la finalidad de evaluar si la rhIL-1 era capaz de inducir aparte de

Tabla 5. Determinación de la aparición de receptores para Fc por medio de rosetaje de eritrocitos de carnero cubiertos con anticuerpo (EA) en las células blásticas de sangre periférica de dos pacientes con Leucemia Mieloide Aguda (LMA) del tipo M2 y en un paciente con Leucemia Granulocítica Crónica (LGC).

Muestra	Inductores *	Rosetas (%)		
		Débiles	Fuertes	Totales
No.1	-	2.4 ± 1.0	1.1 ± 0.2	3.5 ± 1.2
LMA	rhIL-1	3.4 ± 1.1	2.7 ± 0.4	6.2 ± 1.5
M2	rhIFN-γ	1.1 ± 0.7	1.8 ± 0.9	2.9 ± 0.2
No.2	-	0	0	0
LMA	rhIL-1	1.1 ± 0.1	0.2 ± 0	1.3 ± 0.1
M2	rhIFN-γ	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.6 ± 0.3
LGC	-	0.5 ± 0.5	0.5 ± 0.5	0.5 ± 0
	rhIL-1	2.8 ± 0.8	1.3 ± 0.3	3.5 ± 0.5

* (-), Control sin inductores; (rhIL-1), Interleucina-1 recombinante humana; (rhIFN-γ), Interferon gamma recombinante humano.

Muestra No.1: Se sembraron 5×10^5 células/pozo de 1 ml en RPMI 1640 al 10% de Suero Fetal de Bovino (SFB).

Muestra No.2: Se sembraron 4×10^5 células/pozo de 1 ml en RPMI 1640 al 10% de SFB.

LGC: Se sembraron 6.2×10^5 células/pozo de 1 ml en RPMI 1640 al 10% de SFB.

Para todas las muestras se utilizaron 0.75 ng/ml de rhIL-1 y 20 U/ml de rhIFN-γ.

la fagocitosis específica a través del receptor Fc, la fagocitosis inespecífica, en este trabajo se determinó la capacidad de fagocitar partículas de látex, utilizándose para ello la línea celular WEHI3B⁻ que como se ha demostrado en este trabajo, es una línea muy sensible a la acción diferenciadora de la rhIL-1. Se sembraron 2.5×10^4 células las cuales se cultivaron en presencia de 12 ng/ml de IL-1 durante 4 días. Como control positivo se emplearon 20 ug/ml de rhG-CSF, y como control negativo un cultivo sin inductores. Como puede observarse (Tabla 6) la rhIL-1 estimuló importantemente la actividad fagocítica de esta línea leucémica.

Una vez que pudimos determinar que la rhIL-1 era capaz de inducir tanto la expresión de receptores para Fc asociada a la fagocitosis específica, como la inespecífica, procedimos a evaluar si también poseía la capacidad de inducir otro tipo de propiedad diferenciadora en células mieloides. Para ello se determinó si era capaz de inducir la secreción de lisozima. La producción de este tipo de enzima juega un papel muy importante en los mecanismos de defensa contra organismos extraños, pues contribuye a digerir las paredes de muchos tipos de bacterias (116). Para ello utilizamos el medio condicionado de los cultivos celulares tanto en ausencia como en presencia de 12 ng/ml de rhIL-1. Se emplearon también 2.5×10^4 células leucémicas durante 4 días, así como 200 U/ml de rhGM-CSF, 20 ug/ml de rhG-CSF y 1000 U/ml de rhIL-2. Como las células de la WEHI3B⁻ resultaron ser no inducibles por la rhIL-1 para la secreción de lisozima (Tabla 7), empleamos también células de la WR19M.1 para determinar si esta ausencia de inducción era de carácter más general. Nuestros resultados indican que ninguno de los tipos celulares empleados secretaron al medio de cultivo lisozima al ser cultivados en presencia de rhIL-1 y de los otros factores recombinantes (Tabla 7).

EFEECTO DE LA rhIL-2 SOBRE LA PROLIFERACION DE MACROFAGOS RESIDENTES E INDUCIDOS DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATON.

Con la finalidad de determinar si el efecto proliferador de la rhIL-2 observado en las líneas WR19M.1 y WEHI3B⁻ es exclusivo de células transformadas de origen murino o también se presenta en células normales pertenecientes al mismo linaje monocítico, se utilizaron células normales de origen murino como lo son los macrófagos residentes e inducidos de la cavidad peritoneal y se cultivaron en suspensión durante 4 días. Para ello se

Tabla 6. Efecto de los factores de crecimiento hematopoyético rhIL-1, rhIL-2, rhGM-CSF y rhG-CSF sobre la fagocitosis de partículas de látex en la línea leucémica mielomonocítica WEHI3BD⁻.

Inductores *	Fagocitosis (%)					
	Ensayo No. 1			Ensayo No. 2		
	Menos de 5	Más de 5	Total	Menos de 5	Más de 5	Total
-	0.5 ± 0.5	6 ± 1	6.5 ± 0.5	0.5 ± 0.5	2.0 ± 0	2.5 ± 0.5
rhIL-1	1 ± 1	21.5 ± 1	23 ± 3	7.9 ± 0.7	15.6 ± 4.1	23.4 ± 3.4
rhG-CSF	1.5 ± 0.5	18 ± 1	19.5 ± 0.5	3 ± 0.5	7 ± 1	10 ± 1.5

* (-), Control sin inductores; (rhIL-1), Interleucina-1 recombinante humana; (rhIL-2), Interleucina-2 recombinante humana; (rhGM-CSF), Factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos recombinante humano; (rhG-CSF), Factor estimulador de colonias de granulocitos recombinante humano.
La escala de fagocitosis fue la siguiente: menos de 5 partículas de látex ingeridas, más de 5 partículas ingeridas y total, menos de 5 y más de 5 partículas de látex.

Tabla 7. Efecto de los factores de crecimiento hematopoyético rhIL-1, rhIL-2, rhGM-CSF y rhG-CSF sobre la secreción de lisozima en la línea transformada de tipo macrófágico WR19M.1 y en la línea leucémica mielomonocítica WEHI3BD⁻.

Inductores *	Lisozima (ug)			
	WR19M.1		WEHI3BD ⁻	
	Ensayo No.1	Ensayo No.2	Ensayo No.1	Ensayo No.2
-	2.747	2.957	2.032	1.936
rhIL-1	2.475	2.957	1.915	1.849
rhIL-2	2.927	2.555	1.941	1.861
rhGM-CSF	2.500	2.957	1.889	1.826
rhG-CSF	3.022	2.500	1.918	1.857

* (-), Control sin inductores; (rhIL-1), Interleucina-1 recombinante humana; (rhIL-2), Interleucina-2 recombinante humana; (rhGM-CSF), Factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos recombinante humano; (rhG-CSF), Factor estimulador de colonias de granulocitos recombinante humano.

sembraron 2.5×10^3 macrófagos residentes y 1.8×10^3 macrófagos inducidos de la cavidad peritoneal en presencia de 1000 U/ml de rhIL-2. Como controles positivos de este experimento, se utilizaron 2 ng/ml de rhM-CSF, el cual es conocido como un factor de crecimiento para células del linaje monocito-macrófago en diferentes estadios de diferenciación (77,87), y 2000 U/ml de interferon (IFN- γ), el cual se sabe es capaz de estimular la expresión de receptores para IL-2 en células macrofágicas (117). Es conocido, que muchos de los factores de crecimiento hematopoyético pueden actuar sinérgicamente con otros y aumentar su actividad biológica por encima de los valores alcanzados cuando son utilizados solos (2,118). Para ello se utilizaron combinaciones de rhM-CSF+rhIL-2, rhINF- γ +rhIL-2 así como de rhM-CSF+rhIL-2+rhINF- γ para evaluar el posible efecto sinérgico de estos factores en la proliferación de macrófagos residentes e inducidos de la cavidad peritoneal. Como control negativo, se utilizó un ensayo con únicamente medio de cultivo. Los resultados demuestran que no existe ningún efecto evidente de la rhIL-2 ni de ninguno de los demás factores recombinantes empleados sobre la actividad proliferativa de ambos tipos de células macrofágicas (Tabla 8). Asimismo, no se observa un efecto sinérgico entre las diferentes combinaciones de factores recombinantes utilizadas.

Como el efecto de los factores recombinantes sobre estas células macrofágicas no fué significativo en cultivo en suspensión, se utilizó el cultivo en bicapa de agár que es un ensayo mas preciso para detectar la proliferación celular, ya que una sola célula con alta capacidad proliferativa puede originar una colonia. Para ello se cultivaron 1×10^5 macrófagos residentes e inducidos de cavidad peritoneal de ratón durante 7 días en bicapa de agár en presencia de los mismos factores recombinantes a las mismas concentraciones y se evaluó la proliferación celular por medio de la formación de colonias. Como puede observarse de los resultados obtenidos (Tabla 9), la única población que responde a rhIL-2 (aunque esta respuesta no es muy fuerte) es la de macrófagos inducidos, debido a que en los tres ensayos presentados existe un número constante de colonias que para este caso es mayor que los valores encontrados en controles sin inductor, los otros factores recombinantes tanto solos como combinados no estimulan la formación de colonias. En consecuencia se puede decir que la población macrofágica que más responde al estímulo de la rhIL-2 es la más inmadura y que en este caso es la de macrófagos inducidos, en comparación con la población de macrófagos residentes que es una población más diferenciada. Además de que el efecto de la

Tabla 8. Efecto de la rhIL-2 sobre la proliferación de macrófagos residentes e inducidos de cavidad peritoneal de ratón en cultivo en suspensión.

* Inductores	Número Celular x 10 ⁴	
	Macrófagos Residentes	Macrófagos Inducidos
-	36 ± 1	47 ± 1
rhM-CSF	28 ± 2	59 ± 6
rhIL-2	36 ± 1	55 ± 1
rhIFN-γ	45 ± 2	44 ± 3
rhM-CSF+rhIL-2	34 ± 3	62 ± 1
rhIFN-γ +rhIL-2	43 ± 1	52 ± 14
rhM-CSF+rhIFN-γ +rhIL-2	42 ± 2	44 ± 1

* (-), Control sin inductores; (rhM-CSF), Factor estimulador de colonias de macrófagos recombinante humano, (rhIL-2), Interleucina-2 recombinante humana, (rhIFN-γ), Interferon gamma recombinante humano.

Ensayo No.1: El número inicial de células fué de 2525 x 10³ células/pozo (250 ul) para macrófagos residentes y de 1813 x 10³ células/pozo (250 ul) para macrófagos inducidos en Medio Esencial Mínimo (MEM) al 10% de Suero de Caballo (SC). La evaluación fué realizada a los 4 días de cultivo.

Ensayo No.2: Para macrófagos residentes el número inicial de células fué de 691 x 10³ células/pozo (250 ul) y para macrófagos inducidos de 600 x 10³ células/pozo (250 ul) en MEM al 10% de SC. La evaluación fué realizada a los 6 días de cultivo.

Las concentraciones de los inductores para ambos ensayos fueron: 2 ng/ml de rhM-CSF, 1000 U/ml de rhIL-2 y 2000 U/ml de rhIFN-γ

Tabla 9. Efecto de la rhIL-2 sobre la proliferación de macrófagos residentes e inducidos de cavidad peritoneal de ratón en cultivo en bicapa de agar.

* Inductores	Número de Colonias				
	Macrófagos Residentes		Macrófagos Inducidos		
	Ensayo No.1	Ensayo No.2	Ensayo No.1	Ensayo No.2	Ensayo No.3
-	0	0	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 0
rhM-CSF	0	0	4 ± 0	3 ± 1	4 ± 1
rhIL-2	0	0	5 ± 2	8 ± 2	6 ± 4
rhIFN-γ	0	0	4 ± 1	2 ± 1	1 ± 0
rhM-CSF+rhIL-2	0	1 ± 0	ND	4 ± 3	5 ± 4
rhIFN-γ+rhIL-2	0	1 ± 0	6 ± 1	2 ± 2	1 ± 0
rhM-CSF+rhIFN-γ+rhIL-2	0	0	3 ± 0	5 ± 4	5 ± 1

* (-), Control sin inductores; (rhM-CSF), Factor estimulador de colonias de macrófagos recombinante humano; (rhIL-2), Interleucina-2 recombinante humana; (rhIFN-γ), Interferon gamma recombinante humano; (ND), Valor no determinado.

Se sembraron 1×10^5 células/pozo (0.75 ml). Se utilizaron 2.5 ng/ml de rhM-CSF, 1000 U/ml de rhIL-2 y 2000 U/ml de rhIFN-γ. La evaluación se realizó a los 7 días de cultivo.

rhIL-2 sobre la proliferación celular no es exclusivo de células transformadas, sino también se presenta para células normales.

DISCUSION

Se sabe que para un adecuado suministro de células sanguíneas de novo, participan ciertos factores humorales conocidos como factores de crecimiento hematopoyético (HGFs) que regulan fisiológicamente el crecimiento, viabilidad y diferenciación de las células mieloides hematopoyéticas (78,85). A lo largo de 2 décadas, los HGFs han sido denominados de acuerdo a las funciones específicas que realizaban; así, el factor que afectaba exclusivamente la proliferación y diferenciación de macrófagos y granulocitos fué designado como MGI (74); los factores que eran capaces de inducir proliferación y diferenciación de células precursoras hematopoyéticas en cultivos en medio semisólido, fueron llamados CSFs (75,76,77,78) o CSA (79). Recientemente, ha sido designado un nuevo grupo de factores que no son capaces de inducir la formación de colonias por células progenitoras en agár, pero que tienen un papel muy importante en la regulación de la hematopoyesis. Este nuevo grupo es conocido con el nombre de citocinas (99), en donde se encuentran las interleucinas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9. Dentro de este inmenso grupo de HGFs, algunos se han destacado por inducir únicamente la proliferación o la diferenciación de las células hematopoyéticas, mientras que otros han mostrado la capacidad de inducir ambas actividades.

El grupo de los CSFs está caracterizado por 5 moléculas que son: Interleucina-3 (IL-3), que participa en estadios iniciales del desarrollo hematopoyético (11); factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CSF), que actúa en etapas intermedias (12); factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) (13) y factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) (90), que actúan a etapas de diferenciación terminal y eritropoyetina (Epo) (14) que controla la proliferación y diferenciación de eritrocitos, megacariocitos y progenitores de macrófagos-granulocitos, y para algunas células tallo pluripotentes; siendo su acción descrita solo en el sistema hematopoyético. Recientemente ha sido mostrado que interleucinas involucradas en la regulación linfoide, son también activas sobre células mieloides (28,29).

La IL-1, una glucoproteína de 17000 daltones, es principalmente producida por los macrófagos en respuesta a una infección (30), pero es también sintetizada por los tejidos epitelial, epidermal y vascular (60). Fué

primeramente descrita como un factor importante en regular respuestas tanto inmunológicas como inflamatorias (31,32), y como un importante participante pero de manera indirecta, en la proliferación de células progenitoras tempranas al estimular su entrada al ciclo celular (119). In vitro, su acción es sinérgica con más CSFs y podría por lo tanto, tener algunas aplicaciones terapéuticas en asociación con el GM-CSF o el G-CSF (120).

Por otra parte, la IL-2 es una glucoproteína de peso molecular de aproximadamente 15-17000 daltones (29) que primeramente fué descrita como un factor de crecimiento de células T (2) y como regulador de ciertas respuestas inmunológicas in vitro (3). Asimismo, se ha visto que existen varias subpoblaciones que responden a IL-2 tales como: 1) células T en reposo y activadas (121,122), 2) células asesinas naturales (NK) (123,124), 3) células B activadas (125,126) y 4) clones derivados de líneas celulares dependientes de IL-3 (127,128). Recientemente se ha demostrado, que la IL-2 es capaz de interactuar con células no pertenecientes al linaje linfóide, ya que puede influir en la proliferación y diferenciación de precursores mieloides. Prueba de ello, es la inducción de la proliferación en precursores de macrófagos de médula ósea de ratón (29).

La disposición de grandes cantidades de los HGFs recombinantes puros tanto de ratón como de humano y el aislamiento de líneas celulares, hacen posible el estudio in vitro de la interacción de estos factores sobre células mieloides hematopoyéticas.

Día con día, nuevas actividades biológicas y aplicaciones terapéuticas para los diferentes HGFs van siendo descubiertas. Algunos HGFs muy recientemente, han sido considerados para el soporte y cuidado de mielosupresión en pacientes con leucemia mielóide aguda (LMA) (129); sin embargo, el papel de los HGFs y su producción por células leucémicas humanas en el proceso de transformación permanece incierto. Por lo tanto, estudios suficientes sobre los efectos de los HGFs sobre células blásticas leucémicas son necesarios para que estos factores puedan ser usados clínicamente en pacientes con LMA.

El uso de HGFs hace posible el entendimiento del ciclo de factores múltiples o individuales in vitro e in vivo en las células blásticas leucémicas (130).

Debido a la dificultad de mantener en cultivo in vitro células leucémicas humanas de LMA, y a la necesidad de determinar el efecto de los HGFs sobre el comportamiento biológico de éstas células malignas; en este trabajo, se

evaluó el efecto que tiene la rIL-1 y la rIL-2 en la proliferación y diferenciación de 2 líneas celulares de ratón con crecimiento autónomo: la línea transformada de tipo macrófago WR19M.1 y la línea leucémica mielomonocítica WEHI3B^{D-}.

Los resultados obtenidos demuestran, que la rIL-1 tiene un fuerte efecto en la inducción de la diferenciación específica en WR19M.1, en WEHI3B^{D-}, en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón, y muy ligeramente en dos pacientes con LMA del tipo M2 y en un paciente con leucemia granulocítica crónica (LGC), debido a que estimula la aparición de receptores para Fc. Además, induce la diferenciación inespecífica de la línea WEHI3B^{D-}, ya que incrementa la fagocitosis de partículas de látex, presenta un efecto inhibitorio en la proliferación de esta misma línea y no muestra efecto sobre la secreción de lisozima por parte de ambas líneas celulares. En estos resultados, se observa que el efecto de la rIL-1 podría ser exclusiva de células del linaje monocito-macrófago sin afectar de manera importante a células del linaje granulocítico, como es el caso de los pacientes con LMA tipo M2 y LGC. Estos resultados son interesantes, debido a que aun no ha sido descrito el efecto de la rIL-1 en la inducción de receptores para Fc y en la fagocitosis inespecífica en células leucémicas. Evidentemente sería importante determinar si esta interleucina tiene el mismo efecto biológico en células normales del tipo monocito-macrófago, en células del tipo granulocítico y en células leucémicas humanas como sería el caso de la LMA tipo M4 (mielomonocítica) y M5 (monocítica).

Recientemente, en un experimento realizado con ratones a los que se les suministró IL-1 y una dosis letal de bacterias, se observó que los ratones inyectados con IL-1 eran más resistentes a la infección bacteriana que aquellos que fueron utilizados como control y que morían por septicemia (131). De los resultados presentados en el presente trabajo, se podría conjeturar que esta resistencia posiblemente sea consecuencia del enorme incremento de receptores para Fc y del incremento en la actividad fagocítica que produce la rIL-1. Consideramos que este tipo de protección reviste de cierta importancia ya que la rIL-1 podría tener alguna utilidad clínica, sobre todo en pacientes susceptibles de infecciones bacterianas o virales.

En estos resultados también se observó que la rIL-1 es inhibitoria de la proliferación de las células leucémicas de ratón analizadas. De comprobarse este mismo efecto sobre células leucémicas humanas, podría evidentemente tener interés clínico en el tratamiento de LMA. Por otro lado también encontramos

que la rhIL-1 tiene un poderoso efecto diferenciador sobre células leucémicas, debido a que este factor no solo estimula la fagocitosis inespecífica (fagocitosis de partículas de látex), sino también la fagocitosis específica (inducción de receptores para Fc). En consecuencia la rhIL-1 no únicamente tendría la propiedad de detener la proliferación de células leucémicas, sino también la de diferenciarlas funcionalmente ayudando aun más a la curación del paciente. Si tomamos en cuenta que uno de los principales problemas que este tipo de enfermos enfrentan después de quimioterapia o radiación, es la disminución en las defensas inmunológicas y su propensión a infecciones letales (132), el efecto diferenciador inducido por la rhIL-1 sería de extrema utilidad, pues ya que las propias células malignas se encargarían de la eliminación de los microorganismos invasores.

En lo que respecta al efecto de la rhIL-2 sobre estas líneas transformadas, los resultados aquí presentados demuestran que la rhIL-2 tiene un fuerte efecto proliferador sobre las líneas WR19M.1 y WEHI3BD⁻, sin tener ningún efecto en la diferenciación específica en ambas líneas leucémicas. Además también se encontró una ligera inducción en la actividad proliferativa por este factor en células macrofágicas normales inmaduras de la cavidad peritoneal de ratón. Resulta evidente que el estudio del efecto de la rhIL-2 en la proliferación de células transformadas como de células normales en el sistema monocito-macrófago es interesante, debido a que nos permite conocer otros mecanismos diferentes a los conocidos hoy en día involucrados en la regulación de la proliferación monocítica-macrofágica, así como de explicar su posible significado biológico.

Actualmente se ha desarrollado un uso clínico para la IL-2 en la inmunoterapia adoptiva (133,134), ya que se ha visto que puede causar regresión de tumores metastásicos en algunos pacientes con alguna variedad de cánceres refractarios (135,136,137). Este efecto ha sido demostrado tanto en ratones (138,139) como en humanos (140,141) y en diversos tipos de cánceres (142). Los resultados presentados en este trabajo para la rhIL-2, muestran que hay que tener mucho cuidado para la aplicación de este tipo de terapia en leucemias, pues como se mencionó anteriormente este factor es un inductor poderoso a la proliferación de células leucémicas y podría aumentar de manera importante, el número de células transformadas en lugar de eliminarlas. Finalmente, sería importante analizar de comprobarse el efecto proliferador de la rhIL-2 sobre células del linaje macrofágico, su posible aplicación en problemas o padecimientos en los cuales un aumento de este tipo de células sea

de interés. Estas aplicaciones podrían beneficiar a pacientes con anemias o aquellos que han sufrido tratamientos de radio o quimioterapia, en donde se presenta una fuerte eliminación de este tipo de células.

Es importante hacer notar que como era de esperarse el factor (rhIL-1) que mostró un fuerte efecto en la inducción de la diferenciación, no tuvo efecto alguno sobre la actividad proliferativa y que aquel que resultó ser fuertemente proliferador (rhIL-2) no logró inducir a la diferenciación.

Finalmente cabe destacar que en este trabajo se describen nuevos efectos biológicos para la rhIL-1 y para la rhIL-2 que anteriormente no habían sido descritos para estas dos interleucinas. Que estos efectos actúan tanto sobre líneas leucémicas como sobre células normales macrofágicas de ratón. Por último también se describen interesantes y novedosas alternativas de aplicación a nivel clínico. Con el transcurso del tiempo otros HGFs han sido descritos y probablemente muchos más sean descubiertos, todos ellos con interesantes funciones de regulación celular. Creemos por tanto que es importante el continuar con el estudio de todos estos factores para determinar sus efectos sobre la proliferación y diferenciación de diferentes tipos celulares y su posible acción sinérgica con los ya conocidos. Es nuestra firme convicción que este tipo de investigaciones contribuyen y enriquecen el conocimiento de la regulación hematopoyética, dando lugar con ello a la posibilidad de nuevas alternativas de cura para los diferentes padecimientos hematopoyéticos de los que es víctima el ser humano.

REFERENCIAS

- 1 . Wilhams W. J., Beutler E., Ersier A. J., Litchman M. A. Hematology. McGraw-Hill, New York, ed. 3, 1983.
- 2 . Dexter T. M. Haemopoietic growth factors. British Medical Bulletin, 45 (2): 337, 1989.
- 3 . Douer D. Bone marrow failure and hematopoietic growth factors. Israel Journal of Medical Sciences, 25 (4): 183, 1989.
- 4 . Broxmeyer H. E. Biomolecule-cell interaction and the regulation of myelopoiesis. Int. J. Cell. Cloning, 4: 378, 1986.
- 5 . Broxmeyer H. E. Negative regulators of hematopoiesis. Long-Term Bone marrow Culture, p.363, 1984.
- 6 . Testa M. G., Dexter T. M. Haemopoietic growth factors: the role in acute myeloblastic leukaemia. British Medical Bulletin, 45 (2), 1989.
- 7 . Dexter T. M., Spooncer E. Growth and differentiation in the haemopoietic system. Ann. Rev. Cell. Biol., 3: 423, 1987.
- 8 . Laver J., Moore M. A. S. Review. Clinical use of recombinant human hematopoietic growth factors. J. Nat. Canc. Inst., 81 (18): 1370, 1989.
- 9 . Moore M. A. S. The use of hematopoietic growth and differentiation factors for bone marrow stimulation. In Important Advances in Oncology. Philadelphia: Lippincott, p. 31, 1988.
- 10 . Moore M. A. S., Warren D. J. Synergy of interleukin 1 and granulocyte colony-stimulating factor: In vivo stimulation of stem-cell recovery and hematopoietic regeneration following 5-fluouracil treatment of mice. Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7134, 1987.
- 11 . Leary A. G., Yang Y. C., Clark S. C. Recombinant gibbon interleukin 3 supports formation of human multilineage colonies and blast cell colonies in culture: Comparison with recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. Blood, 70: 1343, 1987.
- 12 . Clark S. C. Biological activities of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Int. J. Cell. Cloning, 6: 365, 1988.
- 13 . Welte K., Bonilla M. A., Gabilove J. E. Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor: In vitro and in vivo effects on myelopoiesis. Blood Cells, 13: 17, 1987.
- 14 . Zanjani E. D., Lutton J. D., Hoffman R. Erythroid colony formation by polycythemia vera bone marrow in vitro. Dependence on erythropoietin.

- J. Clin-Invest., 59: 841, 1977.
- 15 . Broxmeyer H. E., Moore M. A. S. Communication between white cells and the abnormalities of this in leukemia. *Biochem. Biophys. Acta*, 615: 129, 1978.
 - 16 . Broxmeyer H. E. Hematopoietic stem cells. The human bone marrow. CRC Publications, p.77, 1982.
 - 17 . Broxmeyer H. E. Granulopoiesis. The human bone marrow. CRC Publications, p.145, 1982.
 - 18 . Metcalf D. Hemopoietic colonies: In vitro cloning of normal and leukemic cell. Springer Verlag, Berlin, 1977.
 - 19 . Burgess A. W., Metcalf D., Russell S. H. M., Nicola N. A. Granulocyte / macrophage - megacaryocyte - eosinophil and erithroid colony stimulating factors produced by mouse spleen cells. *Biochem J.*, 185: 301, 1980.
 - 20 . Ihle J. N., Keller J., Oroszlan S., Henderson L. E., Copeland T. D., Fitch F., Prystowsky M. B., Goldwasser E., Schrader J. W., Palaszynski E., Dy M., Lebel B. Biologic properties of homogeneous interleukin 3. *J. Immunol.*, 131: 282, 1983.
 - 21 . Nicola N. A., Burgess A. W., 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.
 - 22 . Metcalf D. The granulocyte macrophage colony stimulating factors. *Science*, 229: 16, 1985.
 - 23 . Klingemann H. G., Eaves C. J. Colony stimulating factors. *Bone Marrow Transplantation*, 3: 177, 1988.
 - 24 . Clark S. C., Kamen R. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science*, 236: 1229, 1987.
 - 25 . Koeffler H. P., Golde D. W. Human myeloid leukemia cell lines: a Review. *Blood*, 56 (3), 1980.
 - 26 . Nicola N. A., Metcalf D., Matsumoto M., Johnson G. R. *J. Biol. Chem.*, 258: 9017, 1983.
 - 27 . Weisinger G., Sachs L. *EMBO J.*, 2: 2103, 1983.
 - 28 . Benjamin W. R., Tare N. S., Hayes T. J., Becker J. M., Anderson T. D. Regulation of hemopoiesis in myelosuppressed mice by human recombinant IL-1. *J. Immunol.*, 142 (3), 1989.
 - 29 . Baccarini M., Schwinzer R., Lohmann M. L. Effect of human recombinant IL-2 on murine macrophage precursors. *J. Immunol.*, 142 (1): 118, 1989.

- 30 . Zucali J. R., Elfenbein G. J., Bath K. C., Dinarello C. A. Effects of human interleukin 1 and human tumor necrosis factor on human T lymphocyte colony formation. *J. Clin. Invest.*, 80: 772, 1987.
- 31 . Lotem J., Sachs L. In vivo control of differentiation of myeloid leukemic cells by cyclosporine A and recombinant interleukin-1 . *Blood*, 72 (5): 1595, 1988.
- 32 . Dinarello C. A. Interleukin 1. *Rev. Infect. Dis.*, 6: 51, 1984.
- 33 . Clutterbuck E. J., Hirst E. M. A., Sanderson C. J. Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: Comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GM-CSF. *Blood*, 73 (6): 1504, 1989.
- 34 . Smith K. A. *Immunol. Rev.*, 51 (337), 1980; Muraguchi A., Kehrl J. H., Longo D. L., Wolkman D. J., Fauci A. S. *J. Exp. Med.*, 161 (181), 1985.
- 35 . Morgan D. A., Ruscetti F. W., Gallo R. G. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*, 1973 (107), 1976.
- 36 . Gordon M. Y., Barrett A. J., Gordon-Smith E. C. Bone marrow disorders. Blackwell Scientific Publications. London, England, p. 422, 1985.
- 37 . Metcalf D, Moore M. A. S. Haemopoietic cells. North-Holland, Amsterdam, 1971.
- 38 . Trentin J., Wolf N., Cheng V., Fahlberg D. E., Weiss D., Bonhag B. Antibody production by mice repopulated with limited number of clones of lymphoid cell precursors. *J. Immunol.*, 98 (1326), 1967.
- 39 . Abramson S., Miller R. G., Phillips R. A. The identification in adult bone marrow of pluripotential and restricted cells of the myeloid and lymphoid systems. *J. Exp. Med.*, 145 (1567), 1977.
- 40 . Steinman R. M., Lustig D. S., 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.
- 41 . Barclay A. N., Maryrhofer G. Bone marrow origin of Ia-positive cells in the medulla of rat thymus. *J. Exp. Med.*, 153 (1666), 1981.
- 42 . Katz S. I., Tamahi K., Sachs D. H. Epidermal Langerhan's cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature (London)*, 282 (324), 1979.
- 43 . Prelinger J. G., Hood L., Hall S., Prelinger J. a. Mouse epidermal molecules have a bone marrow origin. *Nature (London)*, 282 (321), 1979.
- 44 . Schrader J. W., Lewis S. J., Clark-Lewis I., Culvenor J. G. The

persisting (P) cell: histamine content, regulation by a T cell derived factor, origin from a bone marrow precursor and relationship to mast cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 (323), 1981.

OR78

- 45 . Kitamura Y., Yokoyama Y., Matsuda H., Ohno T. Spleen colony-forming cells as a common precursor for tissue mast cells and granulocytes. Nature (London), 291 (159), 1981.
- 46 . Haller O., Kiessling R., Orn A., Wigzell H. Generation of natural killer cells: an autonomous function of the bone marrow. J. Exp. Med., 145, (1411), 1977.
- 47 . Miller S. C. Production and renewal of murine natural killer cells in the spleen and bone marrow. J. Immunol., 129 (2282), 1982.
- 48 . Till J. E., McCulloch E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal bone marrow cells. Radiat. Res., 14 (213), 1961.
- 49 . Wu A. M., Till J. E., Siminovitch L., McCulloch E. A. A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells. J. Cell. Physiol., 69 (177), 1967.
- 50 . Metcalf D., Nicola N. A. J. Cell. Physiol., 116 (198), 1983.
- 51 . Wu A. M., Till J. E., Simonovitch L., McCulloch E. A. Cytological evidence for a relationship between normal hemopoietic-colony forming cells and cells of the lymphoid system. J. Exp. Med., 127 (455), 1968.
- 52 . Iscove N. N. The role of erythropoietin in regulation of population size and cell cycling of early and late erythroid precursors in mouse bone marrow. Cell Tissue Kinet. 10: 139, 1977.
- 53 . Spivak J. L. The mechanism of action of erythropoietin. Int. J. Cell. Cloning, 4: 139, 1986.
- 54 . Messner H. A. Human stem cells in culture. Clin. Lab. Haematol., 13: 393, 1984.
- 55 . Pike B. L., Robinson W. A. Human bone marrow colony growth in agar gel. J. Cell. Biol., 76: 770, 1970.
- 56 . Dexter T. M., Testa N. G. Differentiation and proliferation of hematopoietic cells in culture. Methods Cell. Biol., 14: 387, 1976.
- 57 . Zuckerman K., Wicha M. S. Extracellular matrix production by the adherent cells of long-term murine bone marrow cultures. Blood, 61: 540, 1983.
- 58 . Coulombel L., Eaves A. C., Eaves C. J. Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive

- hemopoietic progenitors in the adherent layer. *Blood*, 62: 291, 1983.
- 59 . Cannistra A. S., Griffin D. J. Regulation of the production and function of granulocytes and monocytes. *Seminars in Hematology*, 25 (3), 1988.
 - 60 . Coulombel L. Recent advances in the biology of human hematopoietic growth factors. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 31: 93, 1989.
 - 61 . Dexter T. M., Allen T. D., Lajtha L. G. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J. Cell. Physiol.*, 91 (335), 1977.
 - 62 . Schrader J. W. Review. Bone marrow differentiation in vitro. *CRC, Crit. Rev. Immunol.*, 4 (3): 197, 1982.
 - 63 . Pluznik D. H., Sachs L. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 66 (319), 1965.
 - 64 . Bradley T. R., Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 44 (297), 1966.
 - 65 . Pluznik D., Sachs L. The induction of clones of normal "mast" cells by a substance from conditioned medium. *Exp. Cell. Res.*, 43(553), 1966.
 - 66 . Bradley T. R., Sumner M. A. Stimulation of mouse bone marrow colony growth in vitro by conditioned medium. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 46 (607), 1966.
 - 67 . Greenberger J. S. Sensitivity of corticosteroid-dependent insulin-resistant lipogenesis in marrow predipocytes of obese-diabetic (db/db) mice. *Nature (London)*, 275 (752), 1978.
 - 68 . Dexter T. M., Spooner E., Toksoz D., Lajtha L. G. The role of cells and their products in the regulation of in vitro stem cell proliferation and granulocyte development. *J. Supramol. Struct.*, 13 (513), 1980.
 - 69 . Schrader J. W., Schrader S. In vitro studies in lymphoid differentiation. I. Long-term in vitro culture of cells giving rise to functional lymphocytes in irradiated mice. *J. Exp. Med.*, 148 (823), 1978.
 - 70 . Jones-Villeneuve E. V., Phillips R. A. Potential for lymphoid differentiation by cells from long-term cultures of bone marrow. *Exp. Hematol.*, 8 (65), 1980.
 - 71 . Nabel G., Galli S. J., Dvorak A. M., Dvorak H. F., Cantor H. Inducer lymphocytes synthesize a factor that stimulates proliferation of cloned mast cells. *Nature (London)*, 291 (333), 1981.
 - 72 . Schrader J. W., Crapper R. M. Cloned factor-dependent lines of murine progenitors capable of generating both mast cells megakaryocytes.

Unpublished.

- 73 . Clark-Lewis I., Schrader J. W. Unpublished data.
- 74 . Landau T., Sachs L. Characterization of the inducer required for the development of macrophage and granulocyte colonies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68: 2540, 1971.
- 75 . Metcalf D., Moore M. A. S., Warner N. L. Colony formation in vitro by myelomonocytic leukemic cells. J. Natl. Canc. Inst., 43: 983, 1969.
- 76 . Metcalf D. Studies on colony formation in vitro by mouse bone marrow cells. I. Continuous cluster formation and relation of clusters to colonies. J. Cell. Physiol., 74: 323, 1969.
- 77 . Burgess A. W., Metcalf D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. Blood, 56: 1947, 1980.
- 78 . Metcalf D. The haemopoietic colony stimulating factors. Elsevier, Amsterdam; 1984.
- 79 . Austin P. E., McCulloch E. A., Till J. E. 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, 1971.
- 80 . Ihle J. N., Rebar L., Keller J., Lee J. C., Hapel A. T. Interleukin-3: possible roles in the regulation of lymphocyte differentiation and growth. Immunol. Rev., 63: 5, 1982.
- 81 . Henney C. S. The interleukins as lymphocyte growth factors. Transplantation Proceedings, 21 (1): 22, 1989.
- 82 . 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. USA, 77 (10): 6152, 1980.
- 83 . Lotem J., Sachs L. Mechanisms 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, 1982.
- 84 . Lotem J., Lipton J. H., Sachs L. Int. J. Canc, 25: 763, 1980.
- 85 . Metcalf D. Review. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood, 62 (2): 257, 1986.
- 86 . Sparrow L. G., Metcalf D., Hunkapiller M. W., Hood L. E., Burgess A. W.

- Purification and partial amino acid sequence of asialo murine granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 (2): 292, 1985.
- 87 . Moore M. A. S. Interleukin-3: an overview. Schrader J. W. (ed.), *Interleukin-3: the panspecific hemopoietin*. Lymphokines, 15, New York: Acad. Press., 253, 1988.
 - 88 . Gough N. M., Burgess A. W. The genes for granulocyte-macrophage colony stimulating factor and multi-colony stimulating factor (IL-3). Guroff G. (ed.), *Oncogenes, genes and growth factors*. New York, Wiley, 165, 1987.
 - 89 . Welte K., Platzer E., Lu L. Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 1526, 1985.
 - 90 . Stanley E. R., Guilbert J. Methods for the purification, assay, characterization and target cell binding of a colony stimulating factor (CSF-1). *J. Immunol. Methods*, 445: 253, 1981.
 - 91 . Heyworth C. M., Ponting I. L. O., Dexter T. M. The response of haematopoietic cells to growth factors: developmental implications of synergistic interactions. *J. Cell Science*, 1988. (In Press).
 - 92 . Lord B. I., Spooner E. Isolation of haemopoietic spleen colony forming cells. *Lymphokine Res.*, 5: 59, 1986.
 - 93 . Dexter T. M. *Nature*, 309, 746, 1984.
 - 94 . Metcalf D., Burgess A. W. Clonal analysis of progenitor cell commitment to granulocyte-macrophage production. *J. Cell Physiol.*, 111: 275, 1982.
 - 95 . Dexter T. M., Spooner E. Growth and differentiation in the haemopoietic system. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 3: 423, 1987.
 - 96 . Allen T. D., Dexter T. M. The essential cells of the hematopoietic microenvironment. *Exp. Hematol.*, 12: 517, 1984.
 - 97 . Weisbart H. R., Gasson C. J., Golde W. D. Colony stimulating factors and host defense. *Annals of Internal Medicine*, 110 (4): 297, 1989.
 - 98 . Oster W., Mertelsmann R., Herrmann F. Concise Review. Role of colony-stimulating factors in the biology of acute myelogenous leukemia. *Intern. J. Cell Cloning*, 7: 13, 1989.
 - 99 . Balkwill F. R., Burke F. Review. The cytokine network. *Immunology Today*, 10 (9): 299, 1989.
 - 100 . Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21 (suppl 97): 77, 1968.
 - 101 . Zucker-Franklin D., Greaves M. F., Grossi C. E., Marmont A. M. Atlas of

- blood cells. *Function and Pathology*. Edi. Ermes, Milano, 1: 343, 1981.
102. Spratt N. T. A simple method for explanting and cultivating early chick embryos *in vitro*. *Sci.*, 106: 452, 1947.
 103. Wolff E., Haffen K. Sur une methode de culture d'organes embryonnaires *in vitro*. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 10: 463, 1952.
 104. Bianco C., Nussenzweig. A population of lymphocytes bearing a membrana receptor for antigen-antibody complement complexes. I. Separation and characterization. *J. Exp. Med.*, 132: 702, 1970.
 105. Taffet S. M., Russell S. W. Identification of mononuclear phagocytes by ingestion of particulate materials, such as erythrocytes, carbon, zymosan, or latex. *Academic Press*, p.283, 1981.
 106. Litwack G. Photometric determination of lysozyme activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 89: 401, 1955.
 107. Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas. ENEP-Zaragoza, UNAM, Mexico, p. 657, 1988.
 108. Zucalli J. R., Elfenbein G. J., Bath K. C., Dinarello C. A. Effects of human interleukin 1 and human tumor necrosis factor on human T lymphocyte colony formation. *J. Clin. Invest.*, 80: 772, 1987.
 109. Dinarello C. A. *Rev. Infect. Dis.*, 6: 52, 1986.
 110. Metcalf D., Merchav S. Effects of GM-CSF deprivation on precursors of granulocytes and macrophages. *J. Cell Physiol.*, 112: 411, 1982.
 111. Santiago O. E., Mendoza R. J., Corona O. T., López M. R., Sánchez S. L., Weiss-Steider B. Induction of receptors on macrophage and leukemic cells by interleukin 1. data unpublished.
 112. Petroni et al. *J. Immunol.*, 138 (2): 4303, 1987.
 113. Scribner D. J., Fahrney D. Neutrophil receptors for IgG and complement: their roles in the attachment and ingestion phases of phagocytes. *J. Immunol.*, 116: 892, 1976.
 114. Vogel S. N., Rosenstreich D. L. Defective Fc receptor-mediated phagocytes in C3H/HeJ macrophages. *J. Immunol.*, 123 (6): 2842, 1979.
 115. Dahi M. R., Veerhuis R., van Es L. A. Activation of complement by soluble IgG aggregates and their subsequent interaction with macrophages. *Immunology Letters*, 14: 219, 1987.
 116. Gordon S., Tood J., Cohn Z. A. *In vitro* synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.*, 139: 1228, 1974.
 117. Holter W., Grunow R., Stockinger H., Knapp W. Recombinant interferon-induces interleukin 2 receptors on human peripheral blood monocytes. *J.*

- Immunol., 136: 2171, 1986.
118. Heyworth C. M., Ponting I. L. O., Dexter T. M. The response of haemopoietic cells to growth factors: developmental implications of synergistic interactions. *J. Cell Science*, 91: 239, 1988.
 119. Neta R., Szein M. B., Oppenheim J. J., Gillis S., Douches S. D. The in vivo effects of interleukin-1. I. Bone marrow cells are induced to cycle after administration of interleukin-1. *J. Immunol.*, 139: 1861, 1987.
 120. Mochizuki D. Y., Eisenman J. R., Conlon P. J., Larsen A. D., Tushinski R. J. Interleukin-1 regulates hematopoietic activity, a role previously ascribed to hemopoietin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 5267, 1987.
 121. Smith K. A. T-cell growth factor. *Immunol. Rev.*, 51: 337, 1980.
 122. Kawamura H., Sharrow S. O., Alling D. W., Stephany D., York-Jollen J., Berzofski J. A. Interleukin 2 receptor expression in unstimulated murine splenic T cells. *J. Exp. Med.*, 86: 1376, 1986.
 123. Henney C. S., Kuribayashi K., Kern D. E., Gillis S. E. Interleukin 2 augments natural killer activity. *Nature*, 291: 335, 1981.
 124. Ortaldo J. R., Mason A. T., Gerald J. P., Henderson L. E., Ferrar W., Hopkins R. F., Herberman R. B., Rabin H. Effects of natural and recombinant IL-2 on the regulation of IFN γ production and NK activity: lack of involvement of Tac antigen for these immunoregulatory effects. *J. Immunol.*, 133: 779, 1984.
 125. Mingari M. C., Gerosa F., Carra G., Accolla R. S., Moretta A., Zubler R. H., Waldmann T. A., Moretta L. Human interleukin 2 promotes proliferation of activated T-cells. *Nature*, 312: 641, 1984.
 126. Boyd A. W., Fisher D. C., Fox D. A., Schlossman S. F., Nadler L. M. Structural and functional characterization of IL-2 receptors on human activated B cells. *J. Immunol.*, 134: 2387, 1985.
 127. Le Gros G. S., Gillis S., Watson J. D. Induction of IL-2 responsiveness in a murine IL-3 dependent cell line. *J. Immunol.*, 135: 4009, 1985.
 128. Koyasu S., Yodoi J., Nikaido T., Taganya Y., Taniguchi Y., Honjo T., Yahara I. Expression of interleukin-2 receptors on interleukin 3 dependent cell lines. *J. Immunol.*, 136: 984, 1986.
 129. Asano Y., Okamura S., Shibuya T., Harada M., Niho Y. Growth of clonogenic myeloblastic leukemic cells in the presence of human recombinant erythropoietin in addition to various human recombinant hematopoietic growth factors. *Blood*, 72 (5): 1682, 1988.
 130. Dunn A. R. The role of growth factors in normal and neoplastic

- haemopoiesis. *Annals of the N. Y. Acad. of Sciences*, 511: 1, 1987.
131. Minami A., Fujimoto K., Ozaki Y., Nakamura S. Augmentation of host resistance to microbial infections by recombinant human interleukin-1. *Infection and Immunity*, 56 (12): 3116, 1988.
 132. Lotem J., Sachs L. In vivo control of differentiation of myeloid leukemic cells by cyclosporine A and recombinant interleukin-1. *Blood*, 72 (5): 1595, 1988.
 133. Rosenberg S. A. The adoptive immunotherapy of cancer: accomplishments and prospects. *Cancer Treat. Rep.*, 68: 233, 1984.
 134. Rosenberg S. A., Terry W. Passive immunotherapy of cancer in animals and man. *Adv. Cancer Res.*, 25: 323, 1977.
 135. Berendt M. J., North R. J. T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. An Explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. *J. Exp. Med.*, 151: 69, 1980.
 136. Cheever M. A., Greenberg P. D., Fefer A. Specificity of adoptive chemoimmunotherapy of established syngeneic tumors. *J. Immunol.*, 125: 711, 1980.
 137. Smith H. G., Hormel R. P., Hanna M. G., Zwilling B. S., Zbar B., Rapp H. J. Regression of established intradermal tumors and lymph node metastases in guinea pigs after systemic transfer of immune lymphoid cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 58: 1315, 1977.
 138. Rosenberg S. A., Mule J. J., Speiss P. J., Reichert C. M., Schwarz S. L. Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high dose recombinant interleukin-2. *J. Exp. Med.*, 161: 1169, 1985.
 139. Rosenberg S. A., Speiss P. J., Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor infiltrating lymphocytes. *Science*, 233: 1318, 1986.
 140. Rosenberg S. A., Lotze M. T., Mui L. M., Leitman S., Chang A. E., Ettinghausen S. E., Matory Y. L., Skibber J. M., Shiloni E., Vetto J. T., Seipp C. A., Simpson C. R., Reichert C. M. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.*, 313: 1485, 1985.
 141. Rosenberg S. A., Lotze M. T., Mui L. M., Chang A. E., Avis F. P., Seipp C. A., Simpson C. G., White D. E. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer

- cells and interleukin-2 or high dose interleukin-2 alone. N. Engl. J. Med., 316: 889, 1987.
142. Kasid A., Director E. P., Rosenberg S. A. Induction of endogenous cytokine-mRNA in circulating peripheral blood mononuclear cells by IL-2 administration to cancer patients. J. Immunol., 143 (2): 736, 1989.
143. Adams D. O., Edelson P. J., Koren H. S. Methods for studying mononuclear phagocytes. Academic Press, p. 1023, 1981.

APENDICE I

TIPOS DE LEUCEMIA CLASIFICACION FRANCO AMERICANA BRITANICA

TIPO DE LEUCEMIA	CARACTERISTICAS	CLAVE
Leucemia mieloblástica sin formas de maduración	Blastos no granulares, patrón de cromatina nuclear delicado con uno o más nucleolos, citoplasma limitado.	M1
Leucemia mieloblástica con formas de maduración	Células con maduración posterior al estado progranulocítico, las células más antiguas tienen abundante citoplasma contienen gránulos azurófilos y a menudo bastones de Auer.	M2
Leucemia progranulocítica o promielocítica hipergranular	Células con citoplasma muy granular, la tinción de los granulos varía entre rosa, rojo o púrpura, comúnmente con cuerpos de Auer, existen células con muy poca granulación en el citoplasma, un núcleo bilobulado, multilobulado o reniforme.	M3
Leucemia mielomonocítica	Células con núcleo monocitoide y un citoplasma granulocítico, se encuentran monocitos en la sangre y en la médula ósea.	M4
Leucemia monocítica	Las células son predominantemente monoblastos, en los núcleos se encuentra cromatina en forma laxa y uno o más nucleolos, citoplasma abundante con escasos gránulos finos de color rosado.	M5
Eritroleucemia (Síndrome de	El 50% de las células de la médula ósea son normoblastos o megaloblastos,	M6

Di"Guillermo)

ocasionalmente tienen nucleo atípico así como también células eritroides nucleadas en la sangre, existe un incremento de mieloblastos progranulocíticos y frecuentemente se se convierte en leucemia M1, M2 o M4.

Leucemia
megacariocítica

Trombocitosis y trombocitopenia en sangre M7
periférica, aumento de megacariocitos,
con citoplasma abundante, incremento en la
lobulación nuclear.

Leucemia
granulocítica crónica

Expansión de la masa total de granulocitos IGC
mieloblastos y promielocitos. Aberración
cromosómica en el cromosoma Filadelfia.
Sobreproducción de granulocitos
relativamente maduros.

Tomado de Ref. 101.

APENDICE I

LISOZIMA

La lisozima (mucopéptido N-acetilmuramoil hidrolasa o muramidasa), causa lisis de muchas bacterias gram-positivas por su acción sobre sus paredes celulares. Cataliza la hidrólisis de enlaces glucosídicos (1-4) del componente polisacárido del peptidoglican (mucopolímero de la pared celular bacterial), el cual está compuesto de residuos de ácido N-acetilmurámico y residuos de N-acetilglucosamina con enlaces (1-4) y (1-6).

La acción hidrolítica de la lisozima da riesgo a atacar unidades de disacáridos de las cadenas péptidas llamados mureopéptidos.

Esta enzima es de interés particular en el estudio de células fagocíticas, ya que una de las principales funciones de estas células es localizar a los microorganismos en el cuerpo del hospedero, para después degradarlos y eliminarlos (143).

Determinación de Lisozima por el método espectrofotométrico.

La evaluación espectrofotométrica es realizada de acuerdo a el método de Litwack (106) con unas pequeñas modificaciones.

a) Reactivos

1. Solución buffer de fosfatos y potasio de sodio 0.067 M a pH 6.25

Stock A: solución 0.2 M de KH_2PO_4 anhidro

Stock B: solución 0.2 M de Na_2HPO_4 anhidro

Mezclar 80 ml de la solución stock A o 20 ml de la solución stock B; ajustar el pH a 6.25 y diluir la mezcla 1:3 con agua destilada.

2. Solución sustrato buffer

10 mg de Micrococcus lysodeikticus son suspendidos en 100 ml de la solución buffer de fosfatos y potasio de sodio 0.067 M, pH 6.25. La absorbancia de esta suspensión a 450 nm debe ser entre 0.6 y 0.7. Descartar después de usar.

3. Solución estándar de Lisozima

Un estándar de lisozima de huevo blanco es preparado como una solución stock de concentración 2 mg/100 ml (20 ug/ml) en solución buffer de fosfatos y potasio de sodio 0.067 M, pH 6.25 y es refrigerada.

b) Procedimiento

1. La evaluación es realizada a temperatura ambiente.
2. Ajustar la absorbancia a 0.1 en el espectrofotómetro y ajustar a cero. Poner a una longitud de onda de 450 nm.
3. Transferir 2.5 ml de solución sustrato buffer a la celdilla y adicionar 0.1 ml por muestra del medio condicionado obtenido de los cultivos celulares. Mezclar e inmediatamente leer el cambio en la absorbancia por 1-3 minutos.

c) Cálculo de los datos

La actividad de lisozima puede ser expresada como un cambio de absorbancia o puede ser convertido al equivalente de lisozima estándar de la referencia obtenida de la preparación de una curva patrón (Tabla 1). Usando esta curva se obtienen las concentraciones de lisozima en las muestras.

Una unidad de actividad es definida como la cantidad de enzima que causa un cambio en la absorbancia a 450 nm de 0.001 en la suspensión de Micrococcus lysodeikticus en 1 minuto a pH 6.25 en 2.6 ml de la mezcla reaccionante y paso de luz de 1 cm. Para convertir el cambio de absorbancia a unidades de lisozima, simplemente se multiplica la absorbancia por 1000.

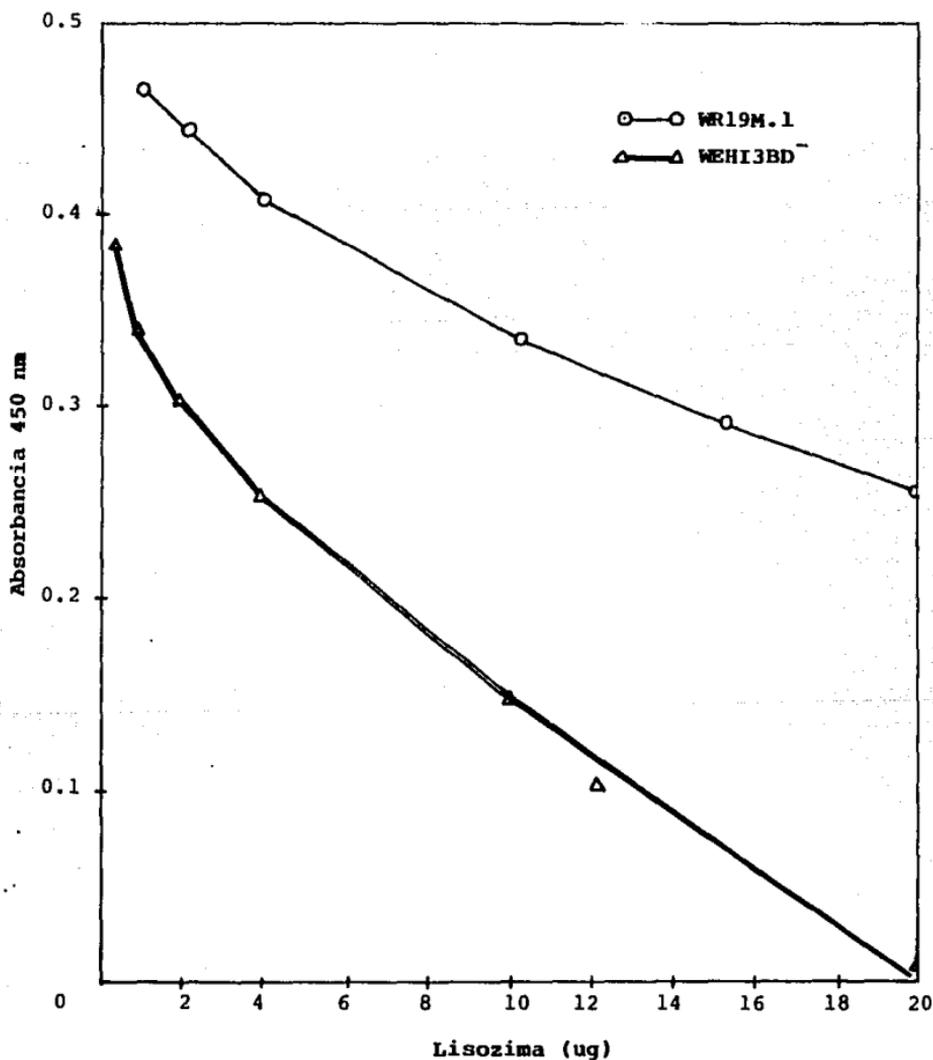
Tabla 1. Preparación de la curva patrón.

Concentraciones finales (ug/ml)	Volúmen de la Solución stock (20 ug/ml) ml	Volúmen del Buffer (ml)
2.0	0.1	0.9
4.0	0.2	0.8
10.0	0.5	0.5
15.0	0.75	0.25
20.0	1.0	0.0

Tomado de Ref. 106,143.

APENDICE III

OBTENCION DE LAS CURVAS PATRON PARA LAS LINEAS WR19M.1 Y WEHI3BD⁻
PARA LA DETERMINACION DE LISOZIMA



Para cuantificar la concentración de lisozima secretada al medio condicionado por las células de las líneas WR19M.1 y WEHI3BD⁻, los valores obtenidos fueron comparados con los valores de las curvas patrón ajustadas por regresión potencial por medio de las siguientes fórmulas:

$$\bar{y} = c X^b \dots\dots\dots(1)$$

puede representar la relación entre X y Y en la muestra.

Para determinar c y b, tomamos logaritmo a ambos lados de la ecuación (1), obteniendo:

$$\text{Log } \bar{Y} = \text{Log } c + b \text{ Log } X \dots\dots\dots (2)$$

Este resultado es una transformación doble logarítmica, porque ambas variables se expresan ahora en logaritmos.

Si hacemos

$$\text{Log } c = a$$

$$\text{Log } X = U$$

$$\text{Log } Y = W$$

podemos escribir la ecuación (2) en forma lineal como sigue:

$$W = a + b U \dots\dots\dots (3)$$

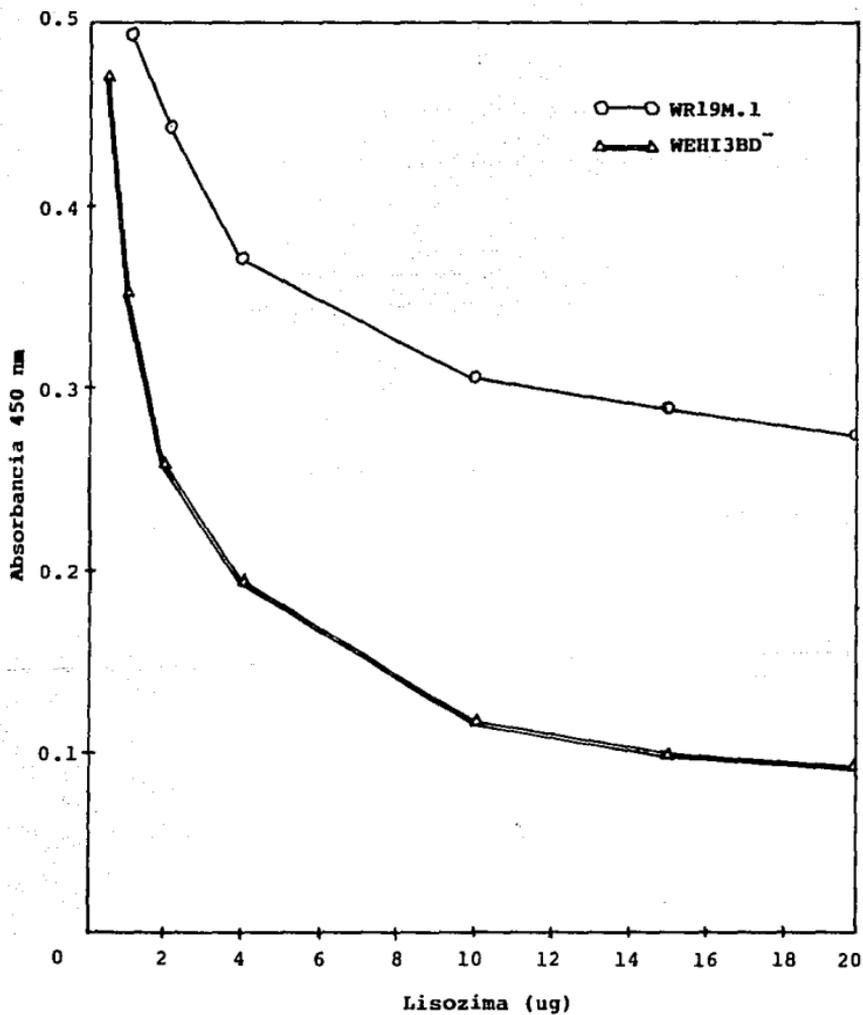
por lo tanto para hacer los cálculos, primero tomamos logaritmos a X y a Y y después procedemos como en la regresión lineal.

Para transformar nuevamente la ecuación (3) a la forma original, tomamos función inversa del logaritmo, entonces:

$$c = 10^a$$

$$\bar{Y} = (10^a) X^b$$

CURVAS PATRON AJUSTADAS POR REGRESION POTENCIAL



AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento:

- Al Dr. Benny Weiss Steider, a quien estimo y respeto por su incomparable calidad humana y su profesionalismo.
- Al M. en C. Jorge F. Mendoza Rincón, de quien siempre he recibido su asesoramiento como profesionista y a quien considero más que todo un buen amigo.
- Al M. en C. Edelmiro Santiago, a la M. en C. Lourdes Mora y al M. en CB. Julio Cáceres, por brindarme su apoyo y conocimientos en cuanto al las técnicas empleadas en el laboratorio y teoría.
- A todos mis compañeros de trabajo por su amistad y consejo.
- A la Dra. Etta Rozen del Hospital General y al Dr. José Salazar del Hospital de Especialidades "La Raza" por su ayuda para la obtención de las muestras de pacientes leucémicos.
- Al Sr. Ranulfo Pedraza y Sr. José Chavarria por su valiosa colaboración técnica.

GRACIAS