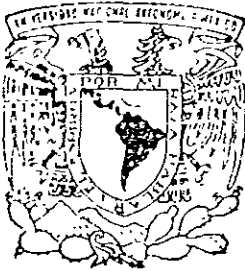


0038 / 28
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVIDENCIA DE QUE EL FACTOR ESTIMULADOR DE
COLONIAS DE GRANULOCITOS Y MACROFAGOS
(GM-CSF) SOLO INDUCE LA PROLIFERACION DE
PRECURSORES DEL LINAJE MONOCITO-
MACROFAGO Y NO LA DE GRANULOCITOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A :

MARIA DE LOURDES MORA GARCIA



DIRECTOR DE TESIS: DR. BENNY WEISS STEIDER

MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

266627



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

TITULO DE TESIS DOCTORAL

EVIDENCIA DE QUE EL FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE GRANULOCITOS Y MACROFAGOS (GM-CSF) SOLO INDUCE LA PROLIFERACION DE PRECURSORES DEL LINAJE MONOCITO-MACROFAGO Y NO LA DE GRANULOCITOS.

TESISTA

M EN C MARIA DE LOURDES MORA GARCIA

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, FES-Zaragoza, UNAM.

COMITÉ TUTORIAL

DR BENNY WEISS STEIDER (DIRECTOR DE TESIS)

DR. EDGAR ZENTENO GALINDO

DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, bajo la dirección del Dr. Benny Weiss Steider y tutoría del Dr. Edgar Zenteno Galindo, Dr. Jaime Martínez Medellín (q.e.p.d.) y del Dr. Edelmiro Santiago Osorio.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del PADEP, UNAM (Clave del Proyecto DFC9011 y DFC9140) y de la FES-Zaragoza.

ABSTRACT

In this work we report that monocyte-macrophage but not granulocyte precursors derived from the mouse bone marrow, were the only ones to be induced by the granulocyte and macrophage-colony stimulator factor (GM-CSF). Monocyte and granulocyte colonies were evaluated by using soft agar cultures at different times. We obtained that in the first days of culture the macrophage groups were more abundant than those of granulocytes, and that macrophage colonies were present on the fourth day of culture while granulocyte colonies until the fifth day. When the cells that were cultured for two days in the presence of GM-CSF were transferred to another culture with GM-CSF, only monocyte and macrophage colonies developed. Interestingly, these monocyte-macrophage colonies were capable to produce granulocyte-colony stimulator factor (G-CSF) and interleukin-6 (IL-6). On the other hand, and in order to determine whether these cytokines were those responsible for the induction for the proliferation of granulocyte colonies from precursors present in the marrow cells in cultures with GM-CSF, we used polyclonal antibodies against G-CSF and IL-6 to neutralize their activity. In fact these antibodies strongly inhibited the formation of granulocyte colonies, suggesting thus, that granulocyte colonies formed in these cultures were induced by G-CSF and IL-6 produced by the macrophages that in turn were stimulated with GM-CSF. Our results strongly hint to the possibility that GM-CSF is a specific stimulator factor for the monocyte-macrophage lineage.

This work provides an alternative explanation for the regulation of granulocyte and macrophage generation mediated by GM-CSF, G-CSF and IL-6. The understanding of this mechanisms could be important for the design of protocols for myeloid regeneration in the bone marrow in hematology and oncology diseases.

A Alberto mi esposo:

por su amor, apoyo y ayuda en todo momento para la realización de este trabajo.

**A mis hijos Alberto y
Katia Alhelí:**

que constituyen mi razón de seguir adelante.

A mis Padres:

con mucho cariño, agradeciéndoles su apoyo incondicional para alcanzar un objetivo más en mi vida .

A mis hermanos:

con mucho cariño.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Benny Weiss Steider, por permitirme participar en su grupo de trabajo, por la confianza, las enseñanzas, el tiempo y la dedicación brindada todo este tiempo.

A los Drs. Edgar Zenteno Galindo, Edelmiro Santiago Osorio y Jaime Martínez Medellín (q.e.p.d), por su asesoramiento y consejos durante el desarrollo del trabajo experimental.

A los Drs. Rubén Dario Martínez, Julio Roberto Cáceres Cortés, Alejandra Mainero, Miguel Betancourt Rule y Héctor Mayani Viveros, quienes formaron parte del jurado y contribuyeron al mejoramiento del trabajo escrito.

A los Srs. Ranulfo Pedraza y José Chavarría por su colaboración técnica.

A los compañeros del Laboratorio.

A todos muchas gracias.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
MARCO TEORICO.....	4
A. Médula ósea.....	4
1.- Ontogenia de la hematopoyesis.....	4
B. Hematopoyesis.....	6
C. Células madre hematopoyéticas.....	9
1.- Cultivo de células hematopoyéticas.....	13
D. Microambiente hematopoyético.....	15
1.- Células estromales de médula ósea.....	15
2.- Componentes de la matriz del microambiente hematopoyético.....	17
3.- Interacciones celulares en médula ósea.....	19
E. Factores de crecimiento hematopoyético.....	22
F. Receptores para factores de crecimiento hematopoyético.....	25
1.- Receptor tirosina cinasa.....	26
2.- Receptor de citocinas.....	26
3.- Señalización a través de los receptores para factores de crecimiento hematopoyético.....	28
G. Células fagocíticas.....	29
1.- Monocito-macrófago.....	30
2.- Granulocito-neutrófilo.....	33
H. Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.....	37
1.- Estructura proteínica del GM-CSF.....	37
2.- Organización genómica y localización cromosómica del GM-CSFF.....	39
3.- Expresión del GM-CSF.....	40
4.- Eventos de señalización intracelular inducidos por GM-CSF.....	40
5.- Actividades biológicas del GM-CSF.....	42
6.- Uso clínico del GM-CSF.....	46
7.- Papel fisiológico del GM-CSF.....	48
ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION.....	50
MATERIAL Y METODOS.....	53
RESULTADOS.....	60
DISCUSION.....	82
CONCLUSIONES.....	93

REFERENCIAS.....	94
------------------	----

APENDICES.....	113
----------------	-----

ABREVIATURAS.....	116
-------------------	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de las vías de diferenciación de células sanguíneas.....	5
Figura 2. Método de obtención de colonias en el bazo.....	8
Figura 3. Método de obtención de colonias hematopoyéticas in vitro.....	14
Figura 4. Interacción de células hematopoyéticas	20
Figura 5. Estructura de los receptores de factores hematopoyéticos.....	27
Figura 6. Origen, cinética y tiempo de maduración de monocitos.....	31
Figura 7. Estadios de diferenciación de granulocitos.....	34
Figura 8. Red de señales y estímulos para la producción de GM-CSF.....	41
Figura 9. Clonación de grupos de células.....	55

LISTA DE TABLAS Y GRAFICAS

Tabla 1. Citocinas que modulan la actividad biológica de células sanguíneas.....	23, 24
Tabla 2. Características del GM-CSF.....	38
Tabla 3. Actividad biológica del GM-CSF.....	44
Tabla 4. Padecimientos hematológicos en donde se utiliza GM-CSF.....	47
Tabla 5. Morfología celular de las colonias obtenidas después de.....	66
transferirlas a un segundo inductor (dos días).	
Tabla 6. Morfología celular de las colonias obtenidas después de.....	68
transferirlas a un segundo inductor (cuatro días).	
Tabla 7. El lisado de macrófagos (GM-CSF) favorece la formación.....	70
de granulocitos.	
Tabla 8. El G-CSF e IL-6 participan fuertemente en la formación	77
de granulocitos.	
Gráfica 1. Formación de colonias a diferentes concentraciones GM-CSF.....	61
Gráfica 2. Cinética de formación de granulocitos y macrófagos.....	63
Gráfica 3. Presencia de G-CSF en el lisado de macrófagos (ELISA).....	72
Gráfica 4. Presencia de IL-6 en el lisado de macrófagos (ELISA).....	73
Gráfica 5. Detección intracelular de G-CSF en colonias de macrófagos.....	74
Gráfica 6. Detección intracelular de IL-6 en colonias de macrófagos.....	75

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografía 1. Colonia de granulocitos obtenida con GM-CSF.....	78
Fotografía 2. Colonia de granulocitos obtenida con GM-CSF+.....	78
anti G-CSF +anti IL-6.	
Fotografía 3. Colonia de granulocitos obtenida con GM-CSF+.....	79
anti G-CSF.	
Fotografía 4. Colonia de granulocitos obtenida con GM-CSF+.....	79
anti IL-6.	
Fotografía 5. Colonias de monocito-macrófago obtenidas con.....	81
GM-CSF (a) y M-CSF (b).	
Fotografía 6. Colonia obtenida con M-CSF (a) y GM-CSF (b).....	81
después de 45 días de cultivo.	

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Modelo de formación de granulocitos y macrófagos.....	84
a partir de precursores independientes de médula ósea.	
Esquema 2. Modelo hipotético del origen monopotencial de.....	85
células mieloides.	
Esquema 3. Modelo hipotético de formación de colonias mixtas.....	86
Esquema 4. Modelo de interrelación entre el monocito y granulocito.....	90
a través de un circuito de estimulación.	

RESUMEN

En este trabajo se determinó que el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) induce únicamente la proliferación de precursores de monocitos-macrófagos y no la de granulocitos a partir de células de médula ósea de ratón. Para ello, se evaluó la inducción de células de médula ósea de ratón en la formación de colonias *granulocitos y macrófagos* en función del tiempo en cultivos en agar. Se encontró que mientras los grupos de macrófagos eran abundantes en los primeros dos días de cultivo, los grupos de granulocitos eran escasos. Asimismo, las colonias de macrófagos se formaron al cuarto día y las colonias de granulocitos hasta el quinto. Cuando los grupos de células de dos días fueron transferidos a cultivos con GM-CSF, se observó que sólo colonias de monocitos-macrófagos se desarrollaron. Además estos monocitos-macrófagos, fueron capaces de producir factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) e Interleucina 6 (IL-6). Por otro lado, para comprobar si estas citocinas son las responsables de la formación de las colonias de granulocitos en un cultivo con GM-CSF, se adicionaron anticuerpos contra G-CSF e IL-6. Los resultados obtenidos demostraron que la presencia de ambos anticuerpos en el cultivo con GM-CSF inhibieron fuertemente la formación de colonias de granulocitos, lo cual nos indicó que la formación de colonias de granulocitos en estos cultivos fue debido principalmente a la producción de G-CSF e IL-6 por los macrófagos al ser estimulados a proliferar con GM-CSF. Estos resultados abren la posibilidad de que el GM-CSF sólo sea un factor del linaje monocito-macrófago.

Este trabajo pretende proporcionar una nueva alternativa de explicación del proceso de regulación en la generación de células granulocíticas y macrofágicas. Además tendría suma importancia para apoyar la selección de factores hematopoyéticos en ciertos padecimientos hematológicos y oncológicos, que en la actualidad se utilizan para regenerar médula ósea.

INTRODUCCION

Los leucocitos son muy importantes en la lucha contra las infecciones. Muchas de estas células tienen corta vida y por lo tanto tienen que ser continuamente reemplazadas para mantener los niveles normales en el organismo, y su producción debe ser capaz de responder rápidamente a situaciones de emergencia tales como infecciones y hemorragias. A este proceso se le denomina leucopoyesis. Todas las células maduras son derivadas de una población relativamente pequeña denominada célula madre residentes en la médula ósea. Estas células son pluripotentes y son capaces de diferenciarse a neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos, linfocitos, plaquetas y eritrocitos (Dexter y Heyworth, 1994).

Para analizar los mecanismos que regulan la multiplicación y diferenciación de las células sanguíneas normales a los diferentes linajes celulares, fue necesario estudiar los procesos en cultivos celulares; para lo cual se desarrolló un sistema de cultivo celular para la clonación y diferenciación de los diferentes tipos celulares hematopoyéticos. Este sistema hizo posible descubrir un grupo de proteínas que regulan la multiplicación y diferenciación de linajes hematopoyéticos específicos (Sachs, 1996). Entre las proteínas que regulan la producción de células mieloides se encuentran: el Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos (M-CSF), el Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (G-CSF), la Interleucina-3 (IL-3) y el Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF). Este último factor tiene supuestamente como principal efecto el de inducir la proliferación y diferenciación de precursores mieloides hacia colonias de granulocitos y macrófagos a partir de un precursor común (Metcalf y Burgess, 1982). La teoría de la existencia de un precursor común para granulocitos y macrófagos, basado históricamente en la observación de colonias mixtas constituidas por ambos tipos celulares (Pluznik y Sachs, 1965; Bradley y Metcalf., 1966), ha permanecido sin cambio a través de todos estos años.

En trabajos anteriores hemos demostrado que algunas líneas celulares mieloides producen y secretan CSF (Calcagno, et al 1982) y dimos evidencias de que líneas celulares macrofágicas (Mendoza, et al 1990), así como macrófagos normales producen G-CSF (Zambrano, et al 1989a, 1989b). Tomando en consideración el hecho de que el GM-CSF

induce colonias de macrófagos normales y que las células de estas colonias producen y secretan G-CSF, este trabajo tiene la finalidad de determinar si el GM-CSF posee como única célula blanco al precursor de macrófago y sea éste el que al proliferar y secretar un factor con actividad de G-CSF provoque la formación de colonias granulocíticas y no el GM-CSF como hasta ahora se ha postulado.

MARCO TEORICO

A. MEDULA OSEA

1.- Ontogenia de la Hematopoyesis

La formación de células sanguíneas se lleva a cabo en los primeros días de vida intrauterina, mediante la hematopoyesis (Douer, 1989) (Figura 1). En el embrión humano, las células sanguíneas se generan en la tercera semana, cuando se forman los islotes sanguíneos, a partir de células mesenquimatosas en el saco vitelino, en donde las células periféricas del islote se juntan para formar un sistema vascular primitivo. Simultáneamente, las células centrales de los islotes se diferencian en elementos que se desprenden y son transportados por el torrente del plasma primitivo. Estos elementos son las células primordiales o tallo primitivas (hemocitoblastos) del saco vitelino y algunas de ellas rápidamente se diferencian al linaje eritroide (Tavassoli, 1991; Lansdorp, 1995). La actividad hematopoyética en el saco vitelino es de corto tiempo y declina a niveles insignificantes a la mitad del tercer mes de vida (Beck, 1991; Amos y Gordon, 1995).

En el tercer mes de vida embrionaria, las células tallo del saco vitelino migran al hígado, el cual se convierte en el sitio principal de formación de células de la sangre. El inicio de la hematopoyesis hepática se anuncia con la aparición de células blásticas indiferenciadas en los cordones hepáticos, en donde gradualmente se da la diferenciación hacia el linaje eritroide, granulocítico y megacariocítico (Tavassoli, 1991). La actividad hematopoyética durante la fase hepática se aumenta por contribuciones del bazo, nódulos linfáticos y timo. La contribución del bazo es de corto tiempo, comienza en el tercer mes y generalmente declina a niveles insignificantes al final del sexto mes de gestación. Al cuarto mes, empieza a darse la hematopoyesis en la médula ósea, y al final de la gestación constituye la principal fuente de células sanguíneas. En esta etapa la hematopoyesis es granulocítica y eritropoyética. Al nacer, tanto el hígado como el bazo se encuentran básicamente pasivos, pero mantienen el potencial de hematopoyesis durante toda la vida (Gulati, et al 1988).

En el neonato, la hematopoyesis medular ocurre en casi todos los huesos. Con el

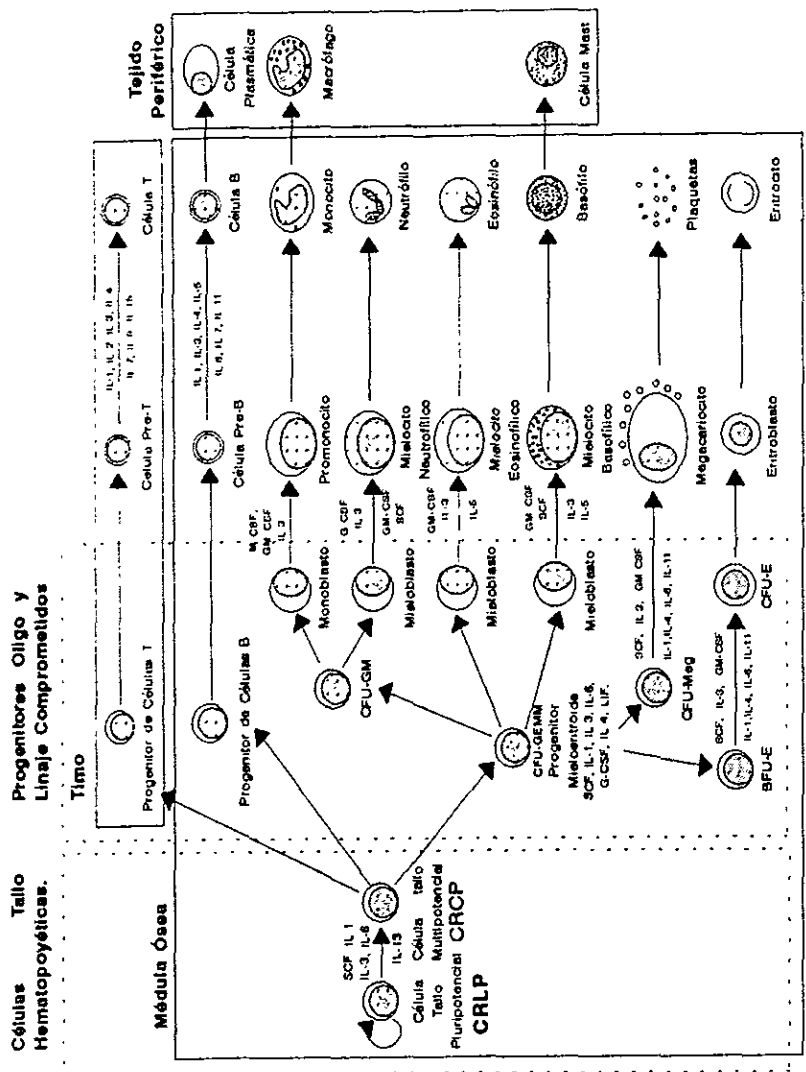


Figura 1. Modelo de las vías de diferenciación de células sanguíneas a partir de células tallo hematopoyéticas y su distribución en tejido hematopoyético. Tomado y modificado de Morrison, et al, 1995; Ikuta, et al, 1982; y Lowry, and Quesenberry, 1982. CRLP, célula repobladora a largo plazo; CRCP, célula repobladora a corto plazo.

incremento de la edad posnatal existe un aumento de células adipocíticas en las cavidades del hueso y la médula ósea hematopoyética comienza a ocupar una localización más central. A la edad de 18 años la médula hematopoyéticamente activa se encuentra principalmente en la pelvis, esternón y costillas y en menor grado en las vértebras, cráneo, y en los extremos de los huesos largos (Beck, 1991; Amos y Gordon, 1995).

La médula ósea localizada en las cavidades de los huesos representa uno de los tejidos más grandes y altamente organizado del cuerpo. Aproximadamente el 85% de la cavidad es ocupada por la médula y el restante 15% es hueso medular (Politis, et al 1983).

Estructuralmente, la médula ósea puede ser dividida en dos compartimentos: una región extravascular (cordones hematopoyéticos), que es el sitio donde ocurre la hematopoyesis, y otro intravascular, integrada por vasos sanguíneos de paredes delgadas conocidos como sinusoides (DeBruyn, 1981). Estas paredes están formadas por una capa luminal continua de células endoteliales con propiedades endocíticas especializadas (Lichtman, et al 1989), así también en su superficie contienen sustancias semejantes a moléculas de adhesión, que pueden facilitar la llegada de las células tallo a la médula (Kataoba y Tavassoli, 1985).

La médula ósea juega dos papeles importantes; como tejido hematopoyético principal y como órgano reticuloendotelial. En la hematopoyesis la médula contribuye diariamente a la producción y liberación a la circulación de aproximadamente 2.5 billones de células rojas, 1.0 billón de granulocitos y 2.5 billones de plaquetas por kg de peso en un adulto normal (Erslev y Weiss, 1983). Sin embargo, dependiendo de las necesidades del cuerpo, el potencial hematopoyético de la médula puede variar. La función reticuloendotelial de la médula ósea involucra el procesamiento antigénico, reacciones inmunes celulares, síntesis de anticuerpos, reconocimiento y eliminación de células senescentes y anormales (Gulati, et al 1988).

B. HEMATOPOYESIS

La renovación de las células maduras de la sangre se da gracias a la existencia de una pequeña población de células madre hematopoyéticas de médula ósea. Estas células se caracterizan por su capacidad de autorenovación y diferenciación y producir células

restrictivas que proliferen y se desarrollen para formar los tipos celulares mieloides y linfoides (Whetton y Dexter, 1993) (Figura 1).

Se consideró que existían células progenitoras para cada linaje específico (Whetton y Dexter, 1993). Este argumento permaneció sin resolver hasta principios de 1960 cuando se aportaron evidencias de la existencia de una población de células madre hematopoyética pluripotente, la cual da origen a todas las células sanguíneas maduras (Till y McCulloch, 1961). La inyección de células de médula ósea normal de ratón no irradiado a otros letalmente irradiados (a pesar de que la radiación había destruido todas las células progenitoras hematopoyéticas en el ratón receptor), evitó su muerte porque algunas de ellas formaron colonias de células hematopoyéticas en el bazo. El número de colonias en el bazo estuvo directamente relacionado a la cantidad de células inyectadas. Por lo tanto, se concluyó que las colonias del bazo fueron derivadas de células con la capacidad de producir células hematopoyéticas diferenciadas; éstas fueron llamadas Unidades Formadoras de Colonias del Bazo (CFU-S; Colony Forming Unit-Spleen) (Gordon y Barrett, 1985) (Figura 2). Posteriormente se demostró que cada colonia del bazo era derivada de una sola célula precursora (Metcalf y Moore, 1971). La otra propiedad de células madre llamada autorenovación, también es característica de las CFU-S, al demostrar que cuando las colonias producidas en un ratón post irradiado eran inyectadas en otro ratón irradiado, se producían varias colonias secundarias en el bazo de éste (Siminovitch, et al 1963).

Actualmente se sabe que la población de CFU-S es heterogénea tanto en su capacidad autorenovadora como en su potencial de generar progenie de linajes múltiples. Por ejemplo, las células que dan origen a nódulos de bazo de 12-13 días (tardías) después de su inoculación son más primitivas que las células que dieron origen a colonias de bazo de 7-8 días después de ser inyectadas (Till y McCulloch, 1961; Magli, et al 1982; Molineux, et al 1986).

Probablemente menos del 10% de los CFU-S que aparecen tardíamente puedan repoblar los sitios hematopoyéticos a largo plazo (Visser y Van Bekkum, 1990). Sin embargo, la capacidad autorrenovadora de los CFU-S parece ser limitada. En varios pasajes seriales de CFU-S a ratones letalmente irradiados, éstos murieron después de tres pasajes (Mauch, et al 1989). Lo anterior puede reflejar limitaciones en estas

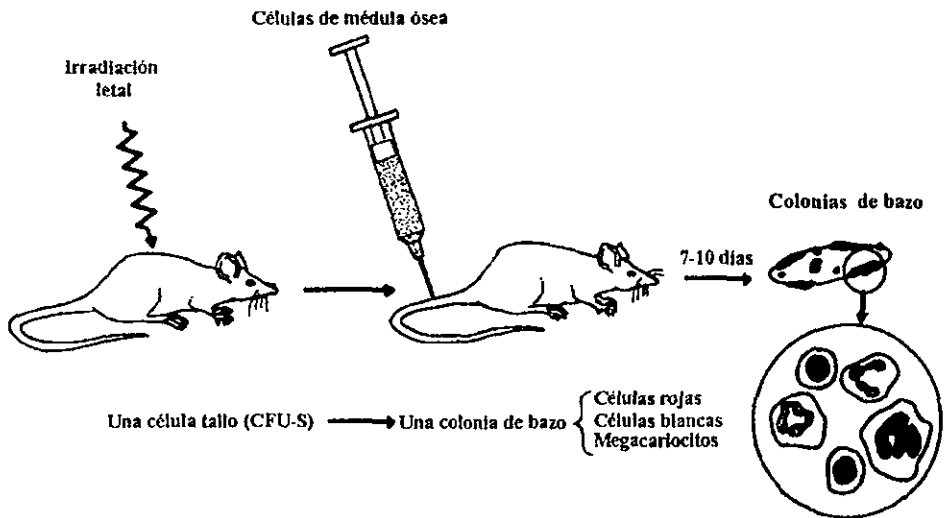


Figura 2. Método de obtención de colonias hematopoyéticas en el bazo, de Till y McCulloch, 1961. Tomado de Gordon y Barret, 1985.

aproximaciones experimentales, ya que igualmente con médula ósea, que supuestamente contiene la mayoría de las células madre, la transferencia serial no pudo ser continuada indefinidamente, dado que fue limitada a cinco transferencias; probablemente porque solo una proporción de las células totales es transferida (Botnick, et al 1979; Niskanen, 1992).

C. CELULAS MADRE HEMATOPOYETICAS

En el ratón y humano las células madre hematopoyéticas (CMH) representan aproximadamente el 0.05% de células de médula ósea (Morrison, et al 1995). Las CMH pluripotentes pueden ser organizadas en una jerarquía funcional y de desarrollo (Spangrude, 1989; Visser y Van Bekkum, 1990; Moore, 1991; Seiff, 1991). La mayoría de las células madre primitivas se encuentran en estado quiescente y cuando se dividen, se autorenievan, ya que generan al menos una célula hija idéntica a sí misma. La probabilidad de que una célula madre de ratón se autorenieve se ha calculado tan alto como 0.5, aunque se piensa que este valor puede cambiar con la edad como consecuencia de una disminución de la longitud del telómero (Vaziri, et al 1994; Morrison SJ et al., 1997). Además, recientemente se ha reportado que factores genéticos dependientes de la cepa del ratón, son importantes en la proliferación de las células madre (Haan, et al 1997). Las células madre son operacionalmente identificadas por su capacidad para contribuir a la generación de células linfohematopoyéticas por períodos prolongados cuando son transplantadas a ratones irradiados (Schrader, 1992). Estas células madre, también llamadas "células repobladoras a largo plazo", dan origen a células madre multipotenciales que están más activamente dividiéndose, las cuales tienen una limitada o ninguna capacidad de autorenovarse y una gran tendencia a diferenciarse en células progenitoras comprometidas; éstas rápidamente dan origen a células funcionalmente maduras de varios linajes (Schrader, 1992; Orlic y Bodine, 1994) (Figura 1).

La repoblación celular a corto plazo, ha sido operacionalmente identificada por su capacidad de prevenir la muerte de animales letalmente irradiados. En contraste a las células madre repobladoras a largo plazo, la capacidad generativa de las células repobladoras a corto plazo (células progenitoras multipotenciales) es relativamente rápida y su progenie desaparece aproximadamente en un mes. Un trasplante de médula

ósea exitoso, requiere el transplante de ambos tipos de células madre, una para sostener la hematopoyesis durante el período de vida del hospedero, el otro para regenerar rápidamente las células eritroides y mieloides (Moore, 1991; Schrader, 1992).

Las células madre activas producen poblaciones de células progenitoras las cuales forman células maduras que no pueden autorenovarse. Este proceso se conoce como “comprometimiento” o “determinación” e implica que las células madre pierden su inmortalidad. Existe controversia acerca de los mecanismos por los cuales el “pool” de células madre se mantiene mientras ocurre el comprometimiento (Till y McCulloch, 1980). Dos teorías alternativas han surgido: una sugiere que las células madre sufren azarosamente la autoreplicación o diferenciación (modelo estocástico); mientras que la otra sugiere que las células madre son inducidas a autoreplicarse o diferenciarse por factores extracelulares (modelo inductivo o determinístico) (Gordon y Barret, 1985).

Inicialmente dos modelos determinísticos del comprometimiento de células madre fueron propuestos: el modelo del microambiente inductivo hematopoyético (HIM) (Trentin, 1970) y el modelo de competencia de células madre (VanZant y Goldwasser, 1979). El modelo HIM propone nichos anatómicos específicos de linajes que dirigen la diferenciación de progenitores no comprometidos. El modelo de competencia de células madre destaca la regulación del compromiso de células madre por factores humorales tales como eritropoyetina y factores estimuladores de colonias (CSF; *Colony Stimulating Factor*) (VanZant y Goldwasser, 1979). Por otro lado, se han propuesto dos mecanismos para el comprometimiento estocástico. Un modelo destaca la restricción azarosa en los potenciales de linajes de los progenitores. La característica principal de este modelo es la suposición de la existencia de progenitores oligopotenciales. En un modelo alternativo de diferenciación estocástica, una célula madre pluripotente puede autorenovarse o puede ser azarosamente comprometida a la expresión de un solo linaje. Ambos modelos son apoyados por estudios usando técnicas de micromanipulación (Ogawa, 1993).

Se ha sugerido que tanto el modelo estocástico como el determinístico no son mutuamente incompatibles, ya que mientras que la autorenovación y diferenciación de las células madre y progenitoras, parece ser un proceso estocástico, la sobrevivencia y proliferación de las células es regulada por citocinas (Gordon y Amos, 1994).

Muchos esfuerzos se han realizado para intentar aislar y caracterizar físicamente a las células madre hematopoyéticas humanas y de ratón pero sin mucho éxito (Spangrude, 1989; Jones, et al 1990; Visser y Van Bekkum, 1990; Orlic y Bodine, 1994).

Uno de los problemas radica en la existencia de un continuo entre las célula madre repobladoras a largo plazo y su progenie más diferenciada, habiendo como resultado una gran heterogeneidad. Por consiguiente, existe un traslape del fenotipo celular; de hecho el uso de algunos marcadores de superficie para células humanas como CD34⁺, Sca-1⁺, o *c-kit*⁺ no pueden definir la población de células madre, ya que estos mismos marcadores se comparten con la población de CFU-S y otras células repobladoras a corto plazo (Orlic y Bodine, 1994). Una mejor separación de poblaciones altamente enriquecidas de células primitivas se consigue con el uso combinado de anticuerpos monoclonales contra antígenos de superficie y flujo citométrico, así como tinción con rodamina 123 (Rh123) (Berardi, et al 1995); CD34⁺, Thy-1⁺, Lin⁻ ¹²³Rh^{lo} para humanos (Morrison, et al 1995) y Sca-1⁺, Thy-1^{lo}, Lin⁻ ¹²³Rh^{lo} para ratón (Spangrude, et al 1995). Otra dificultad experimental para aislar a la célula madre está relacionada con la naturaleza de los sistemas de ensayos necesarios para identificar estas células, lo cual dificulta una cuantificación precisa (Jones, 1990).

Para poder identificar estas células biológicamente, es necesario esperar inclusive años, por lo que se han desarrollado ensayos a corto plazo tanto *in vitro* como *in vivo*, pero ninguno satisface completamente el criterio para el análisis de una célula madre.

Históricamente, muchos investigadores pensaron que los ensayos a corto y largo plazo *in vivo* cuantificaban las diversas propiedades de una población de células madre, sin embargo, ahora es claro que los ensayos a corto plazo *in vivo* cuantifican células madre multipotenciales con una limitada o ninguna capacidad autorenovadora y que los ensayos a largo plazo *in vivo* son los únicos que pueden medir la actividad de las células madre pluripotentes (Spangrude, 1994; Orlic y Bodine, 1994).

Recientemente, se ha observado que la población de células madre puede ser subdividida de acuerdo a sus perfil de expresión de receptores de citocinas, lo cual permitirá una mejor caracterización de éstas subpoblaciones, siendo de interés determinar si pueden tener propiedades funcionales distintas (McKinstry, et al 1997; de Jong, et al 1997).

Las células progenitoras derivan de la *diferenciación de las células madre* multipotentes y poseen un potencial de diferenciación limitado; estas células también se conocen como progenitores comprometidos o restrictivos de linaje (Metcalf y Moore, 1971; Metcalf, 1977, 1988; Testa, 1985) (Figura 1). Las células progenitoras son detectadas por su capacidad de dar origen a colonias de progenie morfológicamente reconocibles en cultivos clonales semisólidos. *Las células clonogénicas fueron operacionalmente* definidas como Unidad Formadora de Colonias (CFU; Colony Forming Unit) y por el prefijo por letras que denotan el tipo de células a la cual dan origen (Wright y Lord, 1992).

Las modificaciones en las condiciones de los cultivos clonales permitieron la clonación de células de los diferentes linajes hematopoyéticos tales como: Unidad Formadora de Colonias de Granulocitos-Eritrocitos-Monocitos-Megacariocitos (CFU-GEMM), Unidad Formadora de Colonias de Macrófagos y Granulocitos (CFU-GM), Unidad Formadora de Colonias de Macrófagos (CFU-M), Unidad Formadora de Colonias de Granulocitos-Neutrófilos (CFU-G), Unidad Formadora de Colonias de Eosinófilos (CFU-Eo), Unidad Formadora de Colonias de Basófilos (CFU-Bas), Unidad Formadora de Colonias de Megacariocitos (CFU-Meg), Unidad Formadora del Estallido Eritroide (BFU-E) y Unidad Formadora de Colonias Eritroide (CFU-E).

La naturaleza clonal de las colonias ha sido demostrada por análisis del cariotipo, el uso de marcadores como isoenzimas y el crecimiento de colonias de una sola célula separada por micromanipulación (Whetton y Dexter, 1989). La restricción de linaje de las células progenitoras comprometidas también a sido demostrada usando estas técnicas.

Estudios subsecuentes en varias partes del mundo permitieron identificar células humanas progenitoras comprometidas a varios linajes hematopoyéticos (Wright y Lord, 1992).

Las colonias derivadas de células progenitoras comprometidas son clones y consisten hasta de 10^5 células después de 7-14 días de cultivo. Las células comprometidas tienen poca o ninguna capacidad de divisiones autoreplicativas y la mayoría de las colonias maduras no contienen células madre o progenitoras. Estos progenitores están comprometidos a un programa de diferenciación y maduración, con alguna capacidad

autoreplicativa que sirve sólo para amplificar la población antes de la maduración terminal de las células. La mayoría de los progenitores son células unipotenciales (Metcalf, 1977, 1984, 1988), excepto para granulocitos y macrófagos que se ha postulado la existencia de una célula precursora común (célula precursora bipotencial) responsable de dar origen a estos dos tipos celulares (Metcalf y Burgess, 1982).

1.- Cultivo de Células Hematopoyéticas

Un paso clave en el entendimiento de la estructura y regulación del sistema hematopoyético fue facilitado por el desarrollo de un sistema de cultivo celular *in vitro* para el crecimiento clonal. Primeramente, se sugirió un método de obtención de colonias de una suspensión de células de bazo cultivadas en agar sobre una capa alimenticia de células embrionarias de ratón (Pluznik y Sachs, 1965). Posteriormente, se demostró que células de médula ósea de ratón formaban colonias de granulocitos y macrófagos (Bradley y Metcalf, 1966). En ambos casos las células de médula ósea fueron inmovilizadas en un medio semisólido (agar o metilcelulosa), el cual contenía un “agente” que promovía la proliferación y desarrollo después de un período de 7 días. Este medio semisólido proveía un soporte para el crecimiento de las colonias e impedía que las células formadoras de colonias se movieran de un lado a otro. Por lo tanto, la célula madre y su progenie serían retenidas en una área pequeña y podrían ser detectadas como colonias bajo el microscopio. Las colonias estaban compuestas de granulocitos, monocitos o mezclas de ambos tipos celulares (Gordon y Barret, 1985; Sachs, 1996) (Figura 3).

La formación de estas colonias se encontró que era dependiente de la inclusión de una fuente de factores solubles, las cuales fueron llamadas actividades estimuladoras de colonias (CSA) (Austin, et al 1971). Más tarde cuando fueron identificadas como proteínas con características químicas y biológicas se les denominaron factores estimuladores de colonias (CSF) (Clark y Kamen, 1987).

Posteriormente se diseñaron cultivos que pueden sostener *in vitro* la hematopoyesis por períodos prolongados (Testa, et al 1993). Estos cultivos denominados cultivos de médula ósea a largo plazo (CMOLP), fueron primero desarrollados para células madre de ratón y posteriormente se adaptaron para sostener la hematopoyesis a largo plazo con

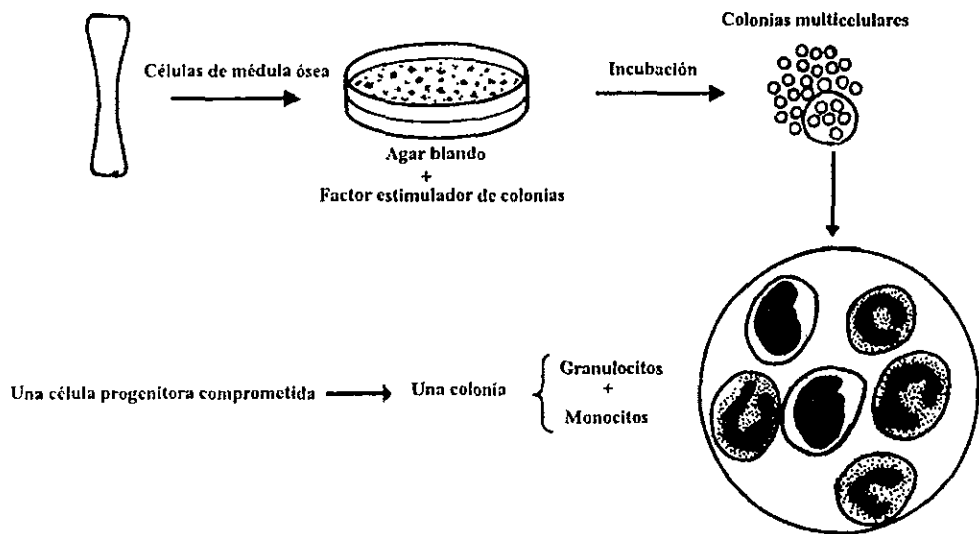


Figura 3. Método de obtención de colonias hematopoyéticas in vitro, a partir de médula ósea de ratón. Tomado de Gordon y Barret, 1985.

médula de otras especies incluyéndose al hombre (Moore, 1991). En este sistema de cultivo, se utilizan células de médula ósea para establecer una capa estromal adherente en frascos de cultivos de tejidos. Una segunda población de células de médula ósea se añade a la capa celular adherida previamente establecida y en estas condiciones las células tallo adicionadas migran entre las células estromales, en donde proliferan y producen diferente progenie. Como resultado, las células hematopoyética en todas las etapas de desarrollo son liberadas dentro del sobrenadante del cultivo (Testa, et al 1993).

El desarrollo de los CMOLP ha establecido firmemente el papel de las células estromales en promover la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. En estos cultivos los procesos de autorenovación, diferenciación y desarrollo de las células madre hematopoyéticas se da en asociación con células estromales y no requiere de la adición de factores de crecimiento (Dexter, et al 1984). Las células estromales de los cultivos a largo plazo, no solamente mantienen la autorenovación de las células madre (Schofield y Dexter, 1985), sino que también promueven la proliferación, desarrollo y maduración de las células progenitoras capaces de producir neutrófilos, macrófagos, cosinófilos, eritrocitos, megacariocitos, células cebadas y linfocitos B (Dexter, et al 1984).

En los CMOLP pueden producirse células maduras de todos los linajes bajo ciertas condiciones. Así por ejemplo; la adición de eritropoyetina, permite la producción de células rojas maduras (Eliason, 1984). Los linfocitos maduros no están presentes, pero los precursores inmaduros de linfocitos T y B se mantienen por períodos largos de tiempo (Jones-Villeneuve y Phillips, 1980; Dorshkind, 1990) y bajo condiciones especiales de cultivo se permite el desarrollo de linfocitos B (Whitlock y Witte, 1982; Whitlock, et al 1984).

D. MICROAMBIENTE HEMATOPOYETICO

1.- Células Estromales de Médula Osea

En 1970 se sugirió el término microambiente inductivo hematopoyético ("HIM") para definir la restricción del desarrollo local de la hematopoyesis mediada por células

estromales (Trentin, 1970), reconociéndose su importancia en la regulación de la hematopoyesis. Los estudios de interacción celular se han facilitado por el desarrollo de un sistema de cultivo el cual permite el mantenimiento a largo plazo de la hematopoyesis en presencia de células estromales cultivadas (Dexter, 1979; Dexter, et al 1983). Las células estromales están compuestas de células endoteliales, células adventicias, células reticulares (las cuales construyen una matriz tridimensional), además de existir adipocitos (células de grasa ricas en energía) y macrófagos (Jandl, 1991).

Las células endoteliales, además de forrar a los sinusoides, sirve como barrera para permitir sólo el paso de las células sanguíneas maduras al sistema circulatorio e incluso selectivamente retener poblaciones inmaduras o defectuosas dentro de la médula (Dorshkind, 1990).

Las células reticulares son las células predominantes del estroma, con una morfología dendrítica que se ramifica en los espacios hematopoyéticos, formando una red semejante a una esponja. Estas células sintetizan fibras reticulares que junto con la red que forman, proveen un soporte físico para el desarrollo de las células en los espacios hematopoyéticos (Lichtman, 1981), existen dos tipos de células reticulares; adventicias y fibroblásticas (Mayani, et al 1992). Aquellas células reticulares que cubren áreas de la superficie de los sinusoides se les ha denominado células adventicias. Estas células parecen influir en el porcentaje de liberación de células sanguíneas a la circulación, variando la cantidad de cubierta que ellas forman sobre el lado interno de los sinusoides venosos (Allen, et al 1990). Las células reticulares fibroblásticas, están localizadas dentro de los cordones hematopoyéticos medulares, en donde sus delgadas prolongaciones citoplásmicas envuelven las células hematopoyéticas en maduración, lo anterior sugiere que hay interacciones funcionales entre los dos tipos celulares (Mayani, et al 1992). Otro tipo de células en el estroma es el adipocito, típico de la médula no-hematopoyética grasa, y probablemente derivada de la acumulación de lípidos en las células adventicias (Weiss, 1976). El papel específico de estos adipocitos en la hematopoyesis activa no es clara (Dorshkind, 1990; Abboud, et al 1993).

Tanto los macrófagos como los linfocitos forman parte del ambiente inductivo, particularmente como productores de factores de crecimiento, y en el caso de los

macrófagos por interacción célula-célula tan importante en el desarrollo de granulocitos y eritrocitos (Allen, et al 1990; Crocker, et al 1988).

2.- Componentes de la Matriz del Microambiente Hematopoyético

El papel de las células estromales en la elaboración de moléculas de la matriz extracelular fue reconocido al demostrar que los componentes específicos de la matriz extracelular, estaban presentes en los cultivos de médula ósea a largo plazo (Zuckerman y Wicha, 1983).

Dentro de los constituyentes primarios de la matriz extracelular de médula ósea se encuentran: colágena (tipo I, III, IV y V), glicoproteínas (fibronectina, laminina, trombospondina, hemonectina y tenascina), y glicosaminoglicanos (ácido hialurónico, condroitina, dermatán y heparán sulfato) (Yoder y Williams, 1995), los cuales se asocian con la hematopoyesis activa.

En los cultivos a largo plazo de médula ósea, la colágena, fibronectina y laminina se encuentran en el desarrollo temprano de células estromales y el depósito extracelular extensivo de algunas de estas proteínas coincide con la hematopoyesis activa. Los componentes más abundantes de la matriz son: la colágena, fibronectina, laminina, hemonectina y proteoglicanos.

La colágena tipo I y III son producidas por fibroblastos y están asociadas con las paredes microvasculares. La colágena tipo IV está confinada a las células tipo endotelial y a su lámina basal. Estas proteínas tienen suma importancia en la matriz ya que reconstituyen un microambiente hematopoyético funcional (Abboud, et al 1993).

Por otro lado, se ha detectado la expresión de fibronectina en la superficie de las células endoteliales de los sinusoides venosos y en los sitios de interacción entre estas células y los monocitos/granulocitos en desarrollo (Sorrel, 1988; Yoder y Williams, 1995). Las células madre hematopoyéticas y células progenitoras comprometidas interactúan con la fibronectina a través de la expresión de receptores de superficie celular que pertenecen a la familia de las integrinas (Yoder y Williams, 1995).

La laminina es el principal constituyente de la matriz extracelular y de las membranas basales de muchos tejidos. Es una glicoproteína con multidominios, sitios

mitogénicos y de adhesividad. La laminina interactúa con la colágena tipo IV y otros componentes de las membranas basales como los proteoglicanos (Yurchenco y Schittny, 1990)

La trombospondina (TSP) es sintetizada y secretada dentro de la matriz extracelular, por una amplia variedad de células, entre las que se encuentran: células endoteliales y megacariocitos (Frazier, 1987; Lawler J, 1986). La TSP en la matriz, es necesaria para la adhesión y crecimiento celular y se expresa diferencialmente durante la embriogénesis del ratón. La TSP también interviene en la adhesión de monocitos y macrófago. Esta glicoproteína funciona como una molécula de citoadhesión para una subpoblación de células progenitoras hematopoyéticas humanas (del linaje eritroide, granulocítico y megacariocítico). Conforme maduran los granulocitos y eritrocitos, reducen o pierden su capacidad de unirse a trombospondina, por lo tanto posiblemente los receptores para esta molécula pueden ser regulados diferencialmente durante el proceso de diferenciación de estas células (Long, 1993).

La hemonectina específicamente media la unión de granulocitos a la médula (Campbell, et al 1987). A diferencia de los neutrófilos maduros de médula, los neutrófilos circulantes no se unen *in vitro* a la hemonectina, lo anterior sugiere un posible mecanismo de control de la liberación del neutrófilo de la médula durante el desarrollo. Esta proteína en los fetos de ratones, se expresa de manera regulada en los tejidos que apoyan la granulopoyesis durante la ontogenia del sistema hematopoyético, quedando de manifiesto su importancia como una molécula de citoadhesión granulocítica (Long, 1993; Abboud, et al 1993).

El componente más complejo de la matriz extracelular son los proteoglicanos. Este consiste de un núcleo proteico, al cual uno o más glicosaminoglicanos se unen covalentemente. Varios proteoglicanos son producidos por células hematopoyéticas y células estromales de médula ósea, sugiriendo un importante papel de estas macromoléculas en interacciones célula-célula y célula-matriz. El heparán sulfato es el principal glicosaminoglicano de la superficie celular en cultivos a largo plazo de médula ósea y el sulfato de condroitina es la principal especie secretada (Allen, et al 1990; Zuckerman, et al 1989; Long, 1993). Los proteoglicanos que contienen heparina y el

heparán sulfato interactúan con laminina y colágena tipo IV (Yurchenco y Schittny, 1990) y se ha postulado que tienen un papel tanto en las interacciones célula-célula y en la retención y presentación de citocinas.

3.- Interacciones Celulares en Médula Osea

Las interacciones celulares son importantes para regular la comunicación intercelular, localización de células dentro del microambiente, la llegada de células tallo a órganos específicos, migración celular e iniciación de programas de desarrollo mediados por factores de crecimiento. Sin embargo, las interacciones sencillas tales como aquellas entre células y factores de crecimiento, no son el único mecanismo por el cual el desarrollo de las células hematopoyéticas puede ser regulada. La complejidad aumenta por las interacciones de factores de crecimiento con matriz extracelular o sistemas en los cuales se requieren interacciones múltiples para generar una respuesta de desarrollo específica (Long, 1993) (Figura 4).

En esencia, las interacciones celulares pueden ser simplificadas en tres categorías: célula-célula, célula-matriz extracelular y célula-factor de crecimiento.

La interacción célula-célula es requerida para sustituir la falta de comunicaciones ultraestructurales definidas entre las células hematopoyéticas y estromales. Esta interacción también es esencial en los cultivos de médula ósea a largo plazo, de hecho si los precursores linfohematopoyéticos son desprovistos de la adhesión a las células estromales, los precursores mueren (Dexter, et al 1990; Allen, et al 1990; Abboud, et al 1993).

La asociación de las células precursoras con el macrófago también es importante. Así, se ha documentado que en ésta asociación se lleva a cabo la división de células mieloides. También los granulocitos maduros se unen al macrófago y esta relación se considera como un mecanismo de eliminación por fagocitosis de granulocitos (Allen, et al 1990).

Una de las primeras interacciones observadas entre células hematopoyéticas y células estromales fue el desarrollo de islotes eritroblásticos, la cual consiste de un macrófago central rodeado por eritroblastos en proceso de maduración (Allen y Dexter, 1982). Esta adhesión resulta de la unión mediada por fibronectina (Viullet-Gaugler, et al

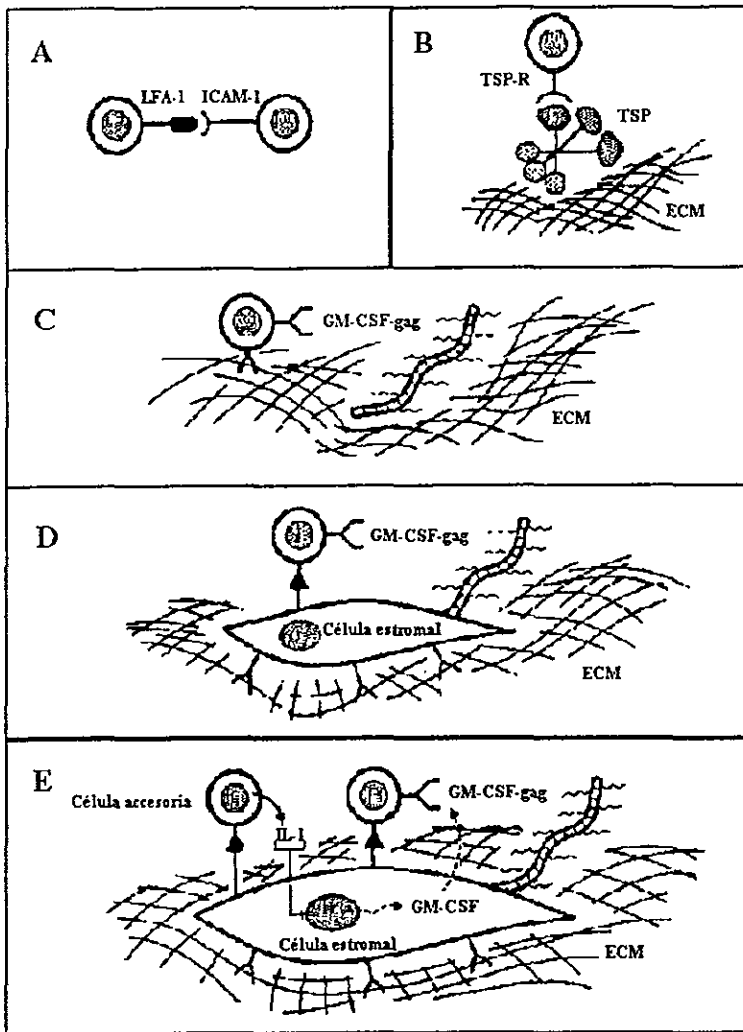


Figura 4. Interacciones de células hematopoyéticas. A, interacción célula-célula; B, interacción célula-matriz extracelular; C, interacción célula-factor de crecimiento-gag/proteoglicano; D, interacción célula-célula factor de crecimiento-complejo de proteoglicano; E, Complejo hipotético, indicando la señalización entre célula accesoria-célula estromal, célula hematopoyética-célula estromal, y célula estromal-proteoglicano-factor de crecimiento. LFA-1, antígeno funcional leucocitario; I-CAM-1, molécula de citoadhesión intercelular; TSP, trombospondina; TSP-R, receptor de TSP; ECM, matriz extracelular; gag, cadena de glicosaminoglicano unida al núcleo proteico de un proteoglicano. Tomado de Long MW, 1993.

1990). Los macrófagos sirven como nodrizas y están involucrados en la ingestión del núcleo abortado del entroblasto (Allen, et al 1990).

Como ya se mencionó anteriormente, varios componentes de la matriz extracelular median la adhesión celular. Esta unión de las células a las moléculas de citoadhesión es dada por receptores sobre la superficie de células hematopoyéticas; en particular el CD44 que es una molécula de adhesión asociada a la llegada de progenitores a la médula, la cual se ha encontrado en progenitores CD34⁺ (Lewinsohn, et al 1990).

Otros estudios han demostrado que linfocitos y células tallo se adhieren a células estromales vía la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM1), formando agregados reflejando asociaciones que normalmente ocurren en médula ósea (Funk, et al 1994).

En cultivos de médula ósea a largo plazo la hematopoyesis es sostenida sin la adición de factores de crecimiento. Es razonable deducir que la presencia de una capa alimenticia de células estromales en este tipo de cultivo, sean la fuente del estímulo inductor de la proliferación y diferenciación necesario para la hematopoyesis. Por otra parte, el requerimiento de un íntimo contacto entre células sugiere que estos estímulos no están siendo liberados como promotores del crecimiento difusibles, sino que son preferencialmente retenidos por las células estromales. Amplias investigaciones a nivel ultraestructural de la unión de las células estromales y hematopoyéticas no han demostrado la presencia de canales en la membrana o uniones complejas entre estas células. Por consiguiente, se ha favorecido la sugerencia de que el estímulo promotor del crecimiento se encuentra localizado en la membrana celular (Dexter et al., 1990a).

Por otro lado, los factores de crecimiento se pueden unir a las proteínas de la matriz extracelular para ser presentadas a las células progenitoras hematopoyéticas (Allen, et al 1990). La disponibilidad de los factores de crecimiento, presentados de una u otra manera establecería compartimentos dentro del microambiente, lo cual explicaría porque no se detectan la mayoría de los factores en los medios condicionados de cultivos (Kittler y Quesenberry, 1993).

Por otra parte, los factores de crecimiento hematopoyéticos unidos a matriz pueden ser presentados directamente a las células hematopoyéticas adheridas o pueden ser liberados en un complejo con heparan sulfato por degradación de la matriz y rompimiento proteolítico (Abbound, et al 1993).

En particular el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) puede unirse a glicosaminoglicanos de la matriz extracelular de la médula ósea (Gordon, et al 1987; Wynter, et al 1993), específicamente el heparán sulfato puede absorber tanto GM-CSF como interleucina-3 (IL-3) (Roberts, et al 1988). Además, formas unidas a membrana de factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) e interleucina-1 (IL-1) han sido encontradas sobre monocito/macrófagos (Schindler y Dinarello, 1990), y el factor de células tallo (SCF) también ha sido localizado en una forma transmembranal, lo cual sugiere que es necesario un íntimo contacto célula-célula para que ejerza sus efectos (Wynter, et al 1993).

E. FACTORES DE CRECIMIENTO HEMATOPOYETICOS

Hace aproximadamente 30 años que se desarrollaron los sistemas de cultivo celular para el crecimiento clonal de progenitores hematopoyéticos, lo cual fue la clave para el establecimiento de los linajes hematopoyéticos y el descubrimiento de que la división y diferenciación celular dependían del suministro de factores proteínicos altamente específicos, los cuales son reguladores de la hematopoyesis (Clark y Kamen, 1987). Dado que estas proteínas fueron inicialmente identificadas a través de ensayos de formación de colonias, éstas fueron llamadas Factores Estimuladores de Colonias (CSF's) (Clark y Kamen, 1987; Lange, et al 1992). Con el desarrollo de nuevas técnicas de purificación bioquímica y en particular con la tecnología del ADN recombinante, los genes que codifican a los factores de crecimiento fueron reconocidos, clonados y obtenidos en forma recombinante (Heyworth, et al 1990). Hoy en día, a todas las proteínas que están involucradas en el desarrollo de las células sanguíneas y en la inmunoregulación se les conoce como citocinas. Las citocinas se pueden dividir en varios grupos, tales como Factores de Crecimiento Hematopoyético, Interleucinas, Interferones, Factor de Necrosis Tumoral y otros Factores (Lange, et al 1992; Liles y VanVoorhis, 1995) (Tabla 1).

Citocina	Fuente celular	Peso Mol (Kd)	Función biológica
<u>Factores de crecimiento hematopoyético</u>			
Epo	Células peritubulares de riñón, células de kupfer (hígado).	34-39	Estimula la proliferación y diferenciación de células progenitoras eritroides.
G-CSF	Monocitos, fibroblastos, células endoteliales.	18-22	Incrementa la producción, maduración y diferenciación de precursores de neutrófilos.
GM-CSF	Linfocitos T, monocitos, fibroblastos, células endoteliales.	14-35	Promueve el crecimiento y diferenciación de células progenitoras mieloides. Activación de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos.
M-CSF	Monocitos, fibroblastos, células endoteliales.	35 x 2	Modula la activación fisiológica de monocitos y macrófagos; aumenta la producción de monocitos.
IL-3	Linfocitos T, células epiteliales de timo, células cebadas.	14-28	Promueve la proliferación de células progenitoras multipotenciales.
SCF	Células estromales de médula ósea.	51 x 2	Interacciona con otros factores de crecimiento hematopoyético para estimular células progenitoras mieloides, linfoides y eritroides.
<u>Interferones</u>			
IFN- α	Linfocitos B, células NK, monocitos y macrófagos.	16-27	Actividad antiviral, antitumoral, estimula la citotoxicidad inmune.
IFN- β	Fibroblastos, células epiteliales, macrófagos	20	Idem.
IFN- γ	Linfocitos T, células NK.	17 x 2	Activación de macrófagos, estimula la citotoxicidad inmune, actividad antiviral.
<u>Interleucinas</u>			
IL-1	Monocitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliales, fibroblastos, linfocitos T y B y células NK.	17.5	Sinergiza con otras citocinas para promover la proliferación de linfocitos T y B, induce la expresión de genes de citocinas, induce la respuesta de fase aguda, actúa como pirógeno endógeno, efectos en sistema nervioso y endócrino.
IL-2	Linfocitos T	15-20	Estimula la proliferación y diferenciación de linfocitos T, incrementa la actividad de células NK, producción de inmunoglobulinas por linfocitos B.
IL-4	Linfocitos T, macrófagos, linfocitos B, basófilos, células cebadas y estromales.	15-20	Induce diferenciación de linfocitos T CD4 a células Th2, suprime el desarrollo de Th1, estimula la proliferación y diferenciación de linfocitos B cambios de isotipo.
IL-5	Linfocitos T, células cebadas, eosinófilos.	21.5 x 2	Activa las funciones, el crecimiento y diferenciación de eosinófilos. Quimiotáctico para eosinófilos.
IL-6	Linfocitos T, monocitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, hepatocitos.	21-28	Induce la entrada de células primitivas hematopoyéticas al ciclo celular. Estimula la maduración de megacariocitos, promueve el crecimiento y la diferenciación de linfocitos B y T. Actúa como pirógeno endógeno.

Tabla 1. Citocinas que modulan la actividad biológica de células hematopoyéticas. Tomado de Liles y van Voorhis, 1995; complementado de Moreno 1996.

Citocina	Fuente celular	Peso Mol (Kd)	Función biológica
<i>Interleucinas (continuación)</i>			
IL-7	Células estromales de médula ósea.	25	Estimula la proliferación de precursores B y T, células asesinas naturales y linfocitos T citotóxicos, estimula la actividad tumoricida de macrófagos.
IL-8	Monocitos, macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, linfocitos T, epiteliales	8-10 x 2	Factor quimiotáctico para neutrófilos, los activa e incrementa la adherencia de neutrófilos y monocitos a células endoteliales.
IL-9	Linfocitos T	32-39	Aumenta la supervivencia de linfocitos, aumenta la actividad de células cebadas, sinergiza con Epo para promover la eritropoyesis.
IL-10	Linfocitos T y B, macrófagos.	19 x 2	Suprime la actividad funcional de macrófagos. Incrementa la proliferación de linfocitos B.
IL-11	Células estromales de médula ósea.	20-23	Actividad sinérgica con IL-3 e IL-4 para acelerar la proliferación y diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas.
IL-12	Macrófagos, linfocitos B.	35-40	Sinergiza con otros factores para aumentar la proliferación de células tallo hematopoyéticas. Maduración de células NK, diferenciación de Th1.
IL-13	Linfocitos T	12	Estimula el crecimiento y la diferenciación de linfocitos B, inhibe la producción de citocinas proinflamatorias por macrófagos.
IL-14	Linfocitos T	45	Proliferación y diferenciación de linfocitos B.
IL-15	Monocitos, linfocitos T, células estromales.		Proliferación de linfocitos T.
<i>Factores de Necrosis tumoral</i>			
TNF- α	Macrófagos, linfocitos T y B, NK, endoteliales, neutrófilos, astrocitos.	17 x 1-5	Efectos diversos en células epiteliales, modula la expresión de factores de crecimiento y transcripción, citocinas, receptores de superficie celular, proteínas fase aguda. Lisis tumoral, efectos proinflamatorios.
TNF- β	Linfocitos T y B, astrocitos.	20-180 x 3	Idem.
<i>Otras citocinas.</i>			
TGF- α	Macrófagos, queratinocitos.	26	Estimula la proliferación de fibroblastos, promueve la angiogénesis.
TGF- β	Fibroblastos, monocitos, linfocitos T, plaquetas.	12.5 x 2	Síntesis de matriz extracelular, efecto fibrogénico, inhibidor de la proliferación de varios tipos celulares.
PDGF	Plaquetas, macrófagos, endotelios, fibroblastos.	28-31	Mitógeno de fibroblastos, epitelios, endotelios. Quimiotáctico para fibroblastos, neutrófilos y monocitos.
LIF	Células estromales, fibroblastos, linfocitos T, macrófagos.	46	Suprime la diferenciación de células tallo hematopoyéticas. Potencia la proliferación de células progenitoras sanguíneas dependientes de IL-3.

Tabla 1 Continuación. Epo, eritropoyetina; CSF, factor estimulador de colonias; GM, granulocitos-macrófagos; SCF, factor de células tallo; IFN, interferón; IL, interleucinas; TNF, factor de necrosis tumoral; TGF, factor de crecimiento transformante; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; LIF, factor inhibitorio de leucemias.

Los factores de crecimiento hematopoyéticos comprenden una familia de glicoproteínas, que interactúan a diferentes niveles en la cascada de diferenciación de las células hematopoyéticas. Estos factores usualmente ejercen su efecto sobre células en la inmediata vecindad de su fuente actuando de una manera parácrina (que actúan sobre células vecinas), o autócrina (que actúan sobre las células que los producen) (Wakefield, 1990; Meager, 1991). Algunos de estos factores son pleiotrópicos (que actúan sobre muchos tipos celulares), mientras que otros parecen ser restrictivos de un linaje celular.

Los principales reguladores de la formación y función de granulocitos y macrófagos son cuatro factores estimuladores de colonias: Granulocito-Macrófago-CSF (GM-CSF), Granulocito-CSF (G-CSF), Macrófago-CSF (M-CSF) y Multi-CSF o IL-3 (Interleucina-3) (Dexter, et al 1990; Sachs y Lotem, 1994). Dos de estos CSFs son relativamente linaje específicos en sus acciones. El G-CSF estimula a granulocitos neutrófilos y sus progenitores comprometidos, y el M-CSF preferentemente actúa sobre monocitos-macrófagos. Los otros dos CSFs tienen un amplio espectro de acciones. La IL-3 promueve la proliferación y diferenciación de células multipotenciales así como células progenitoras de varios diferentes linajes. El GM-CSF preferencialmente estimula la proliferación y desarrollo de granulocitos y macrófagos (Pierce, 1989).

Es importante mencionar que existen otros factores hematopoyéticos que de alguna manera influyen en la mielomonocitopoyesis, o en la función de células maduras, entre las que encontramos varias Interleucinas y el Factor de Células Tallo (SCF) (Tablas 1).

F. RECEPTORES PARA LOS FACTORES DE CRECIMIENTO HEMATOPOYETICO

La proliferación, diferenciación y función de células hematopoyéticas está regulada por una compleja red de glicoproteínas denominada factores Estimuladores de Colonias (CSF's) o Factores de Crecimiento Hematopoyético (HGF's). Para ejercer sus distintas funciones biológicas, los HGF's deben unirse a receptores de superficie celular específicos sobre la célula (Nicola, 1989).

La caracterización molecular de los receptores de los factores de crecimiento hematopoyéticos, han permitido identificar dos familias importantes de receptores: la familia del receptor de citocinas (CR) (Cosman, et al 1990; Bazan, 1990) y la familia del receptor tirosina cinasa (RTK) (Ullrich y Schlessinger, 1990) (Figura. 5).

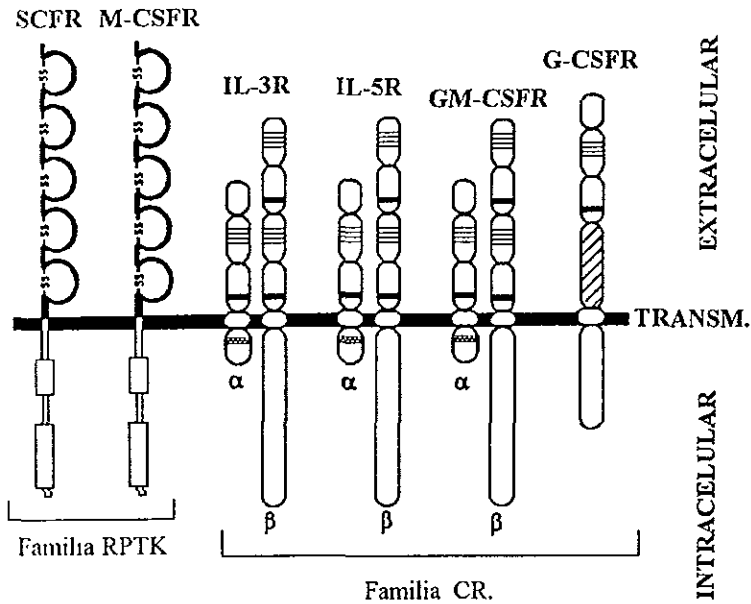
Los receptores de superficie celular para el M-CSF y el SCF, pertenecen a la familia RTK, mientras que los receptores para las citocinas tales como GM-CSF, G-CSF, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 y el factor inhibidor de la leucemia (LIF) son miembros de la familia CR (Hallek, 1995).

1.-Receptores Tirosina Cinasa (RPTK)

La familia de los receptores tirosina cinasa incluyen a los receptores para el factor de crecimiento epidermal (EGF), insulina, factor de crecimiento semejante a insulina 1 (IGF-1), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), M-CSF y SCF. En general, los receptores para estos polipéptidos tienen un dominio extracelular grande que une al ligando, un dominio transmembranal, y un dominio citoplásmico grande con actividad intrínseca de tirosina cinasa (Miyajima, et al, 1992). La unión de los ligandos al dominio extracelular induce dimerización del receptor, el cual parece ser importante para la activación del receptor tirosina cinasa, un paso crucial para transmitir una señal intracelular. Cuando por mutaciones se activa el receptor tirosina cinasa, se abroga el requerimiento de ligando y constitutivamente se transmite señales. Por lo tanto, los genes para los receptores tirosina cinasa, se les conoce también como proto-oncogenes (Cantley, et al 1991). Entre los receptores para factores de crecimiento, el receptor para el M-CSF y SCF son codificados por los proto-oncogenes *c-fms* (Roussel, 1994) y *c-kit* (Yarden, et al 1987) respectivamente.

2.- Receptores de citocinas (CR)

Todos los miembros de esta familia tienen un simple dominio transmembranal hidrofóbico. El dominio extracelular contiene dos regiones principales de homología: una región que contiene cuatro residuos de cisteína localizados en la mitad de la parte N-terminal del dominio extracelular. Las uniones disulfuro pueden ser formadas entre el



- ≡ CCCC- Cisteinas conservadas.
- WSXWS- Trp-Ser-X-Trp-Ser.
- ⊞ RLFP-Arg-Leu-Phe-Pro
- ▨ Dominio fibronectina tipo III
- ⊕ Dominio semejante a inmunoglobulina.

Figura 5. Estructura de los receptores de los principales factores de crecimiento de macrófagos y granulocitos. Tomado de Ihle y Ker, 1995; Mui y Miyajima, 1994; y Baker, et al, 1994.

primero y el segundo residuo de cisteína, o entre el tercero y el cuarto residuo de cisteína. La otra es una secuencia homóloga Trp-Ser-X-Trp-Ser (donde X es un aminoácido no conservado), referida como el "motif WS", el cual está localizado próximo al dominio transmembranal. El "motif WS" puede funcionar como el principal sitio de unión del ligando en estos receptores de citocinas (Thèze, 1994). Esta familia de receptores incluye a la subunidad β del receptor de IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, GM-CSF, G-CSF, eritropoyetina (Epo) y el LIF. Los receptores de alta afinidad para IL-3, IL-5 y GM-CSF están interrelacionados, ya que cada uno de estos receptores consisten de una subunidad α específica para la citocina (IL-3 α , IL-5 α o GM-CSF α) y una subunidad común β (β_c) (Thèze, 1994, Mui y Miyajima, 1994; Bagley, et al 1997). En el ratón existe una situación análoga, excepto que además de la subunidad β_c que es mostrada entre los receptores para IL-3, IL-5 y GM-CSF, existe una segunda subunidad β , la cual se asocia únicamente con la subunidad α para la IL-3, llamada β_{IL-3} . Lo anterior, explica porqué la IL-3, IL-5 y GM-CSF compiten entre ellos para unirse a los mismos receptores (Hara y Miyajima, 1992; Hara y Miyajima, 1995; Bagley, et al 1997).

3.-Señalización a través de los receptores para factores de crecimiento hematopoyético

La actividad tirosina cinasa para la transducción de la señal es indispensable en los receptores de los factores de crecimiento de tipo tirosina cinasa (RTK). La unión de un ligando induce autofosforilación del receptor así como la fosforilación de tirosina de varias proteínas específicas que están involucradas en la transmisión de la señal, tales como fosfolipasa C- γ (PLC γ), fosfatidilinositol 3-cinasa (PI-3K), o proteína activadora ras GTPasa (rasGAP). Una vez que el ligando se une, los RTK se asocian físicamente con sus sustratos, los cuales se unen a través de una secuencia de aminoácidos específica (dominio SH2) a los residuos específicos de tirosina fosforilada de los RTK (Hallek, 1995). Por este mecanismo, un RTK activado puede inducir la fosforilación de tirosina de diferentes sustratos.

Investigaciones recientes indican que la unión del ligando a los RTK inducen hetero u homodimerización de los receptores, lo cual parece ser esencial para la transmisión de la señal (Van der Geer, et al 1994).

Los mecanismos de activación inducidos por los receptores de citocinas son menos entendidos. Se ha demostrado que los ligandos para los receptores de citocinas inducen la fosforilación de tirosinas, a pesar de que ninguno de estos receptores tiene actividad intrínseca de cinasa (Hallek, 1995). Dado lo anterior, estos receptores necesitan activar y/o asociarse a tirosinas cinasas citosólicas o de membrana. En la actualidad tres familias de tirosinas cinasa independientes del receptor se conocen que son activadas en respuesta a los factores de crecimiento hematopoyéticos: Src cinasas, Janus cinasas y c-Fes/c-FPs (Hallek, 1995; Ihle, et al 1995).

Se han realizado progresos para entender los mecanismos de señalización bioquímica de los factores de crecimiento hematopoyéticos. En particular, la identificación de una cascada de señalización que comprende la activación coordinada de varios componentes importantes, ha traído alguna luz en la señalización de los factores de crecimiento hematopoyéticos. Sin embargo, es menos entendido como estas señales son transducidas para activar la transcripción de genes específicos (Hallek, 1995).

G. CELULAS FAGOCITICAS

En el medio ambiente existe una gran cantidad de agentes que pueden infectar al organismo: virus, bacterias, hongos, parásitos etc. La defensa del organismo es responsabilidad del sistema inmunológico, el cual es complejo e incluye la participación de varias células y factores solubles que interaccionan entre ellos para conformar un sentido biológico defensivo (Roit, 1991).

En general, y de manera simple, el sistema defensivo está compuesto de tres tipos de respuesta: la inflamatoria, la natural y la específica (adaptativa). Las dos primeras forman parte de una defensa innata o inespecífica, y la última consiste en un reconocimiento específico del antígeno y la posterior presencia de memoria contra este agente (Abbas, et al 1991).

En particular, en la defensa inespecífica participan las denominadas células fagocíticas, que tienen la propiedad de distinguir lo propio de lo extraño y las responsables de montar una respuesta inflamatoria; estas células son los fagocitos mononucleares

(monocito-macrófago) y la serie fagocitos polimorfonucleares (neutrófilo, eosinófilo y basófilos).

Para propósitos de este trabajo únicamente nos limitaremos a describir las principales características morfológicas y funcionales de los monocitos-macrófagos y granulocitos neutrófilos.

1.-Monocito-Macrófago

La población de monocito-macrófago, también denominada fagocitos mononucleares, provienen de la multiplicación y diferenciación de la CFU-GM promovida principalmente por el M-CSF. Estas células pasan por el estadio de diferenciación de monoblasto, promonocito, monocito y macrófago (Figura 6). Los macrófagos son monocitos que han sufrido una transformación después de estar en circulación (Jandl, 1991).

Dado que los macrófagos son la fuente principal tanto de M-CSF como de G-CSF, los macrófagos son capaces de regular su propia producción.

Maduración y Morfología

Los monoblastos son células de tamaño medio, con núcleo voluminoso e indentado, con uno o dos nucleolos grandes embebidos en su cromatina moteada y no son móviles. La generación de promonocitos por los monoblastos requiere de dos divisiones concatenadas produciendo una célula grande capaz de moverse y con receptores de superficie para IgG y C3b. Los monocitos maduros son las células sanguíneas más grandes (16 a 18 μm de diámetro) y representan del 3 al 8% de los leucocitos circulantes. Poseen abundante citoplasma azul grisáceo salpicado con gránulos púrpuras que son solamente débilmente visibles con tinción Wright-Giemsa. El núcleo es grueso y lobular, localizado centralmente, con la cromatina nuclear arreglada en forma de encaje calado decorado con pequeños grupos de cromatina (Gulati, et al 1988; Jandl, 1991).

La forma final de monocito es el macrófago y su transición esta determinada por un agrandamiento citoplásmico, núcleo pequeño de redondo a oval y normalmente en la periferia, incremento de vacuolas, mitocondrias, lisosomas y enzimas respiratorias.

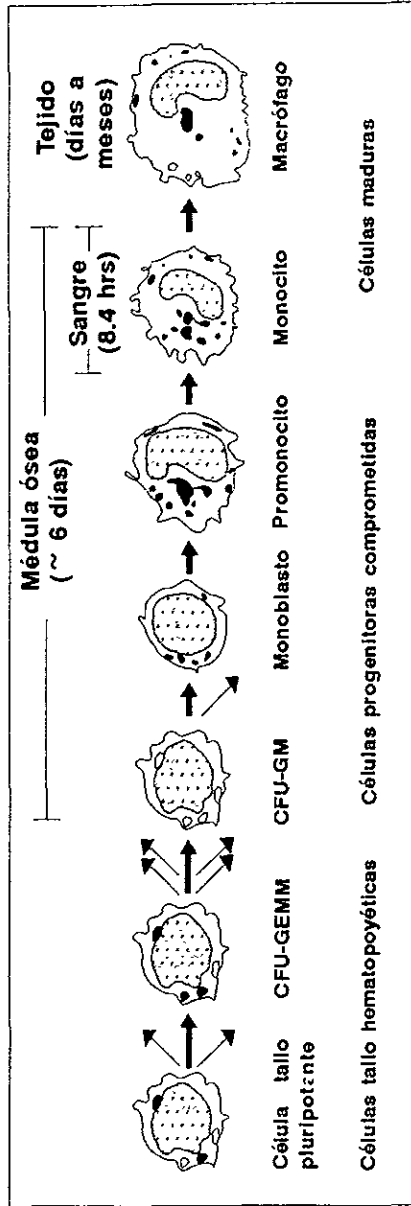


Figura 6. Origen, cinética y tiempo de escala de maduración de fagocitos mononucleares. Tomado y modificado de van Futh, R., 1993.

Cinética y Función de Monocitos.

El tiempo de tránsito en médula ósea desde el monoblasto hasta monocito maduro es aproximadamente de 6 días y no hay una reserva en médula ósea comparable a la de los neutrófilos. Después de 20 a 30 minutos de atravesar la barrera vascular, los monocitos extravasculares rápidamente recobran sus características funcionales y en las siguientes horas se transforman en macrófagos como respuesta a la activación con interferón gamma (Jandl, 1991).

Los monocitos viajan cerca del 80% del tiempo, estando fácilmente disponibles para el paso a circulación a los sitios de inflamación. En comparación con los neutrófilos, los monocitos son más lentos para aparecer en los sitios de inflamación, llegando en número apreciables en horas a días más que en minutos a horas.

Los monocitos sanguíneos pueden subdividirse en varias subclases, de acuerdo a diferencias citoquímicas y su respuesta a citocinas. Los monocitos inmaduros tienen pocos receptores Fc, y la fagocitosis es mínima, sin embargo son ricos en peroxidasa granular. Al madurar los monocitos se compactan y los gránulos primarios están frecuentemente vacíos, los gránulos secundarios formados durante la maduración pierden la actividad de peroxidasa (Jandl, 1991).

En ausencia de inflamación los monocitos de todas las clases escapan de los vasos sanguíneos de una manera azarosa. Una vez en los tejidos, los monocitos sufren una transformación en macrófagos tisulares, teniendo propiedades funcionales y morfológicas que son características del tejido en el cual se encuentra. Los macrófagos tisulares no estimulados sobreviven aproximadamente 3 meses.

Durante el proceso inflamatorio la producción de monocitos se incrementa para tener un gran número de monocitos en circulación. Lo anterior es dado por un incremento en el porcentaje de división tanto de monoblastos y promonocitos, seguido por un incremento en el número de promonocitos en la médula ósea. Estos cambios son inducidos por un factor humoral denominado factor incrementador de la monocitopoyesis (FIM) por sus siglas en inglés: factor increasing monocytopoiesis. Este factor es un regulador humoral específico de la producción de monocitos el cual es sintetizado y secretado por los macrófagos al fagocitar en el sitio de inflamación. Durante la inflamación aguda el número

de monocitos que entran y permanecen en circulación se incrementan y su tiempo de tránsito en la circulación es mucho más corto que bajo condiciones normales; los monocitos que migran a los sitios de inflamación se diferencian en macrófagos. En el exudado inflamatorio el incremento en el número de macrófagos se debe principalmente al influjo de monocitos, pero después del segundo día la producción local también tiene una contribución (van Furth, 1993).

Los macrófagos ejercen una multitud de funciones, sobresaliendo la fagocitosis y la muerte intracelular y digestión de microorganismos. Otras actividades de los macrófagos son: la presentación de antígenos, citotóxicidad de células tumorales independiente y dependiente de anticuerpos, inhibición de la proliferación celular y la producción y secreción de una gran variedad de productos biológicos importantes tales como enzimas, inhibidores de enzimas, factores de coagulación, componentes de la cascada de complemento, factores de crecimiento, citocinas, entre otras (van Furth, 1993).

2.-Granulocito-Neutrófilo

Los neutrófilos representan entre el 50 al 60% de los leucocitos totales circulantes y constituyen la primera línea de defensa contra agentes infecciosos o sustancias que penetran las barreras físicas del organismo. Sus blancos incluyen bacterias, hongos, protozoarios, virus, células infectadas viralmente y células tumorales (Ratcliffe, et al 1988).

Maduración y Morfología.

La división y maduración de células mieloides proliferantes está asociada con la reducción en su volumen nuclear y celular, condensación progresiva de la cromatina en heterocromatina inactiva, y la aparición secuencial de gránulos primarios prominentes (azurófilos) y gránulos secundarios pequeños (Jandl, 1991).

Los granulocitos-neutrófilos presentan seis estadios morfológicamente reconocibles en médula ósea, siendo el orden de maduración el siguiente: mieloblasto, promielocito, mielocito, metamielocito, banda y segmentado o polimorfonuclear (Figura 7) (Glasser y Fiederlein, 1987).

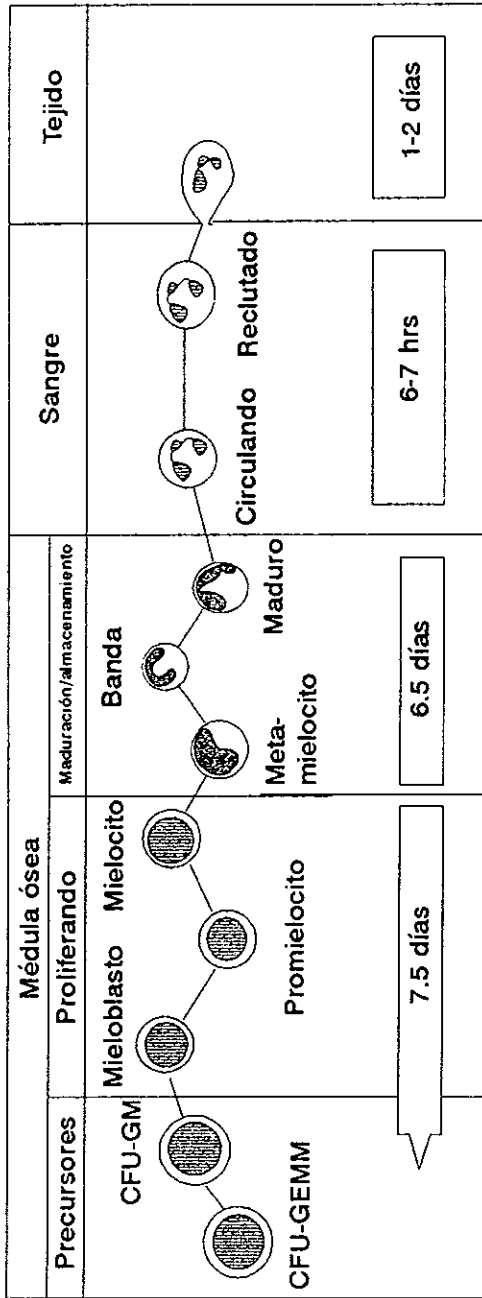


Figura 7. Estadios de diferenciación y tiempo de escala de maduración de granulocitos neutrófilos. Tomado y modificado de Gordon y Barret, 1985.

La progenie más joven identificable de los CFU-G son los mieloblastos, los cuales son células de tamaño medio, que tienen un núcleo rodeado excéntricamente por un delgado anillo de citoplasma y pueden poseer más de dos nucleolos.

Cuando empiezan a aparecer los gránulos primarios y el citoplasma se expande, es señal de que se progresa a la siguiente fase, la de promielocito. En esta etapa los nucleolos comienzan a desvanecerse y la cromatina se vuelve granular. Hacia el final de la fase promielocítica, la síntesis de gránulos primarios cesa y los primeros gránulos secundarios aparecen. La etapa mielocítica está marcada por una acumulación de gránulos secundarios, el núcleo se encuentra desplazado, reducido y ligeramente aplanado.

El resultado de la división terminal del mielocito es el metamielocito, el cual es una célula pequeña con un núcleo ligeramente indentado en forma de frijol (en humano) o una perforación central (en ratón) que no tiene nucleolo. La condensación nuclear permite identificar a la célula en forma de banda, la cual ha alcanzado su dimensión final y posee un núcleo en forma de herradura (en humano) o en forma de anillo en ratón. La cromatina nuclear está agregada en densos grupos y los gránulos están en relación 10:1 con los gránulos primarios. Las formas en banda son los neutrófilos más jóvenes que se encuentran en sangre periférica, constituyendo el 1 al 5% del conteo diferencial de células blancas. El producto final de la maduración mielóide es el neutrófilo segmentado, que se reconoce fácilmente porque su cromatina forma de 2 a 5 lóbulos unidos por filamentos cortos de cromatina. Los gránulos específicos son los que predominan y hay pocos o ningún gránulo primario (Jandl, 1991; Gulati, et al 1988).

Los gránulos primarios, que son más abundantes en la etapa promielocítica, contienen enzimas lisosomales (por ejemplo, peroxidasa e hidrolasas ácidas) con cantidades mínimas de neuraminidasa. Por otra parte, los gránulos específicos, que se encuentran en etapas mielocíticas y posteriores contienen varias enzimas incluyendo, peroxidasas, neuraminidasa, lactoferina, fagocitina y fosfatasa alcalina (Gulati, et al 1988).

Los neutrófilos maduros de la médula ósea son liberados a la circulación donde pasan de 6 a 7 hrs antes de marginarse y entrar a la reserva tisular, donde sobreviven de 1 a 2 días. Los neutrófilos son producidos en médula ósea en un porcentaje de 10^{11} células por día; esto es controlado por dos factores estimuladores de colonias: G-CSF y GM-CSF, que

dirigen la producción y diferenciación de células progenitoras de médula ósea. El porcentaje de diferenciación de neutrófilos puede incrementarse hasta 10 veces durante la etapa de estrés e infección (Smith, 1994).

Durante la respuesta inflamatoria, se generan factores quimiotácticos por los mismos agentes infecciosos, así como aquellos liberados como resultado de su contacto inicial con los fagocitos y otros componentes del sistema inmune, los cuales reclutan a los neutrófilos en los sitios de infección o daño. Bajo condiciones normales, los neutrófilos se encuentran a lo largo de las paredes microvasculares por interacciones de baja afinidad como las del complejo de adhesión CD11/CD18 en neutrófilo y las de adhesión leucocitaria endotelial que incluyen ICAM-1 e ICAM-2 (moléculas de adhesión intercelular tipo 1 y 2) y selectinas-E (Zimmerman, et al 1992). Por la influencia de un gradiente quimiotáctico (entre los cuales se encuentra la IL-8 y productos bacterianos), generado localmente y por difusión de los quimioattractantes del sitio de infección, los neutrófilos penetran entre las células endoteliales (diapédesis) y migran a través del tejido conectivo hacia los sitios de infección (Smith, 1994).

Cuando un neutrófilo encuentra su blanco, lo rodea por medio de sus lamelipodios fusionando sus extremos quedando la partícula o el microorganismo dentro de la membrana invaginada, la cual se fusiona con los gránulos formándose un fagolisosoma en donde se descarga el contenido de los gránulos con un ambiente altamente tóxico (Jandl, 1991). Durante el ataque estos neutrófilos mueren, siendo desplazada esta población por monocitos-macrófagos, eosinófilos, basófilos y linfocitos.

Un gran número de factores humorales se han reportado que modulan las funciones del neutrófilo *in vitro* y algunas *in vivo* (Smith, 1994). Por otra parte, los neutrófilos también sintetizan y secretan cantidades pequeñas de algunas citocinas tales como: IL-1, IL-6 e IL-8, TNF- α , GM-CSF y M-CSF las cuales pueden actuar de una manera autócrina o parácrina (Meager, 1991; Lloyd y Oppenheim, 1992). Estas citocinas son virtualmente indetectables en circulación excepto bajo condiciones patológicas.

H. FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE GRANULOCITOS Y MACROFAGO (GM-CSF).

1.- Estructura Proteínica del GM-CSF

El Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF) fue uno de los primeros factores de crecimiento hematopoyéticos en ser descritos y molecularmente clonado. Su nombre deriva de la capacidad que tiene para estimular células progenitoras individuales de médula ósea, en cultivos semisólidos, para proliferar y diferenciarse en colonias de granulocitos y macrófagos o una mezcla de ambos tipos celulares (Metcalf, 1987; Ruef y Coleman, 1990).

En 1977, fue purificado el GM-CSF del medio condicionado de pulmón de ratón (Burgess, et al 1977). Sin embargo, la cantidad tan pequeña de material obtenido, no permitió la secuenciación y clonación sino hasta 1985 (Sparrow, et al 1985; Burgess, et al 1986). En 1984 dos grupos de manera independiente purificaron el GM-CSF humano del medio condicionado por la línea celular T Mo (Gasson, et al 1984; Wong, et al 1985a) y posteriormente fue clonado (Wong, et al 1985a;b).

Los DNA complementarios de GM-CSF de ratón y humano codifican polipéptidos de 124 y 127 aminoácidos respectivamente, y ambas proteínas nativas son precedidas por una secuencia líder de 17 aminoácidos (Gasson, 1991) (Tabla 2). Los tres residuos adicionales en la secuencia humana se encuentran localizados dentro de los residuos 21 y 22 de la secuencia del ratón.

El GM-CSF humano y de ratón tienen solamente 56% de homología a nivel de aminoácidos. Por consiguiente, dada la baja homología entre el GM-CSF humano y de ratón, no existe actividad cruzada entre ambas especies (Gasson, 1991; Meager, 1991).

El GM-CSF aislado de diversas fuentes tanto de ratón como de humano, es una proteína glicosilada con un peso molecular aproximado de 23 Kd (Gasson, 1991). Se han reportado diferentes pesos moleculares para este factor; sin embargo, se debe a los diferentes grados de glicosilación (Nicola, et al 1979; Ruef y Coleman, 1990). La secuencia de aminoácidos del GM-CSF humano y de ratón poseen dos sitios potenciales de N-glicosilación; no obstante, se encuentran ubicados en lugares diferentes dentro de cada una

Factor GM-CSF	Fuente celular no transformada	Células blanco	Localización cromosomal	Peso Molecular	Aminoácidos
Humano	Fibroblastos Linfocitos T Cél. endoteliales Osteoblastos Macrófagos Cél. músculo liso Cél. epiteliales	Granulocitos Linfocitos T Cél. endoteliales Macrófagos Eosinófilos Basófilos Queratinocitos	5q21-5q32	~23KD	127
Ratón	Idém	Idém	11 sub-banda B1	~23KD	124

Tabla 2. Algunas características del GM-CSF.

de las moléculas respectivas (Gough and Nicola, 1990). El grado de glicosilación varía con la fuente celular, pero no afecta la actividad biológica del GM-CSF (Gough y Nicola, 1990; Crosier, et al 1992).

El GM-CSF de humano y de ratón poseen dos puentes disulfuro, siendo altamente conservados e importantes para su estabilidad y actividad biológica (Gasson, 1991; Crosier, et al 1992).

La determinación de la estructura del GM-CSF recombinante humano por cristalografía de rayos X, muestra que esta formado de un haz de cuatro α hélices y que la primera y cuarta hélice del GM-CSF están involucrados en la unión del receptor y la bioactividad (Brown, et al 1990; Shanafelt, et al 1991a). Se ha demostrado que la primera α hélice del GM-CSF media la unión de alta afinidad de este factor a través de la interacción con la cadena β de su receptor (Shanafelt, et al 1991b). En particular, se ha demostrado que el residuo Glu²¹ pero no Gln²⁰ del GM-CSF humano es esencial para esta interacción (Lopez, et al 1992). En el GM-CSF de ratón se ha encontrado que Lys¹⁴, His¹⁵ y Glu²¹ son importantes para la unión al receptor y su bioactividad (Meropol, et al 1992; Shanafelt y Kastelein, 1992). En otro trabajo se encontró que mientras que la Glu²¹ es un residuo crítico para la unión del GM-CSF a la cadena β del receptor, la Asp¹¹² está involucrada en la unión de la cadena α del receptor del GM-CSF, apoyando el modelo donde se propone que la cuarta α hélice del GM-CSF interactúa con la cadena α del receptor y la primer α hélice con la cadena β del receptor del GM-CSF (Hercus, et al 1994).

Por otro lado, se ha demostrado por medio de anticuerpos monoclonales contra péptidos sintéticos que corresponden a lo largo de la molécula de GM-CSF de ratón, que existen epítopes dentro de la región amino-terminal los cuales son importantes para la actividad biológica, principalmente una región que corresponde a los residuos 27 al 38 (Greenfield, et al 1993).

2.- Organización Genómica y Localización Cromosómica del GM-CSF

El GM-CSF humano y de ratón están codificados por genes únicos que son altamente homólogos tanto en sus regiones codificantes como no codificantes. Ambos genes tienen una longitud de 2.5 pares de kilobases (Kbp) con cuatro exones y tres intrones

(Hueber, et al 1985; Miyatake, et al 1985). En el ratón, el gen se localiza en el cromosoma 11 en la sub-banda B1 y en el hombre en el cromosoma 5 en la banda q21-q32 (Gough, et al 1984; Hueber, et al 1985; Barlow, et al 1987). En esta región del cromosoma humano también se localizan otros genes de algunos factores de crecimiento: M-CSF, Multi-CSF o IL-3, IL-4, IL-5, ECGF y receptores como el *c-fms* y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (Nimer y Golde, 1987; Yang, et al 1988).

3.- Expresión del GM-CSF

El GM-CSF es producido por diversos tipos celulares y bajo diferentes circunstancias. La inyección de endotoxina bacteriana en ratones da una rápida liberación de GM-CSF en el suero. Casi todos los órganos y tejidos derivados de un ratón retado con endotoxina y cultivados *in vitro* liberan GM-CSF en el medio de cultivo (Metcalf, 1984).

La producción de este factor en cultivos *in vitro* es continua por varios días, lo cual refleja que hay síntesis de *novo* más que la liberación de proteína ya preformada, puesto que la producción puede ser bloqueada por inhibidores de síntesis de proteína (Nicola, et al 1979).

Los linfocitos T, macrófagos, células cebadas, células endoteliales y fibroblastos pueden ser inducidas a expresar RNA mensajero y secretar GM-CSF. Los linfocitos T y macrófagos son directamente activados por estímulos inmunes o inflamatorios (Ruef y Coleman, 1990; Gasson, 1991; Shannon, et al 1997). El GM-CSF producido por células endoteliales y fibroblastos es inducido por citocinas como IL-1 y TNF (Figura 8). El GM-CSF no se encuentra en circulación a niveles detectables, por lo tanto, a diferencia de las hormonas, el GM-CSF se comporta de acuerdo a un modelo parácrino donde este factor se produce y actúa localmente (Gasson, 1991).

4.-Eventos de señalización intracelular inducidos por GM-CSF

Ninguna de las dos cadenas del receptor para el GM-CSF posee actividad intrínseca de tirosina cinasa en sus dominios citoplasmáticos; sin embargo, varias evidencias indican la participación de tirosina cinasa en la vía de señalización de IL-3/GM-

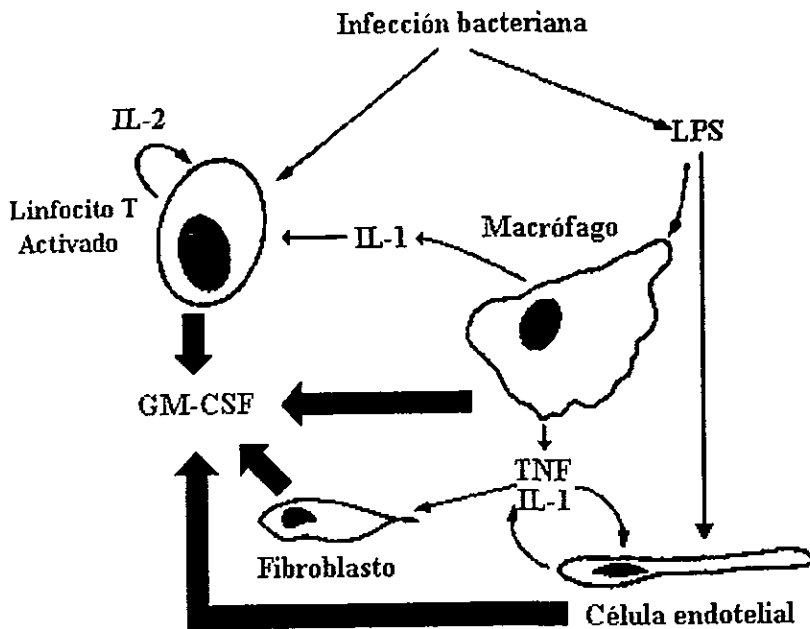


Figura 8. Red de señales y estímulos que pueden dar origen a la producción de GM-CSF después de una infección bacteriana. Tomado de Gough y Nicola, 1990.

CSF (Miyajima, et al 1993). Se ha reportado que varias tirosinas cinasa son activadas en células estimuladas por IL-3 o GM-CSF: Fyn, Lyn Fps y Janus cinasa 2 (JAK2) (Mui y Miyajima, 1994; Hara y Miyajima, 1996). JAK2 se ha demostrado que se encuentran asociado a la cadena β del receptor de GM-CSF (Sato y Miyajima, 1994). Además de la misma cadena β , de JAK2 y Fps, muchos sustratos intracelulares (por ejemplo: Vav, Shc, Ras, Raf, y MAP cinasa (MAPK)), son fosforilados en tirosina en respuesta a IL-3/GM-CSF y la fosforilación se correlaciona con la activación de estas proteínas, lo cual permite la inducción de genes relacionados con el crecimiento c-fos, c-jun, c-myc y egr-1 (Mui y Miyajima, 1994; Wong y Sakamoto, 1995; Hara y Miyajima, 1996). Actualmente se están delineando otras vías de transducción de señal independientes que son estimuladas por el GM-CSF (Gomez-Cambronero y Veatch C, 1996).

5.- Actividades Biológicas del GM-CSF

La purificación, clonación molecular y producción de grandes cantidades de factores de crecimiento hematopoyéticos recombinantes, ha permitido el estudio de estos factores *in vitro* e *in vivo*. Actualmente se cuenta con una cantidad considerable de información que hace posible especular sobre los papeles fisiológicos y patológicos de estos factores, que aún deben ser clarificados (Gasson, 1991).

El GM-CSF actúa como un potente factor de crecimiento tanto *in vitro* como *in vivo*, estimulando la proliferación y diferenciación de precursores mieloides, que dan origen a granulocitos neutrófilos, eosinófilos y monocitos (Tomonaga, et al 1986; Nienhuis, et al 1987; Sonada, et al 1988). Actualmente, se acepta que la célula blanco principal del GM-CSF es un precursor bipotencial GM-CFC, (granulocyte-macrophage colony-forming cell), la cual da origen a células macrofágicas y granulocíticas (Metcalf, 1984; Ruff y Coleman, 1990).

El GM-CSF es esencial para el crecimiento de células progenitoras de médula ósea del linaje granulocito-macrófago. Cuando las células precursoras hematopoyéticas o líneas celulares dependientes de GM-CSF son cultivadas *in vitro* sin una fuente de GM-CSF, las células pierden viabilidad con un tiempo de vida media que varía de 6 a 24 hrs (Metcalf y Merchav, 1982). La concentración de GM-CSF necesaria para mantener la viabilidad

celular es significativamente menor a la requerida para estimular la proliferación celular (Burgess, et al 1982).

La exposición de precursores de granulocitos y macrófagos al GM-CSF origina que rápidamente entren las células al ciclo celular (Ogawa, 1993), y tanto la proporción como la extensión de la división celular dependen de la concentración de este factor.

El GM-CSF estimula a células de médula ósea de ratón a formar colonias de macrófagos a una concentración media máxima de 2.7 pM (picomolar), colonias de granulocitos 8 pM, colonias de granulocitos y macrófagos 23 pM y colonias de megacariocitos 270 pM (Metcalf, et al 1986; Robinson, et al 1987). En cultivos con médula ósea humana el GM-CSF muestra un comportamiento similar (Gough, 1990).

Además de estos efectos aparentemente directos sobre la proliferación y diferenciación de células precursoras, el GM-CSF también muestra efectos aditivos y sinérgicos con otros factores de crecimiento hematopoyéticos que permiten una completa diferenciación a células maduras. Se ha demostrado que el GM-CSF puede iniciar la proliferación o al menos la sobrevivencia de las células precursoras eritroides tempranas BFU (Burst Forming-Unit), las cuales luego requieren eritropoyetina para su completa diferenciación (Donahue, et al 1985; Migliaccio, et al 1987). Asimismo, el GM-CSF interactúa sinérgicamente con varios factores, entre los que se encuentran: SCF (Metcalf, 1993; Ogawa, 1993) IL-3 (Oster, 1990; Oster, et al 1995), IL-6 (Caracciolo, et al 1989), M-CSF (McNiece, et al 1988), y G-CSF (Ferrero, et al 1989).

Por otra parte, existen reportes de que el GM-CSF puede estimular la proliferación o función de líneas de linfocitos T y plasmocitomas; aunque en linfocitos T normales no se han detectado receptores para GM-CSF o respuestas biológicas a este factor (Gough y Nicola, 1990).

Los primeros estudios demostraron que el GM-CSF de ratón purificado y el GM-CSF humano parcialmente purificado no sólo actuaban para estimular la proliferación de precursores inmaduros, sino que también mejoraban la actividad funcional de células efectoras maduras (Lopez, et al 1983; Fleischmann, et al 1986).

Actualmente se conoce una larga lista de actividades biológicas del GM-CSF sobre neutrófilos maduros, monocitos y eosinófilos (Freund y Kleine, 1992) (Tabla 3).

ESTIMULACION DE LA PROLIFERACION

Progenitores hematopoyéticos
Líneas celulares leucémicas y células LMA
Unidad formadora del estallido eritroide
Monocitos/macrófagos
Linfocitos?
Células endoteliales

INCREMENTO DE LA FUNCION

NEUTROFILOS

Supervivencia y síntesis de proteínas
Inhibición de la migración
Metabolismo oxidativo
Degranulación
Secreción de citocinas
Fagocitosis mediada por IgA
Captura y destrucción de parásitos y bacterias
Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
Cambios en receptores de superficie celular
Producción de ácido araquidónico, liberación de leucotrienos y síntesis del factor activador de plaquetas

EOSINOFILOS

Supervivencia
Citotoxicidad
Síntesis de leucotrienos

BASOFILOS

Liberación de histamina

MACROFAGOS

Expresión de citocinas
Muerte de parásitos
Expresión de receptores antigénicos de superficie
Muerte de células tumorales
Adherencia
Metabolismo oxidativo

CELULAS DE LANGERHANS

Maduración, viabilidad y función

LINFOCITOS?

Tabla 3. Actividad biológica del GM-CSF. Tomado de Freud, M., y Kleine, D., 1992.

Algunos de los efectos del GM-CSF sobre la función de neutrófilos son directos, por ejemplo: inhibición de la migración de neutrófilos, degranulación, cambios en la expresión de los receptores, expresión génica y efectos sobre el citoesqueleto y la forma de la célula (Gasson, et al 1984; Richter, et al 1989; Smith, et al 1990). El GM-CSF también afecta a los granulocitos en forma indirecta, como por ejemplo: incremento en la generación de superóxidos, mejoramiento de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, inhibición de la quimiotaxis, mejoramiento del estallido respiratorio, flujo de Ca^{++} y síntesis de leucotrieno B4 (LTB4) (Gasson, et al 1984; Weisbart, et al 1985; English, et al 1988; McColl, et al 1990; Rapoport, et al 1992).

Los monocitos y macrófagos pueden ser estimulados por el GM-CSF para producir varios factores. Dentro de éstos se encuentran la prostaglandina E, activador del plasminógeno, interferones, IL-1 (Metcalf, 1984), TNF (Cannistra, et al 1987) y M-CSF (Horiguchi, et al 1987). Al igual que en neutrófilos, el GM-CSF también estimula la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo en macrófagos (Grabstein, et al 1986) y la muerte intracelular de parásitos (Denis y Ghadirian, 1990; Bermudez y Young, 1990).

El GM-CSF prolonga el tiempo de vida de los eosinófilos por 9 hrs (Lopez, et al 1986), estimula la liberación de leucotrienos inducida por ionóforos de calcio (Silberstein, et al 1986), incrementa la producción de aniones superóxidos (Vadas, et al 1983a), mejora la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (Vadas, et al 1983b), mejora la expresión de receptores de alta afinidad para IL-5 (Chihara, et al 1990) y aumenta la adherencia a *Schistosoma mansoni* así como su muerte dependiente de anticuerpo (Silberstein, et al 1986).

EL GM-CSF e IL-3 sinergizan con IL-2 para inducir una respuesta proliferativa en linfocitos T humanos con y sin activación mitogénica. También potencia el crecimiento a largo plazo de linfocitos T no activados en presencia de IL-2 (Santoli, et al 1988).

Por los datos anteriores, podemos ver que el GM-CSF juega un papel inmunoregulatorio importante en infecciones parasitarias y bacterianas y en la generación de una respuesta inflamatoria local.

6.- Uso Clínico del GM-CSF

La clonación de los genes para el GM-CSF ha permitido que sea producido en cantidades que pueden ser utilizadas para ensayos clínicos y aplicaciones terapéuticas (Tabla 4). Una primer prueba en primates mostró que la infusión de GM-CSF recombinante humano puede inducir una dramática leucocitosis y una substancial reticulocitosis (Donahue, et al 1986). Posteriormente, en pacientes con leucopenia secundaria por infección debida a HIV (Human Immunodeficiency Virus) se demostró que al usar GM-CSF existe un incremento significativo de granulocitos y monocitos en circulación (Groopman, et al 1987), aunque posteriormente, en estudios *in vitro* demostraron que el GM-CSF estimula la replicación del HIV en monocitos, pero que el efecto antiviral del zidovudine se mejora con el GM-CSF (Hammer, et al 1990). Recientemente se observó que el GM-CSF acelera la recuperación mieloide después de altas dosis de agentes quimioterapicos y trasplante de médula autóloga (Nemunaitis, et al 1991). El GM-CSF también ha incrementado los niveles de granulocitos en pacientes con síndrome mielodisplásico y transitoriamente en pacientes con anemia aplásica (Antin, et al 1988; Scarffe, 1991; Lieschke y Burgess, 1992; Hill, et al 1995). Por otra parte, el GM-CSF también ha sido utilizado para acelerar la recuperación de pacientes con agranulocitosis inducidas por drogas (Nand, et al 1991).

Se ha publicado que el GM-CSF incrementa la movilización de células progenitoras formadoras de colonias hematopoyéticas al torrente sanguíneo (Socinski, et al 1988; Hass, et al 1990). Lo anterior permite que en pacientes con cáncer, se pueda aplicar un tratamiento antitumoral más agresivo, ya que, después del tratamiento, al reinfundir estas células, facilita que se acelere la recuperación de granulocitos y plaquetas (Büchner, 1994).

Aparte de promover la mielopoyesis en enfermedades o mielosupresión inducidas por quimioterapia, el GM-CSF también puede tener un papel clínico importante al mejorar la función de neutrófilos en ciertas situaciones donde éstos se encuentran defectuosos. Varias evidencias apoyan lo anterior, en una serie de pacientes con leucopenia e infección por HIV, se resolvió favorablemente dos defectos selectivos y específicos en la fagocitosis de *Staphylococcus aureus* y la muerte intracelular durante la administración de GM-CSF (Baldwin, et al 1988). Igualmente, en una serie de pacientes pediátricos con

Tratamiento mieloablativo con trasplante de médula ósea.

Neutropenia congénita.

Neutropenia cíclica.

Anemia aplástica.

SIDA.

Síndrome mielodisplásico.

Leucemia mieloide aguda.

Tabla 4. Padecimientos de tipo hematológico en donde se ha utilizado el GM-CSF.

infección por HIV, los neutrófilos de 16 de 21 pacientes demostraron que sus neutrófilos eran deficientes para matar bacterias. Cuando se incubó *in vitro* estos neutrófilos con GM-CSF, mejoraron su función bactericida (Roilides, et al 1990). Por otra parte, cuando a nueve pacientes con síndrome mielodisplásico se les administró *in vivo* GM-CSF a largo plazo, se demostró que se incrementa el contenido de mieloperoxidasa en granulocitos, mejorando marcadamente la fagocitosis y muerte de *Staphylococcus aureus* (Verhoff y Boogaerts, 1991). Por último, después del trasplante de médula ósea alogénica, se ha observado que existen granulocitos con función defectuosa incluyendo la generación de superóxidos y este defecto puede ser corregido durante el tratamiento con GM-CSF (Zimmerli, et al 1989).

7.- Papel Fisiológico del GM-CSF

Recientemente se han realizado estudios para definir el papel fisiológico usual del GM-CSF y de esta manera evaluar mucho mejor la eficiencia del GM-CSF en aplicaciones clínicas. El estudio del papel fisiológico *in vivo* del GM-CSF ha sido posible gracias al análisis de ratones deficientes de GM-CSF que algunos grupos han generado (Stanley, et al; Dranoff, et al 1994). Sorpresivamente, estos ratones no mostraron alteraciones obvias en la hematopoyesis basal: tuvieron cuentas normales de leucocitos de sangre periférica, así como de células progenitoras de médula ósea (Stanley, et al 1994). Sin embargo, los ratones mostraron una profunda disfunción en los macrófagos alveolares, generando la acumulación de material surfactante y proteináceo y una vulnerabilidad a infecciones pulmonares, lo cual implica que el GM-CSF es esencial para la fisiología pulmonar normal y resistencia a las infecciones locales (Dranoff, et al 1994; Stanley, et al 1994). Asimismo, ratones deficientes de GM-CSF y M-CSF presentaron monocitos en circulación y macrófagos tisulares fagocíticamente activos, lo cual indica que otros factores diferentes a GM-CSF y M-CSF pueden apoyar la diferenciación del linaje macrófágico *in vivo*. Estos ratones mostraron además osteoporosis, desdentición y una patología pulmonar más severa que en los ratones deficientes únicamente en GM-CSF (Lieschke, et al 1994). Por otra parte, en un estudio más reciente se generaron ratones en los cuales les falta las funciones completas de IL-3/GM-CSF/IL-5 y se encontró que no son necesarias para la

hematopoyesis estable, ni para dos situaciones de emergencia evaluadas (resistencia a *L monocytogenes* y recuperación leucocítica a un tratamiento con 5-Fluorouracilo). En consecuencia, las fases tempranas de la hematopoyesis y una respuesta hematopoyética rápida a situaciones de emergencia, deben ser dependientes de otros mecanismos (Nishinakamura, et al 1996).

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

Desde que Leo Sachs describió en Israel una técnica de cultivo *in vitro* de células mieloides provenientes de bazo para formar colonias en medio semisólido (Pluznik y Sachs, 1965), y posteriormente el grupo de Donald Metcalf en Australia publicó un método de cultivo de células de médula ósea (Bradley y Metcalf, 1966), se han venido dado grandes avances en el conocimiento de los fenómenos que caracterizan a la hematopoyesis.

En la actualidad se acepta la existencia de una célula tallo pluripotencial hematopoyética, la cual se diferencia para generar células precursoras para los linajes mieloides y linfoides (Dexter et al 1990b; Gordon y Amos, 1994). El resultado final de la hematopoyesis es la generación de células sanguíneas maduras funcionales. En este contexto, se piensa que la mayoría de los linajes hematopoyéticos provienen de diferentes células comprometidas, excepto los granulocitos y macrófagos que se supone derivan de un precursor común denominado unidad formadora de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CFU), que a su vez responde a un factor proliferador llamado factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) (Metcalf y Burgess, 1982; Metcalf, et al 1986; Gasson, 1991).

Históricamente, la primera evidencia de la existencia de un precursor común para macrófagos y granulocitos fue la presencia de colonias mixtas en respuesta a medios condicionados (Pluznik y Sachs, 1965; Bradley y Metcalf, 1966). Posteriormente, se identificó al GM-CSF como la molécula responsable de esta respuesta. Desde entonces, la existencia de esta célula precursora bipotencial, ha permanecido indeseable a través de todos estos años. Durante este tiempo, se han realizado trabajos utilizando técnicas de micromanipulación para estudiar el comprometimiento de células progenitoras aisladas principalmente de bazo y cordón umbilical tanto de ratón (Suda, et al 1983; Suda, et al 1984; Suda, et al 1984) como de células humanas (Leary, et al 1985; Leary, et al 1985), en los cuales se ha demostrado la formación de granulocitos y macrófagos a partir de una célula. No obstante, en estos trabajos no se utilizó únicamente GM-CSF, sino que se agregaron ya sea medios condicionados o una mezcla de factores de crecimiento, por lo que el problema de dilucidar si en médula ósea existen células que respondan al GM-CSF para

formar colonias de granulocitos y macrófagos aún debe ser estudiado. Por consiguiente, desde nuestro punto de vista, aún no es clara la participación del GM-CSF en la generación de colonias de granulocitos y macrófagos.

En nuestro Laboratorio al cultivar células de médula ósea de ratón en presencia de GM-CSF se han observado algunas colonias mixtas. Sin embargo, un análisis minucioso evidencia que tales colonias presentan pequeñas diferencias entre el centro de la colonia de granulocitos y la de macrófagos, además de encontrarse en el agar en planos ligeramente diferentes. Estas observaciones parecen indicar que las colonias mixtas pudieran provenir de la proliferación de dos células blanco independientes.

Algunos investigadores han sugerido que la regulación del linaje macrófágico puede ser independiente del linaje granulocítico, y que por tanto pueden estar involucrados precursores monopotenciales y no bipotenciales como es el GM-CFU (Jordan y Lemischka, 1990). En un trabajo, al cultivar células progenitoras primitivas ($Lin^- Sca^+$) en presencia de GM-CSF obtuvieron una proliferación por arriba del 90% de macrófagos (Jacobsen, et al 1994). Por otro lado, en un trabajo en el cual una línea leucémica mielomonocítica de ratón es transfectada con las cadenas del receptor para GM-CSF humano, las células se diferenciaron en presencia de GM-CSF hacia el linaje macrófágico (Smith, et al 1997).

Por otra parte, en nuestro laboratorio se ha demostrado que una línea leucémica de tipo macrófágica WR19M.1, y macrófagos normales producen y secretan G-CSF (Zambrano, et al 1989a, 1989b; Mendoza, et al 1990), así como quimioatrayentes para granulocitos (Takahashi, et al 1993). Con base en estos antecedentes, y tomando en cuenta las anteriores evidencias, es posible suponer que las colonias de granulocitos puedan ser generadas por el G-CSF secretado por los macrófagos y no por el efecto directo del GM-CSF. El presente trabajo se realizó con la finalidad de determinar si el GM-CSF tiene como célula blanco al precursor de macrófagos, que al proliferar secreta un factor con actividad de G-CSF, el cual sea el responsable de la formación de colonias granulocíticas.

De llevar a dilucidar lo anterior, estaríamos planteando un nuevo esquema hematológico, en particular en lo referente al origen y mecanismo de proliferación y diferenciación de macrófagos y granulocitos-neutrófilos. Asimismo, estos resultados

tendrían suma importancia para apoyar la selección de factores hematopoyéticos en ciertos padecimientos hematológicos y oncológicos, que en la actualidad son utilizados para la *regeneración de médula ósea*.

MATERIAL Y METODOS

Material Biológico

Se utilizaron ratones de ambos sexos de 6 a 8 semanas de edad de la cepa CD-1 del Bioterio de la FES-Zaragoza, como donadores de células de médula ósea.

Cultivo Celular

Todas las células fueron cultivadas bajo una atmósfera de 5% de CO₂ a 37 °C y con 100% de humedad (Nakahata y Ogawa, 1982; Suda, et al 1984), en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (MEMD, (Sigma Chemical Co. USA) suplementado con 20% de suero de caballo (SC, Sigma Chemical Co. USA) previamente desactivado a 56 °C por 30 min (Ichikawa, et al 1966). También se agregó al MEMD estreptomycin (100 µg/ml), penicilina G (100 U/ml) y bicarbonato de sodio (3.7 mg/ml). Se cultivaron 3×10^5 células mononucleadas de médula ósea en cajas de Petri de 35 x 10 mm (Costar, Cambridge, MA., USA) o 1×10^5 en placas de cultivo de 24 pozos de 16 mm de diámetro (Costar, Cambridge, MA., USA) respectivamente.

Obtención de Células de Médula Osea

Para obtener células de médula ósea, se sacrificaron los ratones por descervicación y se extrajeron los fémurs. A éstos se les hizo fluir 1 ml de MEMD de un extremo a otro para eluir todas las células, las cuales se lavaron dos veces con MEMD por centrifugación a 500 g por 5 min. Posteriormente, fueron resuspendidas en MEMD y la solución fue agregada cuidadosamente sobre 1 ml de Ficoll Hystopaque (1.077 g/ml) (Sigma, USA), centrifugándose a 500 g durante 20 min. Las células retenidas en la interfase MEMD-Ficoll (células mononucleadas) fueron colectadas, lavadas y el número celular fue determinado en un hemocitómetro (American Optical, USA).

Cultivo de líneas Celulares

La línea celular leucémica de tipo monocito-macrófago P388 fue utilizada como control positivo de la producción de IL-6 (Nordan et al., 1987) al ser estimulada con IL-1 y la línea celular de carcinoma de vejiga humana HTB9 fue utilizada como control positivo de la producción de G-CSF (Quentmeier et al., 1997). Ambas fueron sembradas cada cuatro días con MEMD y 10% de Suero fetal de Bovino (SFB) (Hyclone Labs, Logan, Utah, USA).

Inducción a la Formación de Colonias

Para evaluar la estimulación a la formación de colonias de los CSFs, se empleó la técnica de doble capa de agar (Pluznick y Sachs, 1966). Brevemente; una primera capa conteniendo MEMD suplementado con 20% de SC y agar al 3.0 % (Bactoagar, DIFCO, USA.) fue agregada en presencia o ausencia de CSF. Después que gelificó esta capa (aproximadamente 15 min), una segunda capa fue sobrepuesta formada por MEMD con las células, suplementado con 10% de SC y agar al 1.8% . Luego de 7 días de incubación y con la ayuda de un microscopio invertido (American Optical, USA) todos los grupos con más de 20 células fueron contadas como colonias; mientras que los agregados con menos de 20 células se consideraron como grupos.

Reclonación de Grupos de Células de Médula Osea

Para aislar los grupos de precursores de los efectos de otras citocinas secretados por los demás grupos de células, se diseñó el siguiente procedimiento (Figura 9). Una vez que el cultivo en agar fue preparado, se inspeccionó para verificar que no existieran grupos de células preformados desde el inicio del cultivo. Después de 48 horas de incubación, los cultivos fueron revisados usando un microscopio invertido (American Optical), y los grupos de células (aproximadamente 4 células) que se observaban en buen estado, fueron extraídos bajo condiciones de esterilidad, usando una pipeta Pasteur con una punta de diámetro interno de aproximadamente 100 μm . El grupo de células se transfirió a un nuevo sustrato de cultivo (medio de cultivo con agar y el CSF a ser

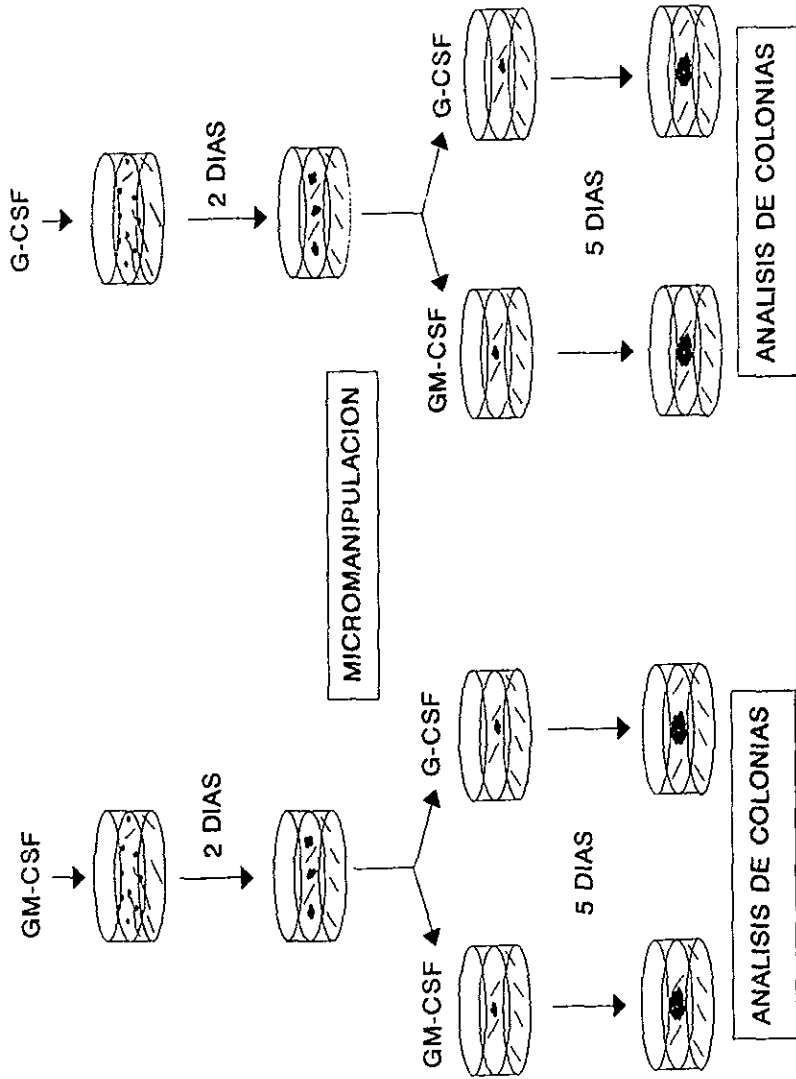


Figura 9. Clonación de grupos de células de dos días con GM-CSF y G-CSF.

evaluado), y después de 5 días de incubación, fue evaluado el número de colonias y tipo celular obtenido.

Obtención de Lisado de Colonias de Macrófagos

Para evaluar si las colonias de macrófagos contienen actividad de G-CSF, fue necesario obtener lisado de colonias de macrófagos. Para lo cual, a partir de cultivos de células de médula ósea en agar con GM-CSF o M-CSF después de 7 días de incubación, se extrajeron las colonias de morfología macrofágica usando una pipeta Pasteur con punta delgada. Posteriormente, se lavaron con MEMD y lisaron con inmersión en nitrógeno líquido durante 1 min por dos ciclos. Este lisado se recuperó en 1 ml de MEMD, para posteriormente evaluar su actividad estimuladora de colonias por el método de bicapa de agar.

Análisis Morfológico e Histoquímico de las Células

Para evaluar el tipo celular de las colonias obtenidas en agar, se utilizó una modificación a la técnica de transferencia de colonias sobre un portaobjetos de Moezzi J (Moezzil, et al 1986). Brevemente; con una navaja se separó de las paredes de la caja de cultivo la capa superior de agar que contienen las colonias y con papel filtro Whatman del No.2 (Whatman Incorporated, Clifton, NJ) se cubrió esta capa. Cuando se humedeció el papel completamente, de inmediato se retiró con mucho cuidado, y el agar adherido se transfirió colocando el papel filtro sobre un portaobjetos, dejándolo secar a temperatura ambiente. Después, se retiró el papel filtro y las colonias sobre el portaobjetos fueron fijadas y teñidas.

Para evaluar el tipo celular de las colonias, se utilizaron técnicas citoquímicas de tinción específica, las cuales identifican esterasas; en este caso del linaje monocito-macrófago y granulocito neutrófilo. Las técnicas se denominan: tinción alfa-naftil acetato esterasa para monocito-macrófago en el que se utiliza alfa-naftil acetato como sustrato enzimático (Apéndice A) (Sigma Chemical Co, USA) (Sun, et al 1985; Li, et al 1973; Marill, 1990) y tinción cloroacetato esterasa para granulocito neutrófilo cuyo sustrato es naftol AS-D cloroacetato (Apéndice B) (Sigma Chemical Co, USA)(Sun,

et al 1985; Li, et al 1972; Marill, 1990). La identificación positiva de la tinción para alfa-naftil acetato esterasa en monocitos-macrófagos fue observada como un precipitado difuso color marrón en el citoplasma y en la tinción para cloroacetato esterasa en neutrófilos se observó como gránulos rojos brillantes en el citoplasma. En cada tinción se usó también hematoxilina de Meyer, la cual contratiñó los núcleos de cada tipo celular (granulocitos y monocitos).

Por otro lado, también se empleó hemocolorante rápido (Sigma, USA), para una identificación morfológica de los tipos celulares de las colonias. Aquellas colonias consistentes de células con núcleos en banda fueron consideradas de tipo granulocítico, mientras que, cuando las células eran de mayor tamaño, citoplasma vacuolado y mononucleadas fueron consideradas de morfología macrofágica. Finalmente, las colonias con células indiferenciadas fueron registradas como blásticas (Beck, 1985).

Detección de la Presencia de Citocinas por Ensayo de ELISA

Para identificar la presencia de G-CSF en los lisados de macrófagos, se utilizó la técnica de ELISA (Apéndice C), en la que se usó un anticuerpo anti-G-CSF policlonal producido en conejo contra la molécula humana G-CSF (Genzyme, USA), a una dilución de 1:250, 1:500 y 1:1000. Considerando la alta homología de las proteínas G-CSF de ratón y humano y que no hay especificidad entre estas especies (Nagata, 1989), se empleó en este ensayo el anticuerpo dirigido contra el G-CSF humano.

Asimismo, también se utilizó anti-IL-6 monoclonal producido en rata contra la molécula de IL-6 de ratón (Genzyme, USA) a las diluciones de 1:250, 1:500 y 1:1000, para identificar la presencia de esta proteína en los lisados de macrófagos.

Detección de G-CSF e IL-6 por Citometría de Flujo

Para identificar la presencia de G-CSF e IL-6 intracelularmente; 1×10^6 células P388, HTB9 y macrófagos (provenientes de un cultivo con GM-CSF) respectivamente, se lavaron dos veces con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Posteriormente, se incubaron con suero humano (para bloquear inespecificidad) a 4°C durante 30 min y después de este tiempo, se lavaron las células dos veces con PBS.

Luego las células se incubaron con anticuerpos primarios anti G-CSF (cabra anti-ratón, R&D Systems, USA) y anti IL-6 (cabra anti-ratón, R&D Systems, USA) a 1µg/ml cada uno, a 4°C en presencia de PBS más 0.3% de saponina durante 30 min. Se lavaron tres veces por centrifugación con una solución de saponina al 0.1 % en PBS. Posteriormente se incubaron las células con el anticuerpo secundario (conejo anti-cabra conjugado con FITC, DAKO, Via Real, CA. USA. dilución 1:100), a 4°C en PBS más 0.3% de saponina durante 30 min. Después, se lavaron por centrifugación tres veces con un solución de saponina al 0.1% en PBS. Finalmente, se leyeron en un citómetro de flujo (Becton Dickinson & Co Mountain View, C.A. USA). Se analizaron 10⁴ eventos para determinar la intensidad de fluorescencia. La tinción con anticuerpos irrelevantes del mismo isotipo (IgG) fueron considerados como un control negativo.

Ensayo de Neutralización de la Bioactividad de G-CSF y de IL-6 en Cultivos con GM-CSF

Para determinar si el G-CSF e IL-6 producidas por el macrófago estimulado con GM-CSF son responsables de la formación de las colonias de granulocitos, se empleó la técnica de bicapa de agar descrita anteriormente. Los anticuerpos contra G-CSF e IL-6 (ambos, cabra anti-ratón, R&D Systems, USA), se agregaron en la segunda capa a una concentración de 48 µg/ml y 40 µg/ml respectivamente. Después de siete días de incubación, se evaluaron las colonias formadas, así como el tipo morfológico obtenido.

Varios

Cada experimento se realizó por triplicado y fue repetido tres veces de manera independiente. Como control negativo, un cultivo sin inductor siempre fue añadido y como controles positivos en todos los ensayos fueron utilizados los factores rmGM-CSF, rhG-CSF y rhM-CSF.

Los Factores Estimuladores de Colonias de Macrófagos y Granulocitos recombinante de ratón (rmGM-CSF; actividad específica 1×10^6 U/mg, fue usado a 20 ng/ml) y el Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos recombinante humano (rhG-CSF; actividad específica 1×10^7 U/mg, fue usado a 400 ng/ml) que se utilizaron

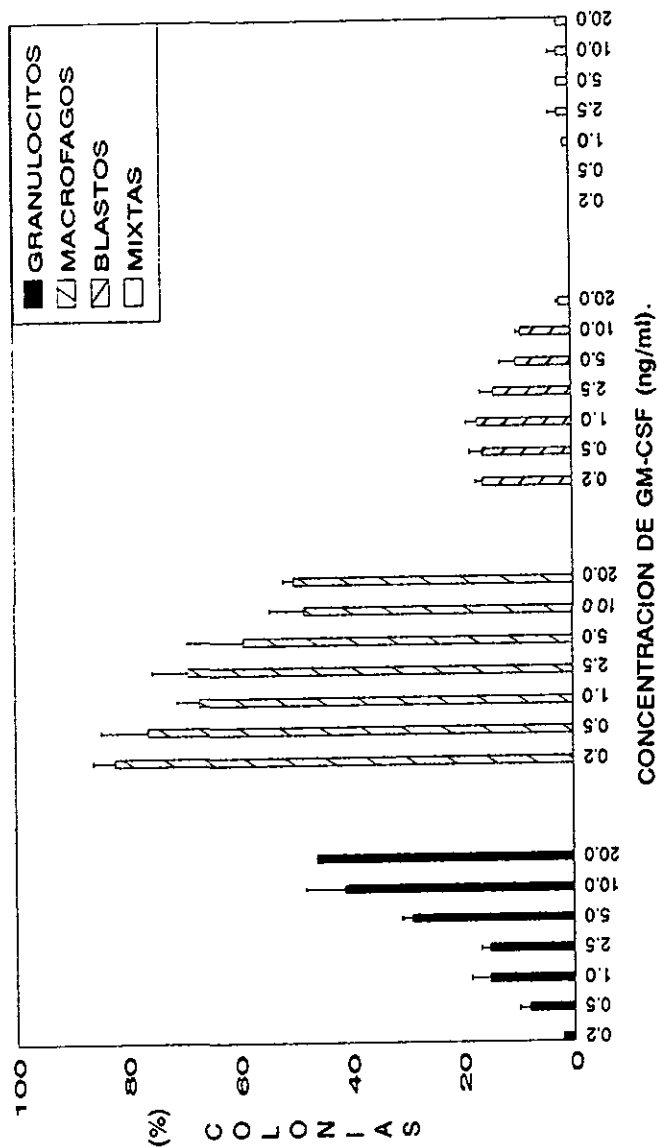
en este trabajo, fueron donados por el Dr. Gillis de Immunex, USA. El Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos recombinante de ratón (rmG-CSF, dosis de eficiencia media 0.01-0.03 ng/ml para la línea NFS-60, fue utilizado a una concentración de 20 ng/ml), la Interleucina 6 recombinante de ratón (rmIL-6, dosis de eficiencia media 0.02-0.06 ng/ml para la línea celular T1 165.85.2.1, fue utilizado a una concentración de 25 ng/ml), el anti-G-CSF contra la molécula de ratón (1mg/ml) y anti-IL-6 contra la molécula de ratón (1 mg/ml) fueron adquiridos a la compañía R&D Systems, Mpls, MN, USA. El Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos recombinante humano (rhM-CSF; actividad específica 2×10^5 U/mg, fue utilizado a 10 ng/ml), y el anti-G-CSF contra la molécula humana (1 mg/ml) fueron comprados a Genzyme Co. Boston MA. USA. El anticuerpo secundario conejo anti-cabra conjugado con FITC, fue comprado a DAKO, Via Real, CA. USA.

RESULTADOS.

El factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), a diferentes concentraciones, induce únicamente la proliferación de precursores monopotenciales.

Se ha reportado en la literatura que el GM-CSF tiene como célula blanco a un precursor bipotencial el cual genera colonias mixtas de macrófagos y granulocitos, así como colonias independientes de estos dos tipos celulares (Metcalf y Burgess, 1982; Metcalf, et al 1986). Dado que en nuestras condiciones se han observado algunas colonias con apariencia de colonias mixtas, se pretendió determinar si variando la concentración de GM-CSF se induce la proliferación de precursores bipotenciales responsable de la aparición de las colonias mixtas. Por tal motivo se sembraron células de médula ósea de ratón por medio de la técnica de bicapa de agar en presencia de GM-CSF recombinante de ratón (rnGM-CSF) a diferentes concentraciones (0.2, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10, y 20 ng/ml). Después de 7 días de cultivo, se evaluó el número de colonias generadas y su morfología, con ayuda de tinciones citoquímicas.

Los resultados mostraron que a partir de 1 ng/ml de GM-CSF se observaron la formación de supuestas colonias mixtas (macrófagos-granulocitos), (Gráfica 1), que al revisarlas cuidadosamente da la impresión de dos colonias independientes, únicamente que se encontraban sobrepuestas. Cuando se empleó la menor concentración del factor, 0.2 ng/ml, se formó un alto porcentaje de colonias de macrófagos (82%) y un bajo porcentaje de colonias de granulocitos (2%), además no hubo colonias mixtas. Cuando se utilizaron concentraciones de 20 ng/ml se obtuvieron porcentajes similares de colonias de macrófagos y granulocitos, 50 y 46 % respectivamente. A una concentración de 1 ng/ml se obtuvo una colonia mixta y a partir de 2.5 a 20 ng/ml se obtuvo 2% de colonias mixtas respectivamente. En todas las concentraciones se obtuvieron también colonias blásticas desde 2 hasta 17%. Estos resultados sugieren que la formación de colonias de granulocitos y macrófagos es dosis dependiente, además las escasas colonias mixtas obtenidas en estos ensayos fue debida a la sobreposición de dos colonias (macrófagos y granulocitos). Por lo



Gráfica 1. Formación de colonias a diferentes concentraciones de GM-CSF. A concentraciones de 0.2-2.5 ng/ml el porcentaje de colonias de macrófagos fue alto y el de granulocitos bajo; mientras que a concentraciones de 10-20 ng/ml el porcentaje de colonias de granulocitos y macrófagos fue similar. A partir de 1 a 20 ng/ml se observaron algunas colonias con apariencia de mixtas. Se muestran los datos y la desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado.

que el GM-CSF parece tener como blanco ya sea a los precursores de macrófagos o los precursores de granulocitos, es decir células monopotenciales.

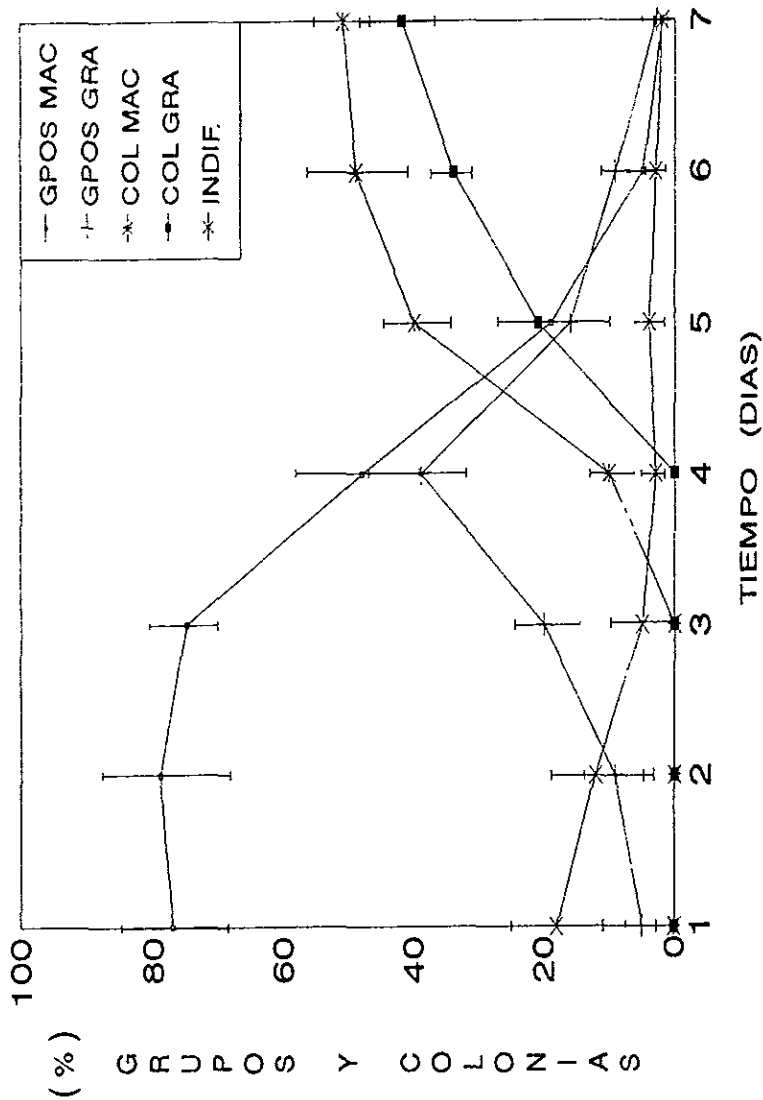
Evidencia de que los precursores macrofágicos de médula ósea responden al GM-CSF antes que los precursores de granulocitos.

Tomando en cuenta que el GM-CSF generó únicamente colonias independientes de macrófagos y granulocitos, el siguiente paso fue estudiar cuál es el mecanismo de formación de colonias de ambos tipos celulares inducida por este factor. Con este propósito, se procedió a determinar si alguno de los precursores, ya sea de monocitos o granulocitos, responde primeramente al estímulo con GM-CSF. En principio, se planteó un ensayo en el cual se sembraron 10^5 células de médula ósea en agar en presencia del rmGM-CSF. A los tres días de incubación, bajo el microscopio se realizó un mapeo de los grupos formados. Después de siete días, tiempo total de incubación, se observó la morfología de las colonias formadas después del mapeo.

En este experimento, fue difícil discernir entre las colonias generadas antes y después del mapeo, ya que en el agar las células quedan suspendidas tridimensionalmente, lo cual da como consecuencia que las colonias se formen en diferentes planos y por tanto se traslapen. En un intento de evitar este problema, se redujo el número de células sembradas de 10^5 a 10^4 , sin embargo, el problema de translape no fue superado.

En vista de lo anterior, se decidió realizar una cinética de formación en días de grupos (<20 células) y colonias (>20 células) de granulocitos y macrófagos en respuesta al GM-CSF. Para lo cual, se sembraron 10^5 células de médula ósea en presencia de 20ng/ml de rmGM-CSF (ya que a ésta concentración se observó un porcentaje similar de colonias de macrófagos y granulocitos) en un sistema de bicapa de agar. Los cultivos del día 1 al 7 se evaluaron en la formación de grupos y colonias, así como el tipo de células que los integraban.

Encontramos que los grupos y colonias de monocito-macrófago aparecieron antes que los de granulocitos (Gráfica 2). Desde el primer día de cultivo se observó un alto porcentaje de grupos de monocitos-macrófagos con un 77%, mientras que el 5% de los



Gráfica 2. Cinética de formación de grupos y colonias de macrófagos en presencia de rmGM-CSF. En los primeros días de cultivo se formó un alto porcentaje de grupos de monocitos-macrófagos y bajo porcentaje de granulocitos. Las colonias de macrófagos se formaron antes que las colonias de granulocitos. Se muestran los datos y las desviaciones estándar de un experimento representativo realizado por triplicado.

grupos fueron de morfología granulocítica. Conforme aumentó el tiempo de cultivo, los grupos de ambos tipos celulares llegaron a ser casi similares al quinto día con 19 y 16% de macrófagos y granulocitos respectivamente. Al día siete prácticamente no se observaron grupos celulares sino únicamente colonias. Las primeras colonias de monocitos fueron observadas al cuarto día con un 10% y las de granulocitos hasta el día quinto con un 21%, alcanzándose al día siete un 51% de colonias de macrófagos y 42% de colonias de granulocitos. Por otro lado, no se observaron colonias mixtas (bajo nuestro criterio de análisis) en ninguno de los siete días de cultivo. Es importante mencionar que desde el primer día se observaron grupos de células indiferenciadas con un 18 %, el cual fue disminuyendo hasta un 2 % en el día 7 (Gráfica 2).

Evidencia de que los precursores de macrófagos son las únicas células blanco que responden al GM-CSF en cultivos de células de médula ósea.

Después que se estableció que los grupos y colonias de macrófagos aparecen antes que los granulocitos en cultivos de médula ósea inducidos por rmGM-CSF, se procedió a evaluar si los primeros grupos de células que se desarrollan en los primeros días consisten de precursores macrofágicos. Para este propósito, se realizaron ensayos de transferencia de clones a nuevos sustratos de cultivo. Inicialmente se sembraron dos cajas con células de médula ósea en presencia de rmGM-CSF. Después de dos días de cultivo, una caja fue dividida en dos partes y de una mitad se extrajeron los grupos que se encontraban proliferando, los cuales fueron transferidos a un nuevo sustrato conteniendo nuevamente GM-CSF sin células. Con la finalidad de descartar el daño de las células durante el proceso de clonación, siempre se tuvo como control a una caja de cultivo fuera de la incubadora por el mismo tiempo que la procesada (30 minutos). Con este experimento, se conseguiría que una mitad del cultivo mantuviera las condiciones originales; mientras que los grupos pertenecientes a la otra mitad, se aislaban del efecto potencial de otras citocinas secretadas por diferentes tipos celulares presentes en el cultivo original. Posteriormente, los cultivos se volvieron a incubar hasta un total de siete días y al final se analizaron las colonias formadas. En estos cultivos se esperaba encontrar que en la mitad de la caja de cultivo

original del cual se aislaron los grupos primarios no hubiera colonias de macrófagos, únicamente algunos grupos de granulocitos, a diferencia de la otra mitad intacta donde proliferarían normalmente ambos tipos celulares. Mientras que en la bicapa donde se transfirieron los grupos crecerían sólo colonias de macrófagos.

Los resultados derivados de estos ensayos mostraron que las condiciones de clonación no eran las óptimas, ya que al permanecer mucho tiempo fuera de la incubadora las células fueron no viables. Este problema se mostró aún cuando se redujo el tiempo de clonación a 20 minutos. Otro problema aunado al anterior, fue que debido a la reducción del tiempo de clonado, no fue posible extraer todos los grupos proliferantes que se encontraban en la mitad de la caja, puesto que los grupos remanentes proliferaban y finalmente se observaban ambos tipos celulares.

Por lo anterior, sólo se concretó a determinar cuál era el tiempo mínimo indispensable para obtener transferencia de grupos de células viables. El tiempo máximo en el cual las células permanecieron fuera de la incubadora fue de 10 minutos, tiempo en el cual se transfirieron en promedio 20 grupos de precursores al azar y en buenas condiciones.

Una vez que se establecieron las condiciones óptimas para realizar la técnica de clonación, se procedió a evaluar si los grupos transferidos a los dos días consistían únicamente de precursores de macrófagos. Para ello, después de dos días de cultivo de células de médula ósea con GM-CSF, se extrajeron algunos grupos formados y se transfirieron a cultivos frescos en presencia de rmGM-CSF (20ng/ml). Asimismo, también se transfirieron grupos a un cultivo en presencia de 400 ng/ml de factor estimulador de colonias de granulocitos recombinante humano (rhG-CSF), para descartar la posibilidad de que se estuviese transfiriendo grupos de granulocitos. Simultáneamente y bajo las mismas condiciones, también se cultivaron células de médula ósea con rhG-CSF y después de dos días de cultivo, algunos grupos formados se transfirieron a nuevos cultivos en presencia de rmGM-CSF y rhG-CSF por separado.

Los resultados demuestran que únicamente los precursores de macrófagos respondieron al GM-CSF (Tabla 5). Los grupos de precursores de dos días que provenían de un cultivo con rmGM-CSF desarrollaron 100% de colonias de monocitos-

PRIMER INDUCTOR	SEGUNDO INDUCTOR	NUMERO DE COLONIAS (PORCENTAJE)				
		GRANULOCITOS			MACROFAGOS	BLASTOS
		BANDA	MADUROS	TOTAL		
(-)		0(0)	0(0)	0(0)		0(0)
rmGM-CSF	*	41(25±2.4)	20(12±1.2)	61(37±1.2)	100(61±7.9)	3(2±0.7)
rhG-CSF	*	39(29±4.6)	72(53±2.2)	111(82±2.2)	8(6±1.5)	18(13±1.4)
rmGM-CSF	rmGM-CSF**	0(0)	0(0)	0(0)	28(100±3.5)	0(0)
rmGM-CSF	rhG-CSF**	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
rhG-CSF	rmGM-CSF**	0(0)	0(0)	0(0)	3(75)	1(25)
rhG-CSF	rhG-CSF**	10(66±6.6)	4(27±6.8)	14(93)	1(7)	0(0)

Tabla 5. Morfología celular de las colonias obtenidas por los grupos transferidos a un segundo inductor después de dos días de cultivo con rmGM-CSF. Los precursores de monocito-macrófago fueron los únicos que respondieron al GM-CSF. Se muestran los datos y desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado.

(-) Cultivo sin inductor.

* No se transfirieron grupos celulares.

** Se transfirieron grupos de células de dos días a nuevos cultivos con un segundo inductor.

rmGM-CSF, Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y Granulocitos recombinante de ratón.

rhG-CSF, Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos recombinante humano.

de un cultivo con rmGM-CSF desarrollaron 100% de colonias de monocitos-macrófagos en presencia de rmGM-CSF; cuando los grupos de dos días se transfirieron a un cultivo en presencia de rhG-CSF no se formaron colonias.

Por otra parte, en el ensayo a la par, los grupos que inicialmente se formaron en presencia de rhG-CSF y posteriormente transferidos a un segundo estímulo con rmGM-CSF, sólo tres grupos proliferaron y se diferenciaron a macrófagos; mientras que los grupos que se transfirieron a un cultivo con rhG-CSF la mayoría formaron colonias de granulocitos (Tabla 5).

Por otro lado, en los grupos transferidos a nuevos sustratos después de cuatro días de cultivo, se observó que en presencia de rmGM-CSF, el porcentaje de precursores de granulocitos y macrófagos fue semejante. (Tabla 6). Cuando se cultivó en presencia de rmGM-CSF se obtuvo un 50% de colonias de macrófagos y un 50% colonias de granulocitos, comportamiento muy similar al encontrado cuando el cultivo de médula ósea recién extraída se lleva normalmente a siete días con rmGM-CSF (51% colonias de macrófagos y 47% colonias de granulocitos). De igual forma, los grupos de cuatro días en presencia de rhG-CSF indujeron la formación principalmente de colonias de granulocitos con un 70%, semejante a lo que ocurre con médula ósea recién extraída en presencia de rhG-CSF (88%) (Tabla 6).

De esta manera se comprueba tanto con la cinética de formación de grupos y colonias, como en la transferencia de grupos a cuatro días, que el porcentaje de macrófagos y granulocitos a este tiempo son similares.

Los precursores de macrófagos de médula ósea forman células con la capacidad de producir una actividad semejante a G-CSF cuando son inducidas a proliferar en presencia de GM-CSF

Después de tener evidencias de que los precursores de macrófagos responden tempranamente al estímulo del rmGM-CSF, fue de interés determinar si los grupos y colonias de granulocitos que se formaban tardíamente en el cultivo en presencia de rmGM-

PRIMER INDUCTOR	SEGUNDO INDUCTOR	NUMERO DE COLONIAS (PORCENTAJE)				
		GRANULOCITOS			MACROFAGOS	BLASTOS
		BANDA	MADUROS	TOTAL		
(-)		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
rmGM-CSF	*	11(5±0.9)	94(42±2.2)	105(47±1.3)	114(51±3.5)	4(2±0.5)
rhG-CSF	*	19(20±3)	63(68±3.2)	82(88)	3(3±1)	8(9±2.2)
rmGM-CSF	rmGM-CSF**	0(0)	8(50)	8(50)	8(50)	0(0)
rmGM-CSF	rhG-CSF**	0(0)	16(70±8.8)	16(70±8.8)	7(30±8.6)	0(0)

Tabla 6. Morfología celular de las colonias obtenidas por los grupos transferidos a un segundo inductor después de cuatro días de cultivo con rmGM-CSF. En presencia de GM-CSF el porcentaje de precursores de granulocitos y macrófagos fue semejante. Se muestran los datos y desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado.

(-) Cultivo sin inductor.

* No se transfirieron grupos celulares.

** Se transfirieron grupos de células de 4 días a nuevos cultivos con un segundo inductor. rmGM-CSF, Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y Granulocitos recombinante de ratón.

rhG-CSF, Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos recombinante humano.

CSF, eran producto del efecto directo de rmGM-CSF o de otra molécula con actividad semejante a G-CSF, la cual fuera producida por las colonias de macrófagos de formación temprana. Con esta finalidad, se diseñaron ensayos tendientes a evaluar si los macrófagos derivados de un cultivo con rmGM-CSF producen un factor semejante a G-CSF, así como determinar si este factor tiene capacidad proliferativa hacia precursores granulocíticos. Para lo cual, se cultivaron células de médula ósea en presencia de rmGM-CSF, y al tercer día de cultivo se colectaron los grupos que se encontraban proliferando y se procedieron a lisar en nitrógeno líquido. El colectar los grupos a los tres días de incubación, nos daba la seguridad de que se estuvieran obteniendo precursores de macrófagos y además verificaríamos si tenían la capacidad de producir alguna molécula con actividad estimuladora de colonias. Sin embargo, el número de células que se colectaron a los tres días fue escaso, lo que fue necesario hacer varios cultivos con lo que se logró obtener aproximadamente 6×10^5 células por mililitro. Al ensayar la actividad de este lisado se pudo detectar que los precursores de macrófagos ya presentan actividad estimuladora de colonias a este tiempo (en un ensayo se logró observar 28 colonias de granulocitos). Sin embargo, considerando que a los tres días el número de células es pequeño, se optó por colectar colonias de macrófagos hasta los 7 días de cultivo ya que las colonias presentan su máximo desarrollo.

Una vez que se obtuvo el lisado de colonias de macrófagos después de siete días de cultivo, se encontró que 0.1 ml del lisado de éste (10^6 células/ml) (lisado de macrófagos I) produjeron una actividad estimuladora de colonias semejante a G-CSF (Tabla 7). En presencia del lisado de macrófagos I se produjo un 91% de colonias de granulocitos, comparable al obtenido con rhG-CSF (85%) (Tabla 7). Es interesante destacar, que en este experimento también se cultivo médula ósea en presencia de factor estimulador de colonias de macrófagos recombinante humano (rhM-CSF) y las colonias generadas de macrófagos fueron lisadas, con el objeto de evaluar también su actividad en la formación de colonias granulocíticas. Sorprendentemente encontramos que no hubo formación de colonias de ningún tipo con el lisado de colonias de macrófagos inducidas con rhM-CSF (lisado de macrófagos II) (Tabla 7).

Por otro lado, para descartar que el lisado de macrófagos I fuera un inhibidor de

INDUCTOR	NUMERO DE COLONIAS (PORCENTAJE)				
	GRANULOCITOS			MACROFAGOS	BLASTOS
	BANDA	MADUROS	TOTAL		
(-)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
rmGM-CSF	32(15 ± 2.3)	60(28 ± 3.3)	92(43 ± 0.9)	116(54 ± 4.2)	6(3 ± 1)
rhG-CSF	19(26 ± 2.7)	42(59 ± 4.2)	61(85 ± 1.4)	9(12 ± 2.7)	2(3)
LISADO DE MACROFAGOS (I)	10(23 ± 2.3)	29(68 ± 2.3)	39(91 ± 4.7)	4(13 ± 2.3)	1(2)
rmGM-CSF + LISADO DE MACROFAGOS (I)	40(22 ± 1.7)	45(24 ± 2.1)	85(46 ± 0.5)	94(51 ± 2.7)	6(3 ± 1)
LISADO DE MACROFAGOS (II)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

Tabla 7. El lisado de macrófagos inducidos por rmGM-CSF favorece la formación de colonias de granulocitos. Se observa que de manera semejante al rhG-CSF, el lisado de macrófagos estimulados a la proliferación con rmGM-CSF, induce la formación de colonias de granulocitos. Se muestran los datos y desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado.

(-), cultivo sin inductor de colonias.

rmGM-CSF, Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y Granulocitos recombinante de ratón.

rhG-CSF, Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos recombinante humano.

(I) Lisado de macrófagos inducidos con rmGM-CSF.

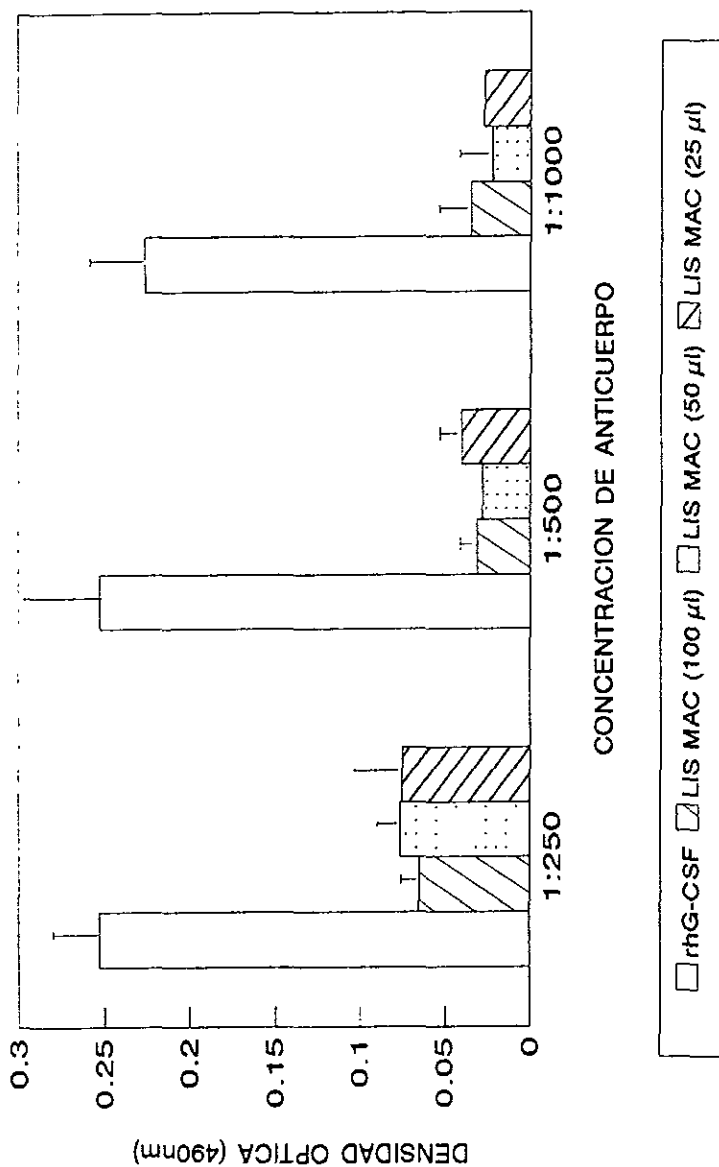
(II) Lisado de macrófagos inducidos con Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos recombinante humano, rhM-CSF.

proliferación de precursores de macrófagos, se cultivaron células de médula ósea en presencia de rmGM-CSF y del lisado de macrófagos I. Los resultados obtenidos muestran que el lisado de macrófagos I no es inhibidor de la proliferación de precursores de macrófagos, ya que junto con el rmGM-CSF indujeron una respuesta de 46% de colonias de granulocitos y 51% de colonias de macrófagos, resultado muy similar al cultivo donde sólo se adicionó rmGM-CSF (43% y 54% de granulocitos y macrófagos respectivamente) (Tabla 7).

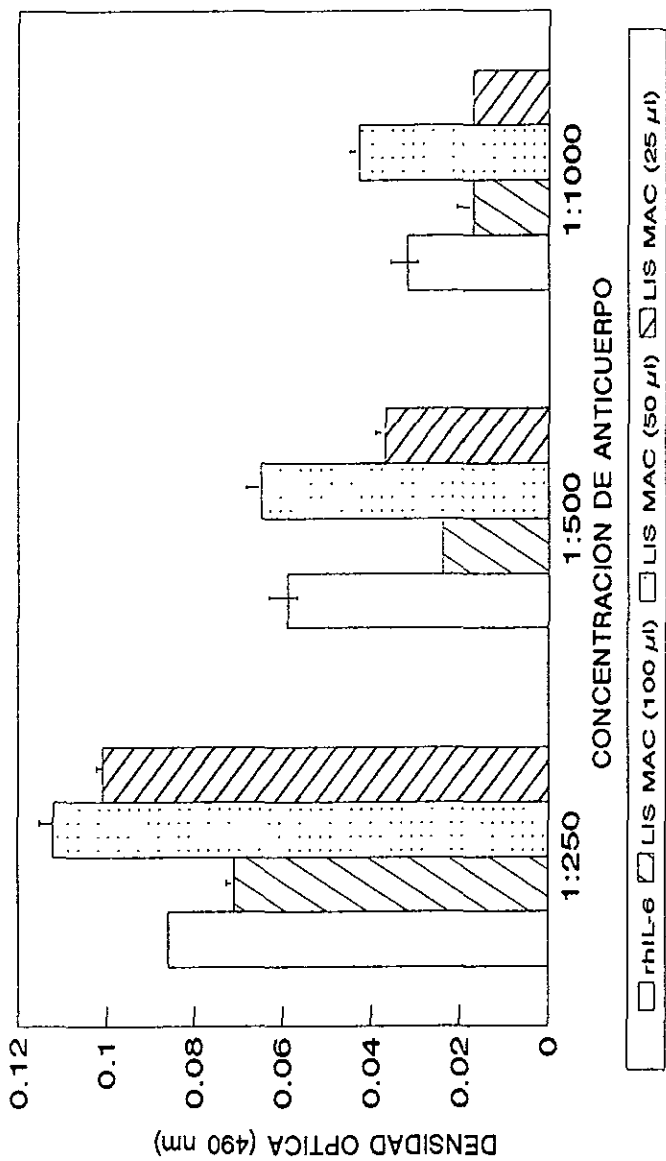
Los macrófagos obtenidos con GM-CSF producen G-CSF e IL-6.

Para dilucidar si la actividad semejante a G-CSF producida por los macrófagos estimulados por GM-CSF era debido al efecto de una sola molécula o más, se determinó por medio de ensayos de ELISA y citometría de flujo la presencia de G-CSF e Interleucina-6 (IL-6) (que se sabe también induce la proliferación y diferenciación de granulocitos, Metcalf, 1989). Para los ensayos de ELISA se utilizaron diferentes cantidades de lisado de colonias de macrófagos I (100, 50 y 25 μ l) y diferentes diluciones de anti-G-CSF y anti-IL-6 de ratón (1:250, 1:500 y 1:1000). Mediante ensayos previos habíamos comprobado que el anti-G-CSF humano cruzaba con el G-CSF de ratón, por lo que decidimos utilizarlo. Los resultados muestran que en el lisado de macrófagos I, se logró detectar la presencia de G-CSF e IL-6 en todas las concentraciones y diluciones de anticuerpo ensayadas (Gráfica 3 y Gráfica 4).

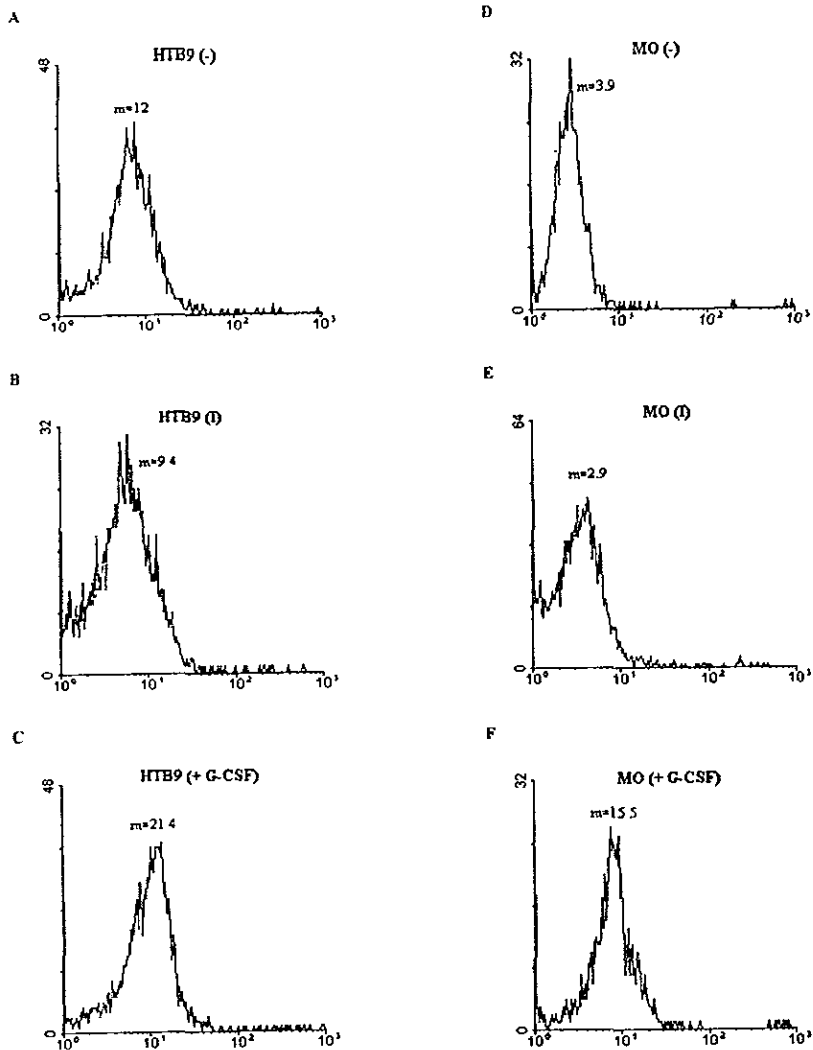
Por otra parte, para determinar la presencia de estas dos citocinas por medio de citometría de flujo, se colectaron colonias de macrófagos de cultivos con GM-CSF, y se permearon con sapononina al 0.3% para medir la presencia de G-CSF e IL-6 intracelularmente. Los resultados indican que los macrófagos obtenidos con GM-CSF producen G-CSF e IL-6 (Gráfica 5 y 6). Como se observa en la Gráfica 5, la línea celular HTB9 (utilizada en este ensayo como control positivo de G-CSF), tanto el control negativo como el anticuerpo irrelevante presentaron medianas de 12 y 9.4 respectivamente; mientras que con el anti G-CSF su mediana fue de 21.4. Con macrófagos provenientes de un cultivo de GM-CSF tanto el negativo como el anticuerpo irrelevante se obtuvo una mediana de 3.9



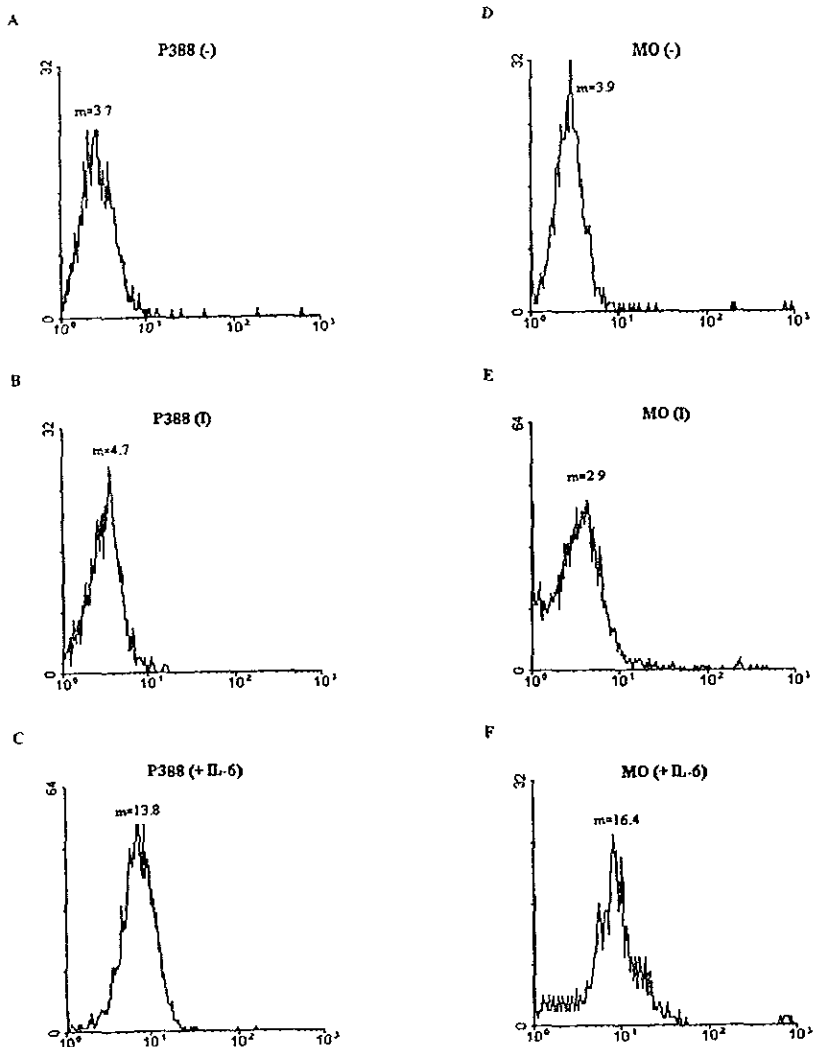
Gráfica 3. Presencia de G-CSF en el lisado de colonias de macrófagos provenientes de precursores de médula ósea estimulados con GM-CSF. La presencia de G-CSF se logró detectar a diferentes diluciones del lisado y concentraciones del anticuerpo anti-G-CSF. En todos los ensayos se utilizó rhG-CSF como testigo positivo a una concentración de 200ng/ml. Se muestran los datos y la desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado.



Gráfica 4. Presencia de IL-6 en el lisado de colonias de macrófagos provenientes de precursores de médula ósea estimulados con GM-CSF. La presencia de IL-6 se logró detectar a diferentes diluciones del lisado y concentraciones del anticuerpo anti-IL-6. En todos los ensayos se utilizó IL-6 como testigo positivo a una concentración de 50ng/ml. Se muestran los datos y la desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado.



Gráfica 5. Detección intracelular de G-CSF en colonias de macrófagos de médula ósea formadas en presencia de GM-CSF. (A) Control negativo HTB9(-), células HTB9 con anticuerpo secundario únicamente, (B) Control negativo HTB9(I), células HTB9 con anticuerpo irrelevante, (C) Control positivo HTB9(+G-CSF), células HTB9 con anticuerpo contra G-CSF. (D) Control negativo MO(-), macrófagos con anticuerpo secundario únicamente, (E) Control negativo MO(I), macrófagos con anticuerpo irrelevante, (F) MO (+G-CSF), macrófagos provenientes de un cultivo con GM-CSF con anticuerpo contra G-CSF. Se muestran las medianas de un experimento representativo realizado por triplicado.



Intensidad de Fluorescencia

Gráfica 6. Detección intracelular de IL-6 en colonias de macrófagos de médula ósea formadas en presencia de GM-CSF. (A) Control negativo P388(-), células P388 con anticuerpo secundario únicamente, (B) Control negativo P388(I), células P388 con anticuerpo irrelevante, (C) Control positivo P388(+IL-6), células P388 con anticuerpo contra IL-6. (D) Control negativo MO(-), macrófagos con anticuerpo secundario únicamente, (E) Control negativo MO(I), macrófagos con anticuerpo irrelevante, (F) MO (+IL-6), macrófagos provenientes de un cultivo con GM-CSF con anticuerpo contra IL-6. Se muestran las medianas de un experimento representativo realizado por triplicado.

y 2.9 respectivamente; mientras que con el antiG-CSF la mediana fue de 15.5. Por otra parte, para detectar la presencia de IL-6, se utilizó una línea celular productora de esta citocina al ser estimulada con IL-1 llamada P388. En la Gráfica 6 se puede observar que tanto el negativo como el anticuerpo irrelevante en estas células, las medianas fueron de 3.7 y 4.7 respectivamente; mientras que con anti IL-6 fue de 13.8. Con macrófagos provenientes de un cultivo con GM-CSF el negativo como el irrelevante las medianas fueron de 3.9 y 2.9 respectivamente y con el anti IL-6 fue de 16.4.

Lo anterior, nos hace suponer que posiblemente los granulocitos formados en los cultivos con rmGM-CSF sean resultado del efecto de G-CSF e IL-6 secretados por los macrófagos que aparecen tempranamente.

Anti G-CSF y Anti IL-6 inhiben fuertemente la formación de colonias de granulocitos en el cultivo de médula ósea en presencia de GM-CSF.

Después de comprobar que los macrófagos inducidos con GM-CSF producen G-CSF e IL-6, se determinó si estas citocinas son las responsables de la formación de las colonias de granulocitos en un cultivo con GM-CSF. Para lo cual se cultivaron células de médula ósea en medio semisólido en presencia de GM-CSF junto con anticuerpos contra G-CSF e IL-6. Después de siete días de cultivo, encontramos que las colonias en el cultivo con GM-CSF más anticuerpos disminuyeron en un 77.5 % en relación con el cultivo donde únicamente se agregó GM-CSF (Tabla 8). Además las colonias de granulocitos se redujeron de 113 con GM-CSF hasta 7 colonias en presencia de GM-CSF con los dos anticuerpos, y las colonias de granulocitos con GM-CSF mostraron ser más grandes y algunas muy diferenciadas (Fotografía 1a, b); mientras que las colonias de granulocitos con GM-CSF y los dos anticuerpos fueron pequeñas y poco diferenciadas (Fotografía 2a,b). Con respecto a los cultivos de GM-CSF más anti-G-CSF y GM-CSF más anti-IL-6 existió una disminución en la proliferación del 31 y 34 % respectivamente en relación al cultivo con únicamente GM-CSF y las colonias de granulocitos fueron ligeramente más pequeñas con GM-CSF más anti G-CSF (Fotografía 3a,b) que con GM-CSF más anti IL-6 (Fotografía 4a,b). Estos datos sugieren que la presencia de colonias de granulocitos en un cultivo con GM-CSF, es

INDUCTOR	NUMERO DE COLONIAS (PORCENTAJE)					TOTALES
	GRANULOCITOS			MACROFAGOS	BLASTOS	
	BANDA	MADUROS	TOTAL			
(-)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0
rmGM-CSF	35(13±4.2)	78(29±2.8)	113(42±1.4)	140(52±0.3)	18(6±0.7)	271
rmG-CSF	14(15±2.1)	78(84±0.7)	92(99±1.1)	1(1±1.4)	0(0)	93
rmIL-6	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0
rmG-CSF + α G-CSF	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0
rmIL-6 + α IL-6	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0
rmGM-CSF + α G-CSF	43(23±2.8)	38(21±0)	82(44±2.8)	90(48±0.7)	14(8±2.1)	186
rmGM-CSF + α IL-6	44(24±0.7)	38(20±1.4)	80(44±2.8)	85(47±4.2)	15(9±2.1)	180
rmGM-CSF + α G-CSF + α IL-6	6(10±1.4)*	1(1±2.1)	7(11±3.5)	53(88±0.7)	1(1±1.4)	61

Tabla 8. G-CSF e IL-6, participan fuertemente en la formación de granulocitos en células de médula ósea cultivadas en presencia de GM-CSF. La presencia de anti G-CSF y anti IL-6 en un cultivo de células de médula ósea con GM-CSF, reduce el número de colonias de granulocitos con respecto al cultivo donde únicamente se encuentra GM-CSF. Se muestran los datos y la desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado.

(-), cultivo sin inductor de colonias.

rmGM-CSF, Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos recombinante de ratón.

rmIL-6, Interleucina-6 recombinante de ratón.

αG-CSF, anticuerpo contra G-CSF.

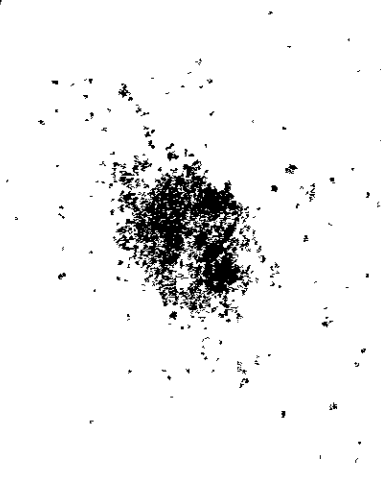
αIL-6, anticuerpo contra IL-6.

*, Colonias de granulocitos, pequeñas, poco diferenciadas y de morfología compacta.

a



b

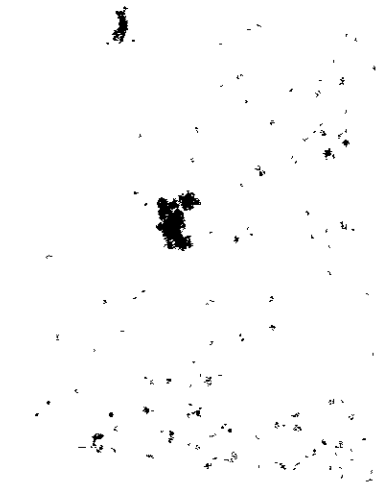


Fotografía 1. Colonia de granulocitos obtenida en un cultivo de células de médula ósea con GM-CSF y teñida con cloroacetato esterasa. Las células son positivas para la tinción, caracterizadas por presentar gránulos rojos brillantes en el citoplasma. Se observan granulocitos diferenciados en la periferia de la colonia. Aumento 40X (a) y 10X (b).

a

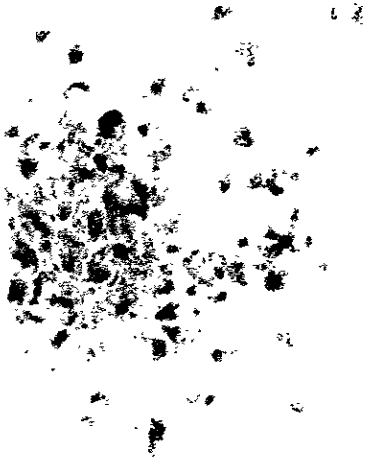


b



Fotografía 2. Colonia de granulocitos obtenida en un cultivo de células de médula ósea con GM-CSF+anti G-CSF+anti IL-6 y positiva para la tinción con cloroacetato esterasa. La colonia es pequeña y de morfología compacta poco diferenciada. Aumento 40X (a) y 10X (b).

a

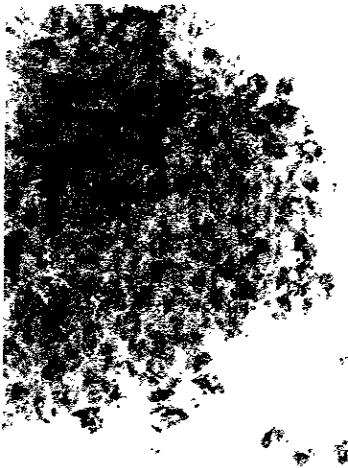


b



Fotografía 3. Colonia de granulocitos un cultivo de células de médula ósea con GM-CSF+anti G-CSF y positiva para la tinción para cloroacetato esterasa. La colonia presenta algunos granulocitos diferenciados en la periferia de la colonia. Aumento 40X (a) y 10X (b).

a



b



Fotografía 4. Colonia de granulocitos en un cultivo de células de médula ósea con GM-CSF+anti IL-6 y positiva para la tinción con cloroacetato esterasa. La colonia muestra una morfología compacta y poco diferenciada. Aumento 40X (a) y 10X (b).

debida principalmente a la secreción de G-CSF e IL-6 por parte de los macrófagos.

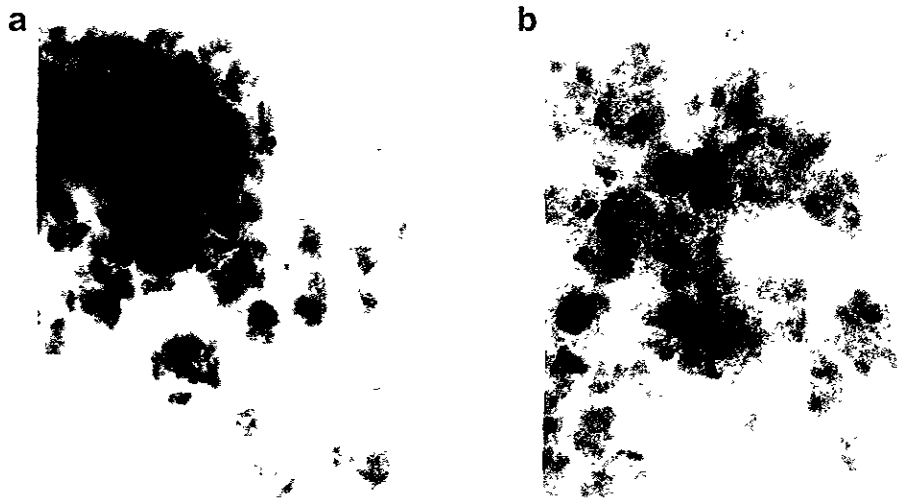
Células precursoras de linaje monocito-macrófagos proliferan en presencia de GM-CSF y se diferencian con M-CSF.

De acuerdo a los resultados obtenidos al cultivar células médula ósea de ratón con rmGM-CSF, consideramos que este factor solamente actúa sobre precursores de macrófagos, induciendo su proliferación. Por otra parte, se sabe que el M-CSF es un factor exclusivo del linaje monocito-macrófago; y de acuerdo a nuestros resultados también lo es el GM-CSF. En consecuencia se quiso determinar si existe alguna diferencia en el potencial proliferativo entre ambos factores. Con esta finalidad, se cultivaron células de médula ósea en medio semisólido en presencia de rmGM-CSF y rhM-CSF por separado.

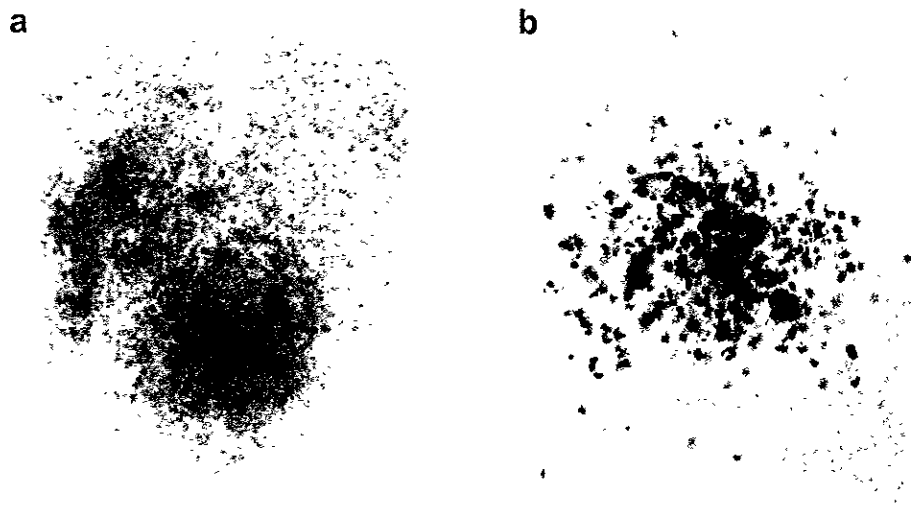
Después de siete días de cultivo, se evaluaron las colonias obtenidas en ambos cultivos; además se transfirieron colonias de monocito-macrófagos provenientes de ambos cultivos a nuevos sustratos de cultivo conteniendo GM-CSF o M-CSF.

A los siete días de cultivo, el GM-CSF promovió la formación de colonias grandes de macrófagos, compactas y escasamente vacuoladas (Fotografía 5a), en contraste a las colonias formadas con M-CSF que fueron difusas y ampliamente vacuoladas (Fotografía 5b), característica típica de células diferenciadas.

Por otra parte, las colonias provenientes de cultivos con rhM-CSF y transferidas a un sustrato con rhM-CSF o rmGM-CSF ya no proliferaron después de siete días (Fotografía 6a). En cambio las colonias provenientes de cultivos con rmGM-CSF y transferidas a rmGM-CSF o rhM-CSF crecieron abundantemente manteniendo el estímulo proliferativo de las colonias hasta por 45 días. (Fotografía 6b). Con base a la morfología de las colonias y a la prolongación de su proliferación en los cultivos con GM-CSF y M-CSF, estos datos nos permiten sugerir que si bien, ambos factores inciden sobre los precursores del linaje monocito-macrófago, el GM-CSF es un factor con característica proliferativa más que diferenciadora; mientras que el M-CSF es un factor diferenciador del linaje monocito macrófago.



Fotografía 5. Colonias de monocitos-macrófago teñidas con alfa-naftil acetato esterasa obtenidas en un cultivo de células de médula ósea con GM-CSF (a) y con M-CSF (b). Las células son positivas a la tinción presentando un precipitado difuso en el citoplasma color marrón. En (a) la colonia presenta un centro compacto y las células están escasamente vacuoladas, en (b) la colonia es difusa y ampliamente vacuolada. Aumento 40X.



Fotografía 6. (a) Colonia obtenida con M-CSF después de 45 días de cultivo, la cual solo mantuvo su estímulo proliferativo durante 7 días. La colonia se observa necrótica y de tamaño pequeño. (b) Colonia obtenida con GM-CSF y mantenida en cultivo durante 45 días. La colonia creció abundantemente y las células se observan refringentes. Aumento 10X.

DISCUSION.

Generalmente se acepta que todas las células hematopoyéticas se originan de una célula tallo pluripotencial en la médula ósea (Gordon y Amos, 1994; Dexter, et al 1990).

La existencia de esta célula pluripotencial ha sido difícil de identificar teniendo que basarse en muchas ocasiones en evidencias indirectas, aunque experimentos recientes apuntan fuertemente en esta dirección. A pesar del avance técnico en este campo, donde ya es posible el aislamiento de células individuales, ha sido difícil obtener una sola célula precursora capaz de diferenciarse en todas las diferentes células sanguíneas en respuesta a los factores estimuladores hasta ahora conocidos. En consecuencia, para conocer los mecanismos de proliferación y diferenciación de precursores hematopoyéticos a través de citocinas, muchos de los experimentos llevados a cabo, son realizados con una mezcla de células precursoras de médula ósea, células progenitoras de sangre de cordón umbilical, células progenitoras de sangre periférica movilizadas con citocinas (Emerson, 1996) o con líneas celulares transformadas (Heyworth, et al 1990).

Otro factor importante para el estudio de la diferenciación de células hematopoyéticas reside en la identificación y utilización de factores estimuladores de la proliferación y diferenciación celular. Se sabe que estos factores son producidos endógenamente, algunos por células estromales y otros por las mismas células hematopoyéticas. En consecuencia, a pesar de que se usan factores recombinantes para estos experimentos, la secreción de otros factores por las mismas células en respuesta a una citocina en particular, complican el entendimiento de la actividad de un solo factor sobre su respectiva célula blanco (Morstyn y Burgess, 1988).

Actualmente se acepta que la mayoría de los linajes hematopoyéticos provienen de diferentes células comprometidas (originadas apartir de la célula tallo pluripotencial), excepto los macrófagos y granulocitos-neutrófilos que se supone son fagocitos que se derivaban de una célula comprometida común o bipotencial denominada unidad formadora de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CFU), que es estimulada por un factor humoral específico llamado factor estimulador de colonias de granulocitos y

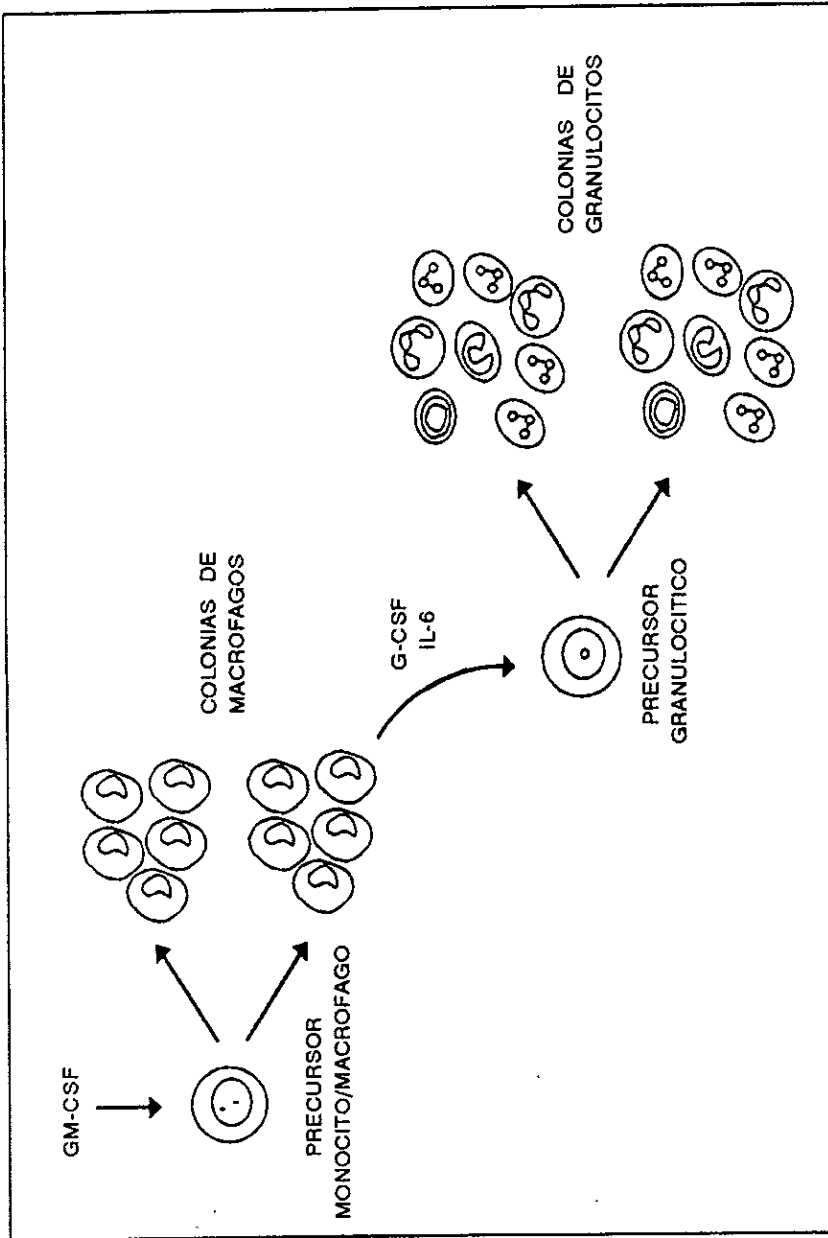
macrófagos (GM-CSF) (Metcalf, et al 1986; Metcalf y Burgess, 1982; Gasson, 1991).

Consideramos que una de las principales contribuciones de los resultados aquí mostrados consiste en la presentación de evidencias que sugieren la presencia de una célula comprometida en médula ósea para cada uno de estos fagocitos y que el GM-CSF es un factor proliferador de precursores de macrófagos que genera de una manera indirecta la producción de granulocitos (Esquema 1), abriendo de esta manera una nueva alternativa de interpretar el esquema de diferenciación de células mieloides, en particular en lo referente al origen y mecanismos de interrelación en la proliferación y diferenciación de células fagocíticas (Esquema 2).

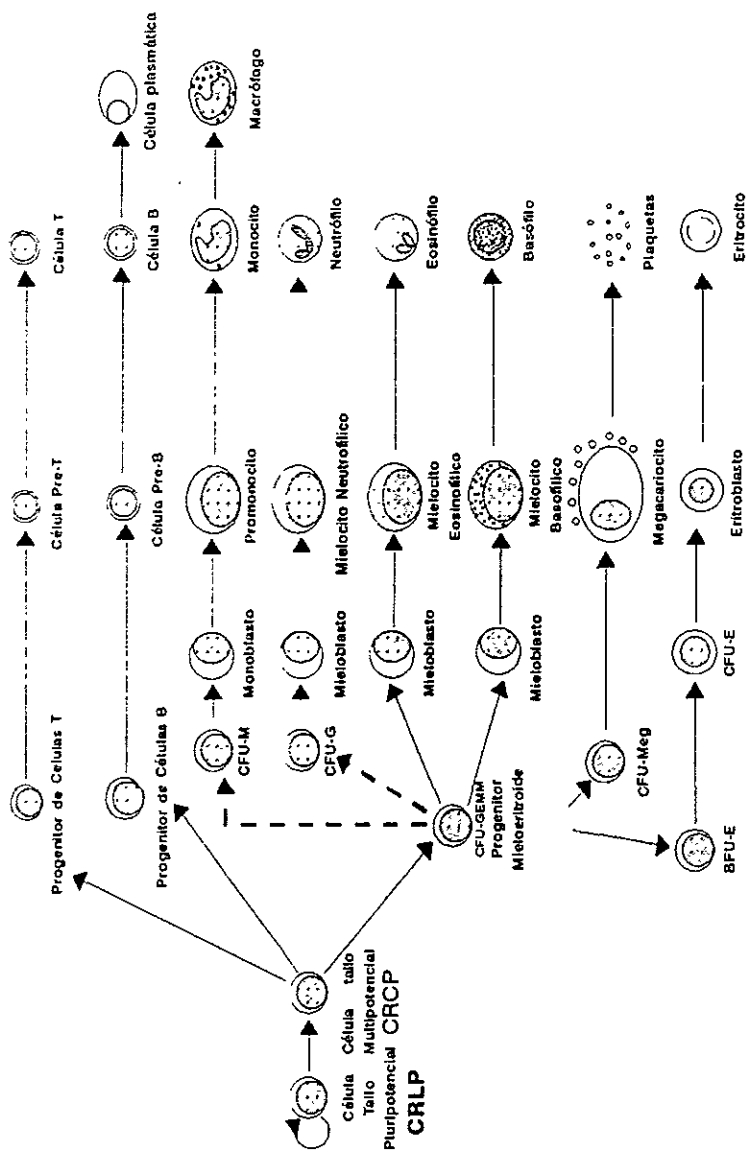
Históricamente, la primera evidencia de la existencia de un precursor común o bipotencial para macrófagos y granulocitos, consistió en la presencia de colonias mixtas en cultivos en medio semisólido en agar que contenían este tipo de células en diferentes estadios de diferenciación, en respuesta a medios estimuladores provenientes de sobrenadantes de cultivos celulares (Pluznik y Sachs, 1965; Bradley y Metcalf, 1966).

Posteriormente, se identificó al GM-CSF como la supuesta molécula responsable de esta actividad. En nuestros experimentos pudimos en efecto observar algunas colonias con apariencia mixta, sin embargo un análisis más minucioso nos sugirió que tales colonias estaban constituidas en realidad por dos colonias que presentaban pequeñas diferencias entre el centro de cada una de ellas, además de encontrarse en el agar en muchas ocasiones en planos diferentes. Por otro lado, se ha demostrado que el macrófago produce y secreta G-CSF (Zambrano, et al 1989a, 1989b; Mendoza, et al 1990), así como factores quimiotácticos para granulocitos (Westwick, et al 1989; Takahashi, et al 1993). Por lo que nos dimos a la tarea de indagar sobre la posibilidad de que la formación de colonias mixtas en los cultivos de médula ósea con GM-CSF, sea el resultado de una quimioatracción de un precursor granulocítico en la vecindad de una colonia de macrófagos (previamente estimulada), propiciando así a la formación de una colonia granulocítica inducida por la secreción del G-CSF por el macrófago dando la impresión de una colonia mixta (Esquema 3).

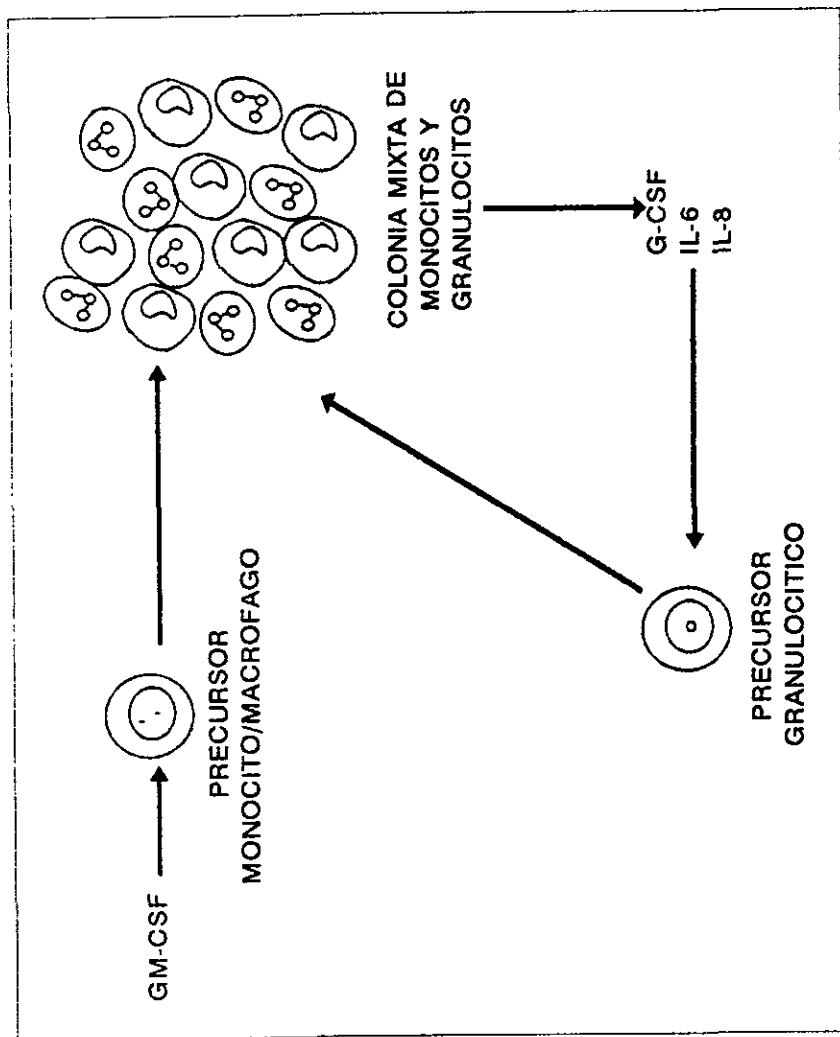
Creemos conveniente mencionar que en otros laboratorios se han venido realizando estudios tendientes a demostrar el origen clonal de las colonias



Esquema 1. Modelo que representa la formación de colonias de macrófagos y granulocitos a partir de precursores independientes para ambas células.



Esquema 2. Modelo propuesto sobre el origen monoprotencial de la diferenciación de los linajes granulocito-neutrófilo y macrófágico. En este modelo se muestra (líneas punteadas) que éstos linajes se originan a partir del progenitor mieloeritroide, y no de un precursor bipotencial (CFU-GM), como se describe en el modelo propuesto por Morrison et al, 1995.



Esquema 3. Modelo de formación de colonias mixtas (monocito-macrófago) a través del efecto indirecto del GM-CSF.

multipotenciales tanto en ratón como en humano, utilizando células de sangre de cordón umbilical, de bazo y de médula ósea (estimuladas con 5-FU) y estimuladas con medios condicionados o una mezcla de factores de crecimiento hematopoyéticos (Nakahata y Ogawa, 1982; Suda et al, 1983; Suda et al, 1984; Leary et al, 1984; Leary et al, 1985; Mayani y Lansdorp, 1995), y que en éstos trabajos se ha demostrado la formación de granulocitos y macrófagos a partir de una sola célula lo cual evidencia la existencia de un precursor común a estas células, sin embargo no demuestran el posible papel del GM-CSF en este proceso.

En nuestro trabajo encontramos que al realizar la cinética de formación de colonias de granulocitos y macrófagos en respuesta al GM-CSF, encontramos que las células del linaje monocito-macrófago aparecieron primero y posteriormente los granulocitos, lo cual refuerza nuestra suposición de que los macrófagos al proliferar antes que los granulocitos pudieran secretar factores quimiotácticos como la IL-8 y G-CSF para atraer a los precursores de granulocitos. De hecho, se ha demostrado que los monocitos al estímulo de GM-CSF producen IL-8 (Westwick, et al 1989; Takahashi, et al 1993). Estos resultados pudieran explicar datos clínicos en los que al suministrar GM-CSF recombinante a pacientes con cáncer de pulmón, primero se da una respuesta fuerte a la proliferación de monocitos y más tarde de granulocitos (Lord, et al 1992).

Nuestra hipótesis de que existen precursores de tipo macrofágico y no granulocíticos que responden a la proliferación en presencia GM-CSF, fue sustentada por el hecho de que al clonar los grupos generados durante los primeros dos días en presencia de GM-CSF y al seguir estimulándolos con este factor, encontramos exclusivamente la generación de colonias de macrófagos. Es conocido que los precursores de granulocitos y macrófagos presentan receptores para el GM-CSF (Dexter and Heyworth, 1994), sin embargo, sabemos que ciertos receptores mieloides responden a este estímulo para favorecer la viabilidad celular y no necesariamente proliferando. De acuerdo a lo anterior, nosotros explicaríamos nuestros resultados de la siguiente manera: los precursores de monocito-macrófagos responden proliferando en presencia de GM-CSF y los precursores de granulocitos manteniéndose viables, para que cuando el monocito produzca G-CSF, el granulocito sea capaz de responder proliferando.

Es interesante mencionar, que esta hipótesis también es apoyada por un estudio, en donde realizan un análisis sistémico y clonal de la hematopoyesis a largo plazo en el ratón, y que en una de sus conclusiones afirman que la regulación del linaje macrófágico puede ser independiente del linaje granulocítico, y que por tanto pueden estar involucrados precursores monopotenciales y no bipotenciales como el GM-CSF (Jordan y Lemischka, 1990).

Por otra parte, se ha encontrado en cultivos de células progenitoras primitivas (Lin⁻ Sca⁺) en presencia de GM-CSF que se obtiene hasta un 90% de macrófagos, y que se requiere además de IL-6 para que empiecen a formar granulocitos (Jacobsen, et al 1994). En otro artículo reciente, se indica que al ser transfectadas las cadenas α y β del receptor para GM-CSF humano en la línea celular mielomonocítica WEHI-3B D⁺, el GM-CSF induce fuertemente la diferenciación de estas células hacia el linaje macrófágico (Smith A et al, 1997).

Pensamos que mientras el GM-CSF es un factor temprano en la proliferación de macrófagos, el M-CSF es un factor tardío involucrado principalmente en su diferenciación. Esta suposición es apoyada por el hecho de que cuando mantuvimos nuestros cultivos con GM-CSF, éstos generaban colonias compactas de tipo monocítico por más de 45 días, mientras que con M-CSF se obtenían pequeñas colonias de células macrófágicas altamente diferenciadas cuya proliferación se detenía a los 7 días de cultivo. Además, otro hecho que indica el diferente grado de maduración de estos dos tipos de colonias fue que cuando las colonias inducidas por GM-CSF eran transferidas a cultivos con M-CSF la proliferación y diferenciación continuaba; mientras que las colonias inducidas con M-CSF al ser transferidas a GM-CSF dejaban de proliferar.

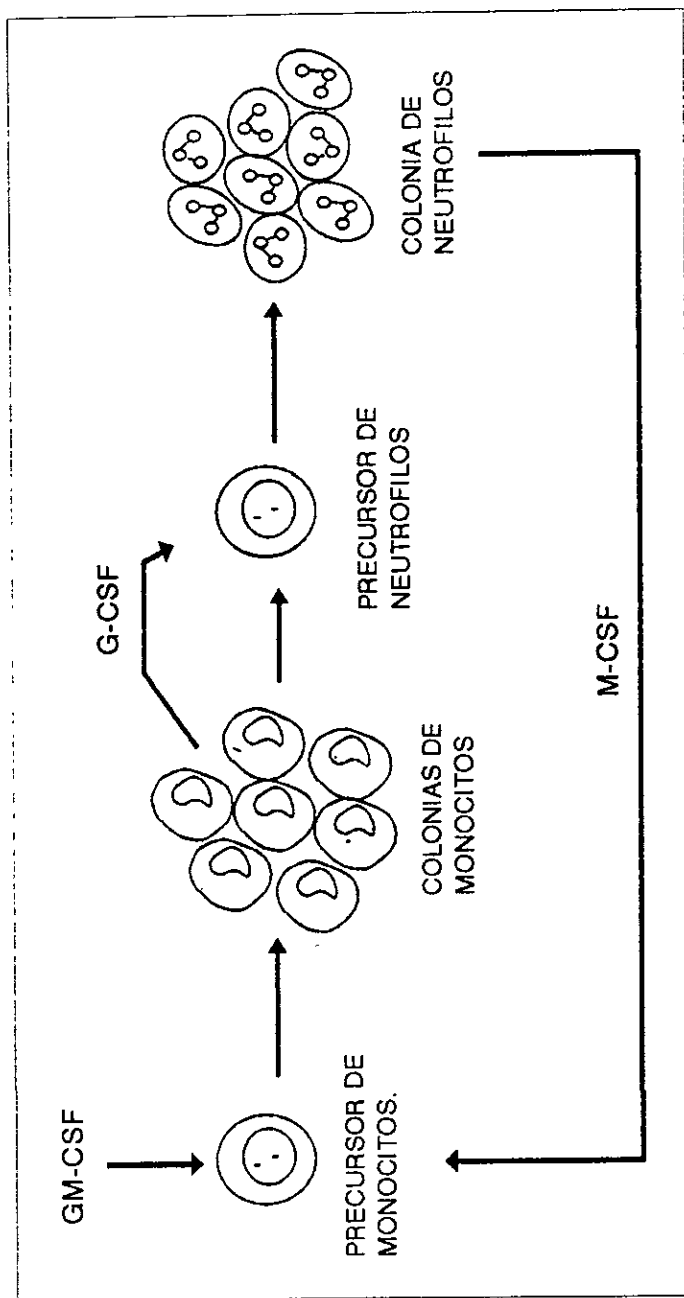
Asimismo, los lisados de las colonias compactas generadas por el GM-CSF contenían G-CSF, pero no las diferenciadas obtenidas con el estímulo de M-CSF, lo cual refuerza nuestra hipótesis de que el GM-CSF es un factor temprano y el M-CSF tardío en la generación de macrófagos. Como un dato adicional mencionaremos que para que el M-CSF estimule la formación de colonias de macrófagos se necesitan altas

concentraciones o en combinación con IL-3, pero solo promueve el crecimiento de pequeñas colonias de macrófagos maduros (Paterne et al, 1993).

Como es conocido que tanto el GM-CSF, el G-CSF, el M-CSF como la IL-3 inducen la producción de IL-6; un factor que estimula la diferenciación de células precursoras mieloides (Sachs 1996) y que además se ha demostrado que estimula la formación (diferenciación) de granulocitos (Metcalf 1989), en este trabajo también evaluamos la posible presencia de IL-6 en los lisados de colonias de macrófagos estimulados con GM-CSF. En efecto encontramos que esta citocina está presente además del G-CSF. Al demostrar que solo el uso combinado de anticuerpos contra G-CSF e IL-6 inhibieron fuertemente la formación de granulocitos en un cultivo con GM-CSF nos indicó que ambos factores son necesarios para la formación de colonias de granulocitos y que en ausencia de cualquiera de estos factores basta con la presencia del otro para garantizar la formación de este tipo de colonias.

Consideramos que el menor tamaño y mayor diferenciación de las colonias de granulocitos generadas con GM-CSF más anti G-CSF en comparación al encontrado con GM-CSF más anti IL-6 puede ser atribuido a que como es conocido los precursores de granulocito responden más al estímulo proliferador del G-CSF que al diferenciador de la IL-6; por consiguiente al inhibir en el cultivo al G-CSF se favorecería la formación de colonias diferenciadas por la actividad del IL-6, mientras que se esperarían colonias de mayor tamaño y menos diferenciadas cuando solo esté presente el G-CSF.

Es interesante comentar que en los cultivos tanto con GM-CSF más anti G-CSF, como con GM-CSF más anti IL-6 así como con GM-CSF y ambos anticuerpos, además de disminuir el número de colonias de granulocitos, también disminuyeron las colonias de macrófagos. Este fenómeno era de esperarse ya que se ha demostrado que el granulocito tiene la capacidad de producir M-CSF, el cual puede incidir en la estimulación del monocito-macrófago, cerrándose un circuito de estimulación entre estos dos tipos celulares (Santiago, et al 1994) (Esquema 4). Por consiguiente se esperaría que al reducirse el número de colonias de granulocitos la producción de M-CSF se vea afectada, y la formación de colonias de macrófagos-monocitos también.



Esquema 4. Modelo de interrelación entre el monocito y granulocito-neutrófilo a través de un circuito de estimulación.

Este circuito de producción tan interdependiente de factores entre el granulocito y el macrófago nos indica que posiblemente en las diferentes etapas de maduración de estos dos tipos celulares participen otros factores secretados por éstas. En este sentido anteriormente publicamos un modelo en el que se propone que factores exógenos que estimulan la proliferación pueden inducir la secreción de otros factores endógenos que ayudan a la proliferación y diferenciación de otro tipo celular (Zambrano, et al 1989a).

Es pertinente mencionar que nuestros resultados pueden explicar los obtenidos en un trabajo en donde se reporta que la administración de G-CSF exógena mejora la recuperación *in vivo* de monocitos por un mecanismo que depende del M-CSF endógeno (Gilmore, et al 1995).

La posibilidad de que el GM-CSF sea un factor específico para el linaje monocito macrófago abre dos expectativas: la primera es identificar al GM-CSF como un factor proliferativo exclusivo del linaje monocito-macrófago, y la segunda, proporcionar un modelo nuevo de formación de granulocitos y macrófagos, contribuyendo de esta forma al conocimiento básico en el proceso de formación de estos linajes celulares. Esta información en la clínica es relevante ya que en la actualidad el GM-CSF se está utilizando en la recuperación de pacientes inmunodeprimidos de tipo hematológico y oncológico para reestablecer las poblaciones de macrófagos y granulocitos que fueron dañados como una consecuencia de los tratamientos de quimioterapia, radiación, o trasplante de médula ósea (Lieschke y Burgess, 1992; Hill, et al 1995).

Conocer los mecanismos de formación de macrófagos y granulocitos, podría evitar resultados indeseables en los pacientes inmunodeprimidos, como sería la obtención de una granulopoyesis inefectiva al suministrar únicamente GM-CSF, ya que no se lograría una buena respuesta en la formación de neutrófilos funcionales (Lord, et al 1992). Este hecho lo podemos explicar si consideramos que de acuerdo a nuestros resultados, el GM-CSF inducirá la formación de granulocitos a través de un efecto secundario, lo cual podría ser insuficiente para la generación de granulocitos totalmente funcionales. El problema se corregiría al suministrar un segundo factor como el G-CSF que es el específico para el linaje granulocito-neutrófilo (Lord, et al 1989).

Visualizar al GM-CSF como un factor inductor de la proliferación de granulocitos y macrófagos, puede traer errores en el uso terapéutico de este factor. En un estudio de 16 pacientes con sarcoma avanzado y mielosupresión provocada por la quimioterapia, se observó que, aunque se logra acortar el período de neutropenia al suministrar GM-CSF dos pacientes mueren de sepsis, en comparación a un grupo control donde ningún sujeto murió en ausencia del CSF. Lo anterior creó preocupación, ya que las citocinas secundarias que son inducidas por el GM-CSF (TNF e IL-1) pueden sinergizarse con endotoxinas endógenas y dar un profundo choque séptico (Bar, et al 1989; Moore, 1991). El macrófago es el responsable de secretar estas citocinas y de acuerdo a nuestros resultados el monocito-macrófago es la célula blanco del GM-CSF, lo que provocaría que al suministrar este factor se esté estimulando la formación de monocitos, además de iniciarse una producción en cascada de citocinas (Moore, 1991).

Por lo expuesto sugerimos que si se desea disminuir el período de neutropenia en estos pacientes es más conveniente suministrar G-CSF y así disminuir los riesgos secundarios en el paciente. Si la población monocítica es la que se desea amplificar entonces el GM-CSF es el factor más indicado, aunque se tendría que aplicar a dosis más bajas para disminuir los efectos adversos. Esto es reforzado a nivel fisiológico, ya que recientemente, se reportó que ratones deficientes únicamente en G-CSF presentan una profunda neutropenia, además de una reducción de granulocitos en médula ósea (Liescke, et al 1994). De acuerdo a lo anterior, el G-CSF es la citocina principal de la granulopoyesis y el GM-CSF, aunque esta presente, no tiene una función en la generación de granulocitos.

CONCLUSIONES

- 1.- El GM-CSF es un factor específico de la proliferación del linaje monocito-macrófago.
- 2.- La formación de granulocitos de precursores de médula ósea en un cultivo *in vitro* en presencia de GM-CSF, se debe principalmente a la secreción de G-CSF e IL-6 por parte del monocito-macrófago.
- 3.- El GM-CSF es un factor temprano de la proliferación de monocito y el M-CSF es un factor tardío de la diferenciación del macrófago.
- 4.- Existe un circuito de comunicación entre el granulocito y macrófago mediada por la producción de M-CSF y G-CSF respectivamente.

REFERENCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. (1991). Cellular and molecular immunology. WB Saunders Company, USA. pp.417.

Abbound CN, Liesveld JL, and Lichtman MA. (1993). The architecture of marrow and its role in hematopoietic cell lodgment. In: The hematopoietic microenvironment. Michael W Long, Max S Wicha (eds). (Baltimore: The Johns Hopkins University Press), pp. 2-20.

Allen TD, and Dexter TM. (1982). Ultrastructural aspects of erythropoietic differentiation in long-term bone marrow culture. *Differentiation* 21:86-94.

Allen TD, Dexter TM, and Simmons PJ. (1990). Marrow biology and stem cells. In: Colony stimulating factors. Molecular and cellular biology. TM Dexter, DM Garland and NG Testa (eds). (New York: Marcel Dekker, Inc.), pp. 1-38.

Amos TAS, and Gordon MY. (1995). Sources of human hematopoietic stem cells for transplantation - A review. *Cell Transplantation* 4:547-569.

Antin, J.H., Smith, B.R., Holmes, W., and Rosenthal, D.S. (1988). Phase I/II study of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 72, 705-713.

Austin PE, McCulloch EA, and Till JE. (1971). Characterization of macrophage and granulocyte inducing proteins for normal and leukemic myeloid cell produced by the Krebs ascites tumor. *Biochim Biophys Acta.* 673:552-554.

Bagley CJ, Woodcok JM, Stomski FC, and Lopez AF. (1997). The structural and functional basis of cytokine receptor activation: Lessons from the common b subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, Interleukin-3 (IL-3), and IL-5 receptors. *Blood* 89:1471-1482.

Baker DA, Maher J, Roberts IAG, and Dibb NJ. (1994). Evidence that ras and myc mediate the synergy between SCF or M-CSF and other haemopoietic growth factors. *Leukemia* 8:1970-1981.

Baldwin, G., Gasson, J., Quan, S., Fleishmann, J., Weisbart, R., Oette, D., Mitsuyasu, R.T., and Golde, D.W. (1988). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances neutrophil function in acquired immunodeficiency syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 2763-2766.

Bar MH, Aronson FR, Antman KH, Elias AM, Cannistra SA, Frei E III, Schnipper LE, Griffin JD. (1989). Recombinant human GM-CSF in myelosuppression of chemotherapy. *N Engl J Med* 320:939--940.

Barlow, D P., Bucan, M., Lehrach, H., Hogan B.L.M., and Gough, N.M. (1987). Close genetic and physical linkage between the murine haemopoietic growth factor genes GM-CSF and Multi-CSF (IL-3). *EMBO J.* 6, 617-623.

Bazan F. (1990). Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor super family. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6934-6938.

Beck WS. (1991). Hematology. Fifth edition. The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, USA, pp. 1-21.

Berardi AC; Wang A, Levine JD, Lopez P, Scadden DT. (1995). Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science* 267:104-107.

Bermudez L.E., and Young, L.S. (1990). Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates human macrophages to inhibit growth or kill *Mycobacterium avium* complex. *J Leukoc Biol* 48, 67-73.

Botnick LE, Hannon EC, and Hellman S. (1979). Nature of the hematopoietic stem cell compartment and its proliferative potential. *Blood Cells* 5:195-210.

Bradley TR and Metcalf D. (1966). The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* 44:287-300.

Brown, C.B., Hart, C.E., Curtis, D.M., Bailey M.C., Kaushansky, K. (1990). Two neutralizing monoclonal antibodies against human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor recognize the receptor binding domain of the molecule. *J Immunol* 144, 2184.

Büchner, T. (1994). Hematopoietic growth factors in cancer treatment. *Stem Cells* 12, 241-252.

Burgess, A.W., Camakaris, J., and Metcalf, D. (1977). Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium. *J Biol Chem* 252, 1998-2003.

Burgess, A.W., Metcalf, D., Sparrow, L.G., Simpson, R.J., and Nice, E.C. (1986). Granulocyte/macrophage colony stimulating factor from mouse lung conditioned medium. *Biochem. J.* 235, 805-814.

Burgess, A.W., Nicola, N.A., Johnson, G.R., and Nice, E.C. (1982). Colony-forming cell proliferation: A rapid and sensitive assay system for murine granulocyte and macrophage colony-stimulating factors. *Blood*, 60, 1219-1223.

Calcagno M, Pérez JR, Waldo MG, Cabrera G, Weiss B. (1982). Evidence of the existence of a factor that induces Fc receptors on bone marrow cells. *Blood* 59:756-760.

Campbell AD, Long MW, Wicha MS. (1987). Haemonectin, a bone marrow adhesion protein specific for cells of granulocyte lineage. *Nature* 329:744-746.

Cannistra SA and Griffin JD. (1988). Regulation of the production and function of granulocytes and monocytes. *Sem Hematol* 25:173-188.

Cannistra, S.A., Ramboldi, A., Spriggs, D.R., Herrmann, F., Kufe, D., and Griffin, J.D. (1987). Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces expression of the tumor necrosis factor gene by the U 937 cell line and by normal human monocyte. *J Clin Invest* 79, 1720-1728.

Cantley LC, Auger R, carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kappeler R, Soltoff S. (1991). Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64:281-302.

Caracciolo, D., Clark, S.C., and Rovera, G. (1989). Human interleukin-6 supports granulocytic differentiation of hematopoietic progenitor cells and acts synergistically with GM-CSF. *Blood* 73, 666-670.

Clark SC, and Kamen R. (1987). The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 236.1229-1237.

Cosman D, Lyman SD, Idzerda RL, Beckmann MP, Park LS, Goodwin RG, March CJ. (1990). A new cytokine receptor family. *Trends Biochem Sci* 15:265-270.

Crocker PR, Morris L, Gordon S. (1988). Novel cell surface adhesion receptors involved in interactions between stromal macrophages and haematopoietic cells. *J Cell Sci Suppl* 9:185-206.

Crosier, P.S., Garnick, M.B., and Clark, S.C. (1992). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. In human cytokines, Handbook for basic and clinical research, B.B. Aggarwal, and J.U. Gutterman, eds.(Blackwell Scientific Publications), pp. 238-252.

Chihara, J., Plumas, J., Gruart, V., Tavernier, J., Prin, L., Capron, A., and Capron, M. (1990). Characterization of a receptor for interleukin 5 on human eosinophils: Variable expression and induction by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 172, 1347-1351.

de Jong MO, Westerman Y, Wagemaker G, Wognum AW. (1997). Coexpression of kit and the receptors for erythropoietin, interleukin 6 and GM-CSF on hemopoietic cells. *Stem Cells* 15:275-285.

Denis, M., and Ghadirian, E. (1990). Granulocyte-macropgahe colony-stimulating factor restricts growth of tubercle bacilli in human macrophages. *Immunol Lett* 24, 203-206.

Dexter TM , Spooncer E, Varga J, Allen TD and Lanotte M. (1983). Stromal cells and diffusible factors in the regulation of haemopoietic cell development. In:haemopoietic stem cell. Sv-Aa Killman, Ep Cronkite and CN Muller-Berat (eds). (Copenhagen:Munksgaard), p.303.

Dexter TM, and Heyworth CM. (1994). Growth factors and the molecular control of haematopoiesis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13(Suppl 2): 3-8.

Dexter TM, Coutinho LH, Spooncer E, Heyworth CM, Daniel CP, Schiro R, Chang J, and Allen TD. (1990a). Stromal cells in haemopoiesis. Molecular control of haemopoiesis. Wiley Chichester (Ciba Foundation Symposium 148) pp. 76-95.

Dexter TM, Heyworth CM, Spooncer E, and Ponting ILO. (1990b). The role of growth factors in self-renewal and differentiation of haemopoietic stem cells. *Phil Trans R Soc Lond B* 327:85-98.

Dexter TM, Spooncer E, Simmons P and Allen TD. (1984). Long-term bone marrow culture: An overview of techniques and experience. In: Long term bone marrow culture. DG Wright and JS Greenberger (eds). (New York: Alan R Liss), pp. 57-96.

Dexter TM. (1979). Cell interactions in vitro. *Clin Haemat* 8:453-468.

Donahue, R.E., Emerson, S.G., Wang, E.A., Wong, G.G., Clark, S.C., and Nathan, D.G. (1985). Demonstration of burst-promoting activity of recombinant human GM-CSF on circulating erythroid progenitors using an assay involving the delayed addition of erythropoietin. *Blood* 66, 1479-1481.

Donahue, R.E., Wang, E.A., Stone, D.K., Kamen, R., Wong, G.G., Sehgal, P.K., Nathan, D.G., and Clark, S.C. (1986). Stimulation of hemopoiesis in primates by continuous infusion of recombinant human GM-CSF. *Nature* 321, 872-875.

Dorshkind K. (1990). Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu Rev Immunol* 8:111-137.

Douer D. (1989). Bone marrow failure and hematopoietic growth factors. *Isr J Med Sci* 25(4):183-185.

Dranoff G, Crawford AD, Sadelain M, Ream B, Rashid A, Bronson RT, Dickersin GR, Bachurski CJ, Mark EL, Whitsett JA, Mulligan RC. (1994). Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science* 264:713-716.

Eliason JF. (1984). Long-term production of hemopoietic progenitors in cultures containing low levels of serum. *Exp Hematol* 12:559-562.

Emerson S. (1996). Ex vivo expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: the next generation of cellular therapeutics. *Blood* 87: 3082-3088.

English, D., Broxmeyer, H.E., Gabig, T.G., Akard, L.P., Williams, D.E., Hoffman, R. (1988). Temporal adaptation of neutrophil oxidative responsiveness to n-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. Acceleration by granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *J Immunol* 141, 2400-2406.

Erslev AJ and Weiss L. (1983). Structure and function of the marrow. In: Hematology. WS Williams, E Beutler, AJ Erslev, MA Lichtman (eds). (New York: McGraw-Hill), pp. 75-83.

Ferrero, D., Tarella, C., Badoni, R., Caracciolo, D., Bellone, G., Pileri, A., and Gallo, E. (1989). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor requires interaction with accessory cells or granulocyte-colony stimulating factor for full stimulation of human myeloid progenitors. *Blood* 73. 402-405.

Fleischmann, J., Golde, D.W., Weisbart, R.H., and Gasson, J.C. (1986). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances phagocytosis of bacteria by human neutrophils. *Blood* 68, 708-711.

Frazier WA. (1987). Thrombospondin: a modular adhesive glycoprotein of platelets and nucleated cells. *J Cell Biol* 105:625-632.

Freund M and Kleine HD. (1992). The role of GM-CSF in infection. *Infection (Suppl.2)* 20:S 85-S 92.

Funk PE, Kincade PW, and Witte PL. (1994). Native associations of early hematopoietic stem cells and stromal cells isolated in bone marrow cell aggregates. *Blood* 83:361-369.

Gasson, J.C. (1991). Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 77, 1131-1145.

Gasson, J.C., Weisbart, R.H., Kaufman, S.E., Clark, S.C., Hewick, R.M., Wong, G.G., and Golde, D.W. (1984). Purified human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Direct action on neutrophils. *Science* 226, 1339-1342.

Gilmore GL, DePascuale K, Fischer BC, Shadduck RK. (1995). Enhancement of monocytopoiesis by granulocyte colony-stimulating factor: Evidence for secondary cytokine effects in vivo. *Exp Hematol* 23; 1319-1323.

Glasser L, and Fiederlein R. (1987). Functional differentiation of normal human neutrophils. *Blood* 69:937-944.

Gomez-Cambronero J and Veatch C. (1996). Emerging paradigms in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor signaling. *Life Sciences* 59:2099-2111.

Gordon MY, and Barrett MJ. (1985). Bone marrow disorders. The biological basis of clinical problems. Blackwell Scientific Publications. London p.422.

Gordon MY, Riley GP, Watt SM and Greaves MF (1987). Compartmentalization of a haematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. *Nature* 326:403-405.

Gordon NY, and Amos TAS. (1994). Stochastic effects in hemopoiesis. *Stem Cells* 12:175-179.

Gough, N.M. (1990). The hemopoietic growth factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating. In growth factors, differentiation factors, and cytokines, A. Habenicht, ed. (Germany: Springer-Verlag), pp. 177-187.

Gough, N.M., and Nicola, N.A. (1990). Granulocyte-Macrophage colony-stimulating Factor. In Colony-Stimulating Factors- Molecular and Cellular Biology, T.M. Dexter, D.M. Garland, eds. (New York: Marcel Dekker, Inc.), pp. 111-153.

Gough, N.M., Gough, J., Metcalf, D., Kelso, A., Grail, D., Nicola, N.A., Burgess, A.W., and Dunn, A.R. (1984). Molecular cloning of cDNA encoding a murine haemopoietic growth regulator granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Nature* 309, 763-767.

Grabstein, K.H., Urdal, D.L., Tushinski, R.J., Mochizuki, D.Y., Price, V.L., Cantrell, M.A., Gillis S, and Conlon PJ. (1986). Induction of macrophage tumoricidal activity by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Science* 232:506-508.

Greenfield, R.S., Braslawsky, G.R., Kadow, K.F., Spitalny, G.L., Chace, D., Bull, C.O., and Bursaker, I. (1993). Identification of functional domains in murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using monoclonal antibodies to synthetic peptides. *J Immunol.* 150, 5241-5251.

Groopman, J.E., Mitsuyasu, R.T., deleo, M.J., Oette, D.H., and Golde, D.W. (1987). Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on myelopoiesis in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 317, 593-598.

Gulati GL, Ashton JK and Hyun BH. (1988). Structure and function of the bone marrow and hematopoiesis. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 2(4):495-511.

Haan G, Nijhof W, and Van Zant. (1997). Mouse strain-dependent changes in frequency and proliferation of hematopoietic stem cells during aging: correlation between lifespan and cycling activity. *Blood* 89:11543-1550.

Hallek M. (1995). Tyrosine kinases and phosphatases in hematopoietic growth factor signaling. In: *Hematopoietic growth factors in clinical applications*. Roland Mertelsmann and Friedhelm Herrmann (eds). (New York: Marcel Dekker, Inc.), pp.19-48.

Hammer, S.M., Gillis, J.M., Pinkston, P., and Rose, R.M. (1990). Effect of zidovudine and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on human immunodeficiency virus replication in alveolar macrophages. *Blood* 75, 1215-1219.

Hara T and Miyajima A. (1995). The IL-3, GM-CSF, IL-5 receptor family. In: *Hematopoietic growth factors in clinical applications*. Roland Mertelsman and Friedhelm Herrmann (eds). (New York:Marcel Dekker, Inc.), pp.1-17.

Hara T, Miyajima A. (1992). Two distinct functional high affinity receptors for mouse IL-3. *EMBO J* 10:126-134.

Hara T and Miyajima A. (1996). Function and signal transduction mediated by the Interleukin 3 receptor system in hematopoiesis. *Stem Cells* 14:605-618.

Hass R, Ho AD, Bredthauer U, Cayeux S, Egerer G, Knauf W, and Hunstein W. (1990). Successful autologous transplantation of blood stem cells mobilized with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Exp Hematol* 18:94-98.

Hercus, T.R., Cambareri, B., Dottore, M., Woodcock, J., Bagley, C.J., Vadas, M.A., Shannon, M.F., and Lopez, A.F. (1994). Identification of residues in the first and fourth helices of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor involved in biologic activity and in binding to the α - and β - chains of its receptor. *Blood* 83:3500-3508.

Heyworth CM, Vallance SJ, Whetton AD and Dexter TM. (1990). The biochemistry and biology of the myeloid haemopoietic cell growth factors. *J Cell Sci Suppl* 13:57-74.

Hill A.D.K., Naama H.A., Calvano S. E., and Daly J.M (1995). The effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on myeloid cells and its clinical applications. *J Leukoc Biol* 58:634-642.

Horiguchi, J., Warren, M.K., and Kufe, D. (1987). Expression of the macrophage-specific colony-stimulating factor in human monocytes treated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 69:1259-1261.

Hueber, K., Osobe, M., Croce, C.M., Golde, D.W., Kaufman, S.E., and Gasson, J.C. (1985). The human gene encoding GM-CSF is at 5q21-q32, the chromosome region deleted in the 5q- anomaly. *Science* 230:1282-1285.

Ichikawa Y, Pluznik DH, and Sachs L. (1966). In vitro control of the development of macrophage and granulocyte colonies. *Genetics* 56:488-495.

Ihle JN and Kerr IM. (1995). Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *TIG* 11:69-74.

Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, and Silvennoinen O. (1995). Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* 13:369-398.

Ikuta K, Uchida N, Friedman J, and Weissman IL. (1992). Lymphocyte development from stem cells. *Annu Rev Immunol* 10:759-783.

Jacobsen SEW, Ruscetti FW, Okkenhaug C, Lien E, Ortiz M, Veiby OP and Keller JR. (1994). Distinct and direct synergistic effects of IL-1 and IL-6 on proliferation and differentiation of primitive murine hematopoietic progenitor cells in vitro. *Exp Hematol* 22:1064-1069.

Jandl JH. (1991). *Blood: Pathophysiology*. Blackwell Scientific Publications, USA. p.524.

Jones RJ, Wagner JE, Celano P, Zicha MS, and Sharkis SJ. (1990). Separation of pluripotent haematopoietic stem cells from spleen colony-forming cells. *Nature* 347:188-189.

Jones -Villeneuve E and Phillips RA (1980). Potentials for lymphoid differentiation by cells from long-term cultures of bone marrow. *Exp Hematol* 8: 65-76

Jordan CT and Lemischka IR. (1990). Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes Dev* 4:220-232.

Kataoba M, Tavassoli M (1985). Identification of lectin-like substances recognizing galactosyl residues of glycoconjugates on the plasma membrane of sinus endothelium. *Blood* 65:1163-1171.

Kittler ELW, and Quesenberry PJ. (1993). Stromal cells and clinical implications. In: The hematopoietic microenvironment. Michael W Long, Max S Wicha (eds). (Baltimore: The Johns Hopkins University Press), pp. 49-75.

Landsdorp PM. (1995). Developmental changes in the function of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 23:187-191.

Lange W, Brugger W, Rosenthal FM, Kanz L, Lindemann A. (1992). The role of cytokines in oncology. In: Concise reviews in clinical and experimental haematology. MJ Murphy (ed) (Ohio: Alpha Med Press), pp.13-26.

Lawler J. (1986). The structural and functional properties of trombospondin. *Blood* 67:1197-1209.

Leary AG, Ogawa M, Strauss LC, and Civin CI. (1984). Single cell origin of multilineage colonies in culture. *J Clin Invest* 74:2193-2197.

Leary AG, Strauss LC, Civin CI, and Ogawa M. (1985). Disparate differentiation in hemopoietic colonies derived from human paired progenitors. *Blood* 66: 327-332.

Lewinsohn DM, Nagler A, Ginzton N, Greenberg P, Butcher EC. (1990). Hematopoietic progenitor cell expression of the H-CAM (CD44) homing-associated adhesion molecule. *Blood* 75:589-595.

Li CY, Lam KW, Yam LT. (1973). Esterases in human leukocytes. *J Histochem Cytochem* 21:1.

Li CY, Yam LT, Crosby WH. (1972). Histochemical characterization of cellular and structural elements of the human spleen. *J Histochem Cytochem* 20:1049-1058.

Lichtman MA, (1981). The ultrastructure of the hemopoietic environment of the marrow: a review. *Exp Hematol* 9:391-410.

Lichtman MA, Packman CH, Constine LS. (1989). Molecular and cellular traffic across the marrow sinuses. In: Handbook of the hemopoietic microenvironment. M Tavassoli (ed) (New York: Humana Press), pp. 87-140.

Lieschke GJ., Grail D, Hoddgson G, Metcalf D Stanley E, Cheers C, Fowler KJ, basu S, Zhan YF, and Dunn AR (1994). Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 84:1737-1746.

Lieschke, G.J., and Burgess, A.W. (1992). Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (second of two parts). In Drug therapy, A. J. J. Wood, ed. *N Engl J Med* 327:99-106.

Liles WC and VanVoorhis EC (1995). Review: nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. *J Infect Dis* 172:1573-1580.

Long MW. (1993). Blood cell cytoadhesion molecules. In: *The hematopoietic microenvironment. The functional and structural basis of blood cell development.* Michael W Long and Max S Wicha (eds). (Baltimore MA: The Johns Hopkins University Press), pp.21-48.

Lopez, A.F., Nicola N.A., Burgess, A.W., Metcalf, D., Battye, F.L., Sewell, W.A., and Vadas, M.A. (1983). Activation of granulocyte cytotoxic function by purified mouse colony-stimulating factors. *J Immunol* 131:2983-2988.

Lopez, A.F., Shannon, M.F., Hercus, T., Nicola, N.A., Cambareri, B., Dottore, M., Layton, M.J., Eglinton, L., and Vadas, M.A. (1992). Residue 21 of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is critical for biological activity and for high but not low affinity binding. *EMBO J* 11: 909-916.

Lopez, A.F., Williamson, J., Gamble, J.R., Begley C.G., Harlan, J.M., Klabanoff, S.J., Waltersdorff, A., Wong, G., Clark, S.C., and Vadas, M.A. (1986). Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates in vitro mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression and survival. *J Clin Invest* 78:1220-1228.

Lord BI, Bronchud MH, Owens S, Chang J, Howell A, Souza L, and Dexter TM. (1989). The kinetics of human granulopoiesis following treatment with granulocyte colony stimulating factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9499-9503.

Lord BI, Gurney H, Chang J, Thatcher N, Crowther D and Dexter TM. (1992). Haemopoietic cell kinetics in human treated with rGM-CSF. *Int J Cancer* 50:26-31.

Lowry PA, and Quesenberry PJ. (1992). Overview of haematopoiesis. In: *Haematopoietic Growth Factors: from the basic to clinical applications.* S. Symann, PJ. Quesenberry and G. Morstyn (eds). (United Kingdom: Gardiner-Caldwell Communications LTD), pp:9-15.

Magli MC, Iscove NN and Odartchenko N. (1982). Transient nature of early haematopoietic spleen colonies. *Nature* 295:527-529.

Marill ERM. (1990). Técnicas citoquímicas . En: *Técnicas en citología hematológica.* S Woessner (de). (Barcelona: Ediciones Medici): pp:78-84.

Mauch P, Ferrara J, and Hellman S. (1989). Stem cell self renewal considerations in bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplan* 4:601-607.

Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorck A. (1992). Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haematol* 49:225-233.

Mayani H, and Lansdorp PM. (1995). Proliferation of individual hematopoietic progenitors purified from umbilical cord blood. *Exp Hematol* 23:1453-1462.

McColl SR, Beauseigle D, Gilbert C, and Naccache PH. (1990). Priming of the human neutrophil respiratory burst by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor- involves regulation of a post-cell surface receptor level. *J Immunol* 145:3047-3053.

McKinstry WJ, Li CHL, Rasko JEJ, Nicola NA, Johnson GR, and Metcalf D. (1997). Cytokine receptor expression on hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 89:65-71.

McNiece IK, Robinson BE, Quesenberry PJ. (1988). Stimulation of murine colony-forming cells with high proliferative potential by the combination of GM-CSF and CSF-1. *Blood* 72:191-195.

Meager A. (1991). Haemopoietic growth factors. In: *Cytokines*. Anthony Meager (ed). (New Jersey: Prentice Hall Advanced Reference Series), pp.65-104.

Mendoza JF, Cáceres JR, santiago E, Mora LM, Sánchez L, Corona TM, Machuca C, Zambrano IR, Martínez RD, and Weiss-Steider B. (1990). Evidence that G-CSF is a fibroblast growth factor that induces granulocytes to increase phagocytosis and to present a mature morphology, and that macrophages secrete 45-kd molecules with G-CSF-like activity. *Exp Hematol* 18:903-910.

Meropol, N.J., Altmann, S.W., Shanafelt, A.B., Kastelein, R.A., Johnson, G.D., and Prystowsky, M.B. (1992). Requirement of hydrophilic amino-terminal residues for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor bioactivity and receptor binding. *J Biol Chem* 267:14266.

Metcalf D and Burgess AW. (1982). Clonal analysis of progenitor cell commitment to granulocyte or macrophage production. *J Cell Physiol* 111:275-283.

Metcalf D, and Moore MAS. (1971). *Haematopoietic cells*. *Frontiers of Biology*. Vol. 24. North Holland Publishing Company, Amsterdam.

Metcalf D. (1977). *Hemopoietic colonies. In vitro cloning of normal and leukemic cells*. Berlin:Springer-Verlang.

Metcalf D. (1988). *The molecular control of blood cells*. Boston MA. Harvard University Press.

Metcalf, D. (1984). *The hemopoietic colony stimulating factors*. Amsterdam, Elsevier.

Metcalf, D. (1987). The molecular control of normal and leukemic granulocytes and macrophages. *Proc R Soc Lond[Biol]* 230:389-423.

Metcalf, D. (1993). Hematopoietic regulators: Redundancy or subtlety?. *Blood* 82:3515-3523.

Metcalf, D. (1989). Actions and interactions of G-CSF, LIF, and IL-6 on normal and leukemic murine cells. *Leukemia* 5:349-355.

Metcalf, D., and Merchav, S. (1982). Effects of GM-CSF deprivation on precursors of granulocytes and macrophage production. *J Cell Physiol* 112:411-418.

Metcalf, D., Burgess, A.W., Johson, G.R., Nicola, N.A., Nice, E.C., DeLamarter, J., Thatcher, D.R., and Mermod, J-J. (1986). In vitro actions on hemopoietic cells of recombinant murine GM-CSF purified after production in E.coli: Comparison with purified native GM-CSF. *J Cell Physiol* 128: 421-431.

Migliaccio, A.R., Bruno, M., and Migliaccio, G. (1987). Evidence for direct action of human biosynthetic human (recombinant) GM-CSF on erythroid progenitors in serum-free culture. *Blood* 70: 1867-1871.

Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, and Arai k. (1992). Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol* 10:295-331.

Miyajima A, Mui A L-F, Ogorochi T, and Sakamaki K. (1993). Receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, Interleukin-3, and Interleukin-5. *Blood* 82:1960-1974

Miyatake, S., Otsuka, T., Yokota, T., Lee, F., and Arai, K. (1985). Structures of chromosomal gene for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Comparison of the mouse and human genes. *EMBO J.* 4: 2561-2568.

Moezzi J, Ali-Osman F, Murphy MJ. (1986). Rapid methodd for permanent slide preparation of colonies in soft agar cultures. *int J Cell Cloning* 4:368-374.

Molineux G, Schofield R, and Testa NG. (1986). Development of spleen CFU-S colonies from day 8 to day 11: relationship to self-renewal capacity. *Exp Hematol* 14:710-713.

Moore MAS. (1991). Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. *Blood* 78:1-19.

Moreno RJ. (1996). Respuesta inmune y mecanismos de autoinmunidad. UTEHA, Noriega editores, México. pp. 112.

Morrison SJ, Uchida N, and Weissman IL. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11:35-71.

Morrison SJ, Wright DE, Cheshier SH, and Weissman IL. (1997). Hematopoietic stem cells: challenges to expectations. *Curr Opin Immunol* 9:216-221.

Morstyn G and Burgess AW. (1988). Hemopoietic growth factors. *Cancer Res* 48:5624-5637.

Mui AL-F and Miyajima A. (1994). Interleukin-3 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor receptor signal transduction. *PSEBM* 206:284-288.

Nakahata T, and Ogawa M. (1982). Clonal origin of murine hemopoietic colonies with apparent restriction to granulocyte-macrophage-megakaryocyte (GMM) differentiation. *J Cell Physiol* 111:239-246.

Nagata S. (1989). Gene structure and function of granulocyte colony-stimulating factor. *BioEssays* 10:113-117.

Nand, S., Bayer, R., Prinz, R.A., Felten, W., and Godwin, J.E. (1991). Granulocytic-macrophage colony-stimulating factor for the treatment of drug induced agranulocytosis. *A J Hematol* 37:267-269.

Nemunaitis, J., Rabinowe, S.N., Singer, J.W., Bierman, P.J., Vose, J.M., Freedman, A.S., Onetto, N., Gilles, S., Oette, D., Golde, M., Buckner, C.P., Hansen, J.A., Ritz, J., Appelbaum, F.R., Armitage, J.O., and Nadler, L.M. (1991). Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after autologous bone marrow transplantation for lymphoid cancer. *N Engl J Med* 324:1773-1778.

Nicola NA. (1989). Hemopoietic cell growth factors and their receptors. *Annu Rev Biochem* 58:45-77.

Nicola, N.A., Burgess, A.W., and Metcalf, D. (1979). Similar molecular properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factors produced by different mouse organs in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 254:5290-5299.

Nienhuis, A.W., Donahue, R.E., Karlsson, S., Clark, S.C., Agricola, B., Antinoff, N., Pierce, J.E., Turner, P., Anderson, W.F., and Nathan, D.G. (1987). Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) shortens the period of neutropenia after autologous bone marrow transplantation in a primate model. *J Clin Invest* 80:573-577.

Nimer, S.D., and Golde, D.W. (1987). The 5q- abnormality. *Blood* 70: 1705-1712.

Nishinakamura R, Miyajima A, Mee PJ, Tybulewicz VLJ, and Murray R. (1996). Hematopoiesis in mice lacking the entire granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin-3/interleukin-5 functions. *Blood* 88:2458-2464.

Niskanen E. (1992). Characteristics of primitive hematopoietic stem cells. In: *Haematopoietic Growth factors: from the basic to clinical applications*. M Symann, PJ Quesenberry, G Morstyn (eds). (United kingdom: Caldwell Communications LTD), pp.17-25.

Nordan RP, Pumphrey JG, Rudikoff S. (1987). Purification and NH₂-terminal sequence of a plasmacytoma growth factor derived from the murine macrophage cell line P388D1. *J Immunol* 139:813-817.

Ogawa, M. (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81: 2844-2853.

Orlic D and Bodine DM. (1994). What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up! *Blood* 84:3991-3994.

Oster W, Mertelsmann R, Herrmann F. (1995). Modulation of cell function by colony-stimulating factors for granulocytes and granulocytes/macrophages. In: Hematopoietic growth factors in clinical applications. Roland Mertelsmann and Friedhelm Herrmann (eds). (New York: Marcel Dekker, Inc), pp.85-98.

Oster, W. (1990). Regulation of cell function by hematopoietic growth factors. In hematopoietic growth factors in clinical applications, R. Mertelsmann, F. Herrmann, eds. (New York: Marcel Dekker, Inc.), pp. 25-39.

Panterne B, Zhou Y-Q, Hatzfeld J, Li M-L, Levesque J-P, Clark SC, and Hatzfeld A. (1993). CSF-1 control of c-fms expression in normal human bone marrow progenitors. *J Cell Physiol* 155:282-289.

Pierce JH. (1989). Oncogenes, growth factors and hematopoietic cell transformation. *Biochim Biophys Acta* 989:179-208.

Pluznik DH, and Sachs L. (1965). The cloning of normal 'mast' cells in tissue culture. *J Cell Comp Physiol* 66:319-324.

Pluznik DH, and Sachs L. (1966). The induction of clones of normal "mast" cells by a substance from conditioned medium. *Exp Cell Res* 43:553-563.

Politis C, Karamerou A, Block M. (1983). Pathophysiologic aspects of the bone/marrow/fat relationship. *Lab Management* 21:40-55.

Quentmeier H, Zaborski M, Drexler HG. (1997). The human bladder carcinoma cell line 5637 constitutively secretes functional cytokines. *Leu Res* 21:343-350.

Rapoport AP, Abboud CN, and DiPersio JF. (1992). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): receptor biology, signal transduction, and neutrophil activation. *Blood Rev* 6:43-57.

Ratcliffe DR, Nolin SL, and Cramer EB. (1988). Neutrophil interaction with influenza-infected epithelial cells. *Blood* 72:142-149.

Richter, J., Andersson, T., and Olsson, I. (1989). Effect of tumor necrosis factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on neutrophil degranulation. *J Immunol* 142: 3199-3205.

Roberts R, Gallagher J, Spooncer E, Allen TD, Bloomfield F and Dexter TM. (1988). Heparan sulphate bound growth factors: A mechanism for stromal cell-mediated haemopoiesis. *Nature* 332:376-378.

Robinson BE, McGrath HE, and Quesenberry PJ. (1987). Recombinant murine granulocyte macrophage colony-stimulating factor has megakaryocyte colony-stimulating by interleukin-3. *J Clin Invest* 79:1648-1652.

Roilides, E., Mertins, S., Eddy, J., Walsh, T. J., Pizzo, P.A., and Rubin, M. (1990). Impairment of neutrophils chemotactic and bactericidal function in children infected with human immunodeficiency virus type 1 and partial reversal after in vitro exposure to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Pediatrics* 117, 531-540.

Roit IM. (1991). *Essential Immunology*. Seventh edition., Blackwell Scientific Publications. Oxford, CA. USA. pp.356.

Roussel MF. (1994). Signal transduction by the macrophage colony stimulating receptor (CSF-1R). *J Cell Sci Suppl* 18:105-108.

Ruef, C., and Coleman, D.L. (1990). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Pleiotropic cytokine with potential clinical usefulness. *Rev Infec Diseases* 12: 41-62.

Sachs L, and Lotem J. (1994). The network of hematopoietic cytokines. *PSEBM* 206:170-175.

Sachs L. (1996). The control of hematopoiesis and leukemia: from basic biology to the clinic. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4742-4749.

Santiago OE, Mora L, Soto I, Montesinos JJ, Ventura JL, Machuca C, Mendoza JF, Flores F, Hernández J and Weiss-Steider. (1994). Neutrophils produce M-CSF with proliferative activity on mouse bone marrow cells and fibroblasts. *Rev Inv Clínica. Suplemento*. pp 253.

Santoli, D., Clark, S.C., Kreider, B.L., Maslin, P.A., and Rovera, G. (1988). Amplification of IL-2-driven T cell proliferation by recombinant human IL-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 141, 519-526.

Sato N and Miyajima A. (1994). Multimeric cytokine receptors: common versus specific functions. *Curr Opin Cell Biol* 6:174-179.

Scarffe, J.H. (1991). Emerging Clinical Uses for GM-CSF. *Eur J Cancer* 27:1493-1504.

Schindler R, Dinarello CA. (1990). Interleukin 1. In: *Growth factors, differentiation factors, and cytokines*. A Habenicht (ed). (Berlin-Springer-Verlag), pp.85-102.

Schofield R, and Dexter TM. (1985). Studies on the self-renewal ability of CFU-S which have been serially transferred in long-term culture or in vivo. *Leukemia Res* 9:305-313.

Schrader JW. (1992). Biological effects of myeloid growth factors. *Baillière's Clin Haematol* 5:509-531.

Seiff CA. (1991). New hats for hematopoietic hormones. *Exp Hematol* 19:857-860.

Shanafelt, A.B., and Kastelein, R.A. (1992). High affinity ligand binding is not essential for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor activation. *J Biol Chem* 267: 25466-2473.

Shanafelt, A.B., Johnson, K.E., and Kastelein, R.A. (1991a). Identification of critical amino acid residues in human and mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and their involvement in species specificity. *J Biol Chem* 266: 13804-13811.

Shanafelt, A.B., Miyajima, A., Kitamura, T., and Kastelein, R.A. (1991b). The amino-terminal helix of GM-CSF and IL-5 governs high affinity binding to their receptors. *EMBO J* 10: 4105-4110.

Shannon MF, coles LS, Vadas MA, and Cockerill PN. (1997). signals for activation of the GM-CSF promoter and enhancer in T cells. *Critic Rev Immunol* 17:301-323.

Silberstein, D.S., Owen, W.F., Gasson, J.C., DiPersio, J.F., Golde, D.W., Bina, J.C., Soberman, R., Austen, K.F., and David, J.R. (1986). Enhancement of human eosinophil cytotoxicity and leukotriene synthesis by biosynthetic (recombinant) granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 137: 3290-3294.

Siminovitch L, McCulloch EA and Till JE. (1963). The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol* 62:327-336.

Smith JA. (1994). Neutrophil, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 56:672-686.

Smith, R.J., Justen, J.M., and Sam, L.M. (1990). Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces granule exocytosis from human polymorphonuclear neutrophils. *Inflammation* 14:83-92.

Smith A, Metcalf D and Nicola NA. (1977). Cytoplasmic domains of the common b-chain of the GM-CSF/IL-3/IL-5 receptors that are required for inducing differentiation or clonal suppression in myeloid leukaemic cell lines. *EMBO J* 16:451-464.

Socinski MA, Elias A, Schnipper L, Cannistra SA, Antman KH, and Griffin JD. (1988). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet* 1:1194-1198.

Sonada, Y, Yang, Y-C., Wong, G.G., Clark, S.C., and Ogawa, M. (1988). Analysis in serum-free culture of the targets of recombinant human hemopoietic growth factors: Interleukin 3 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor are specific for early developmental stages. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4360-4364.

Sorrel JM. (1988). Ultrastructural localization of fibronectin in bone marrow of the embryonic chick and its relationship to granulopoiesis. *Cell Tissue Res* 252:565-571.

Spangrude GJ, Brooks DM, Tumas DB. (1995). Long-term repopulation of irradiated mice with limiting numbers of purified hematopoietic stem cells: in vivo expansion of stem cell phenotype but not function. *Blood* 85:1006-1016.

Spangrude GJ. (1989). Enrichment of murine haemopoietic stem cells: diverging roads. *Immunol Today* 10:344-347.

Spangrude GJ. (1994). Biological and clinical aspects of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Med* 45:93-104.

Sparrow, L.G., Metcalf, D., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., and Burgess, A.W. (1985). Purification and partial amino acid sequence of asialo murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 292-296.

Stanley E, Lieschke GJ, Grail D, Metcalf D, Hodgson G, Gall JAM, Maher DW, Cebon J, Sinickas V, and Dunn AR. (1994). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5592-5596.

Sun T, Li CY, Yam LT. (1985). Atlas of cytochemistry and immunochemistry of hematologic neoplasms. ASCP Press, Chicago, IL, USA.

Suda T, Suda J, and Ogawa M. (1983). Single-cell origin of mouse hemopoietic colonies expressing multiple lineages in variable combinations. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:6689-6693.

Suda J, Suda T, and Ogawa M. (1984). Analysis of differentiation of mouse hemopoietic stem cells in culture by sequential replating of paired progenitors. *Blood* 64:393-399.

Tavassoli M. (1991). Embryonic and fetal hemopoiesis: An overview. *Blood Cells* 13:269-281.

Takahashi GW, Andrews III DF, Lilly MB, Singer JW, and Alderson MR. (1993). Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on interleukin-8 production by human neutrophils and monocytes. *Blood* 81:357-364.

Testa NG, Coutinho LH, Chang J, and Dexter M. (1993). The biology and use of long-term human bone marrow cultures. In: *The hematopoietic microenvironment*. Michael W Long, Max S Wicha (eds). (Baltimore: The Johns Hopkins University Press), pp. 266-282.

Testa NG. (1985). Clonal assays for haematopoietic and lymphoid cells in vitro. In: *Cell clones: Manual of mammalian cell techniques*. CS Potten & JH Hendry (eds). (Edinburg: Churchill Livingstone), pp. 27-43.

Thèze J. (1994). Cytokine receptors: a combinative family of molecules. *Eur Cytokine Netw* 5:353-368.

Till JE and McCulloch EA. (1980). Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochem Biophys Acta* 605:431-459.

Till JE, and McCulloch EA. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14:213-246.

Tomonaga, M., Golde, D.W., and Gasson, J.C. (1986) Biosynthetic recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Effect on normal bone marrow and leukemia cell lines. *Blood* 67: 31-36.

Trentin JJ. (1970). Influence of hemopoietic organ stroma (hematopoietic inductive microenvironments) on stem cell differentiation. In: Regulation of hematopoiesis. AS Gordon (ed). (New York: Appleton-Century-Crofts), p.161-185.

Ulrich A, and Schlessinger J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61:203-212.

Vadas, M.A., Nicola, N.A., and Metcalf, D. (1983a). Activation of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of human neutrophils and eosinophils by separate colony-stimulating factors. *J Immunol* 130: 795-799.

Vadas, M.A., Varigos, G., Nicola, N., Picus, S., Dessein, A., Metcalf, D., and Batty, F.L. (1983b). Eosinophil activation by colony-stimulating factor in man: metabolic effects and analysis by flow cytometry. *Blood* 61:1232-1241.

Van der Geer P, and Hunter T. (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 10:251-337.

Van Furth R. (1993). Cell biology of molecular phagocytes. In: Hemopoietic growth factors and molecular phagocytes. R van Furth (ed). (Basel: Karger), p.1-9.

VanZant G, and Goldwasser E. (1979). Competition between erythropoietin and colony stimulating factor for cells in mouse marrow. *Blood* 53:946-965.

Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM. (1994). Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9857-9860.

Verhoff, G., and Boogaerts, M. (1991). In vivo administration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances neutrophil function in patients with myelodysplastic syndromes. *Bristh J Hematol* 79: 177-184.

Visser JWM and Van Bekkun DW. (1990). Purification of pluripotent hemopoietic stem cells past and present. *Exp Hematol* 18:248-256.

Vuillet-Gaugler MH, Breton-Gorius J, Vainchenker W, Guichard J, Leroy C, Tchernia G, Coulombel L. (1990). Loss of attachment to fibronectin with terminal erythroid differentiation. *Blood* 75: 865-873.

Wakefield L. (1990). Growth Factors: An Overview. Hormonal communicating events in the test 70:181-190.

Weisbart, R.H., Golde, D.W., Clark, S.C., Wong, G.G., Gasson, J.C. (1985). Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a neutrophil activator. *Nature* 314: 361-363.

Weiss L. (1976). The hematopoietic microenvironment of the marrow: an ultrastructural study of the stroma in rats. *Anat Rec* 186: 161-184.

Westwick J, Li SW, and Camp RD. (1989). Novel neutrophil-stimulating peptides. *Immunol Today* 10:146-147.

Whetton AD, and Dexter TM. (1989). Myeloid haemopoietic growth factors. *Biochim Biophys Acta* 989:111-132.

Whetton AD, and Dexter TM. (1993). Influence of growth factors and substrates on differentiation of haematopoietic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 5:1044-1049.

Whitlock CA, and Witte ON. (1982). Long-term culture of B lymphocytes and their precursors from murine bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:3608-3612.

Whitlock CA, Robertson D, and Witte ON. (1984). Murine B cell lymphopoiesis in long-term culture. *J Immunol Method* 67:353-369.

Wong A, and Sakamoto KM. (1995). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces the transcriptional activation of *egr-1* through a protein kinase a-independent signaling pathway. *J Biol Chem* 270:30271-30273.

Wong, G.G., Witek, J.S., Temple, P.A., Wilkens, K.M., Leary, A.G., Luxenberg, D.P., Jones, S.S., Brown, E.L., Kay, R.M., Orr, E.C., Shoemaker, C., Golde, D.W., Kaufman, R.J., Hewick, R.M., Wang, E.A., and Clark, S.C. (1985a). Human GM-CSF: Molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. *Science* 228: 810-815.

Wong, G.G., Witek, J.S., Temple, P.A., Wilkens, K.M., Leary, A.G., Luxenberg, D.P., Jones, S.S., Brown, E.L., Hewick, R.M., Clark, S.C., and Wang, E.A. (1985b). Molecular cloning of human and gibbon T-cell-derived GM-CSF cDNA and purification of the natural and recombinant human proteins. In *Cancer Cells*, J. Feramisco, B. Ozanne, and C. Stiles, eds. (New York: Cold Spring Harbor), pp. 235-242.

Wright EG and Lord BI. (1992). Haemopoietic tissue. *Baillière's Clin Haematol* 5:499-507.

Wynter E, Allen T, Coutinho L, Flavell D, Flavell SU, and Dexter TM. (1993). Localisation of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human long-term bone marrow cultures. Biological and immunocytochemical characterisation. *J Cell Science* 106:761-769.

Yang, Y-C., Kovacic, S., Kriz, R., Wolf, S., Clark, S.C., Wellems, T.E., Nienhuis, A., and Epstein, N. (1988). The human genes for GM-CSF and IL-3 are closely linked in tandem on chromosome 5. *Blood* 71: 958-961.

Yarden Y, Kuang W-J, Yang-Feng, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Franke U, Ullrich A. (1987). Human proto-oncogene *c-kit*: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 6:3341-3351.

Yoder MC, and Williams DA. (1995). Matrix molecule interactions with hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 23:961-967.

Yurchenco PD, Schittny JC. (1990). Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J* 4:1577-1590.

Zambrano IR, Caceres JR, Mendoza JF, Santiago E, Mora LM, Morales MG, Corona MT, and Weiss-Steider B. (1989a). Evidences that fibroblasts and epithelial cells produce a specific type of macrophage and granulocyte inducer, also know as colony-stimulating factor, and that monocyte-macrophages can produce another factor with proliferative inducing activity on myeloid cells and differentiative activity on macrophages. *Ann N Y Acad Sci* 554:141-155.

Zambrano IR, Mendoza JF, Cáceres JR, Santiago O, Mora LM, Marin TNJ, and Weiss-Steider B. (1989b). Evidence that the macrophage-granulocyte inducer (MGI) is produced during cell proliferation, stored in G0, released in G1, cell specific, and induces the secretion of other colony-stimulating activities (CSA). *Exp Hematol* 17:267-272.

Zimmerli, W., Zarth, A., Gratwohl, A., Nissen, C., and Speck, B. (1989). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for granulocyte defects of bone marrow transplant patients. *Lancet* 1: 494-495.

Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. (1992). Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol Today* 13:93-100.

Zuckerman KS, Prince CW, Gay S. (1989). The hemopoietic extracellular matrix. In: *Handbook of the hemopoietic microenvironment*. M Tavassoli (de). (New York: Humana Press), pp. 399-432.

Zuckerman KS, Wicha MS. (1983). Extracellular matrix production by the adherent cells of long-term murine bone marrow cultures. *Blood* 61:540-547.

APENDICE A

TECNICA DE TINCION ALFA-NAFTIL ACETATO ESTERASA

La técnica de identificación de esterases con alfa-naftil acetato, se utilizó para identificar a células del linaje monocito-macrófago.

REACTIVOS.

1 - Alfa-Naftil Acetato.

2.- Solución fijadora

- | | |
|------------------------------|---------|
| a) disolver acetato de sodio | 60 mg |
| b) en acetona | 60 ml |
| c) agregar agua destilada | 40 ml |
| d) agregar ácido acético | 0.07 ml |
- Refrigérese (4-6 °C), estable por más de dos meses.

3.- Solución de pararosanilina:

- | | |
|----------------------------|-------|
| a) disolver pararosanilina | 1 g |
| b) en solución de HCl 2N | 25 ml |

Disolver en caliente, filtrar cuando esté a temperatura ambiente, estable por dos meses.

4.- Solución de nitrito de sodio:

- | | |
|------------------------------|-------|
| a) disolver nitrito de sodio | 1 g |
| b) en agua destilada | 25 ml |

Refrigérese (4-6 °C) durante 7 días. Preparar nueva al término de este periodo.

5 - Solución de fosfatos 0.2 M con pH:7.0 a 7.1

- a) Sol. A: 11.9 g de NaH_2PO_4 monohidratado (fosfato de sodio ácido) en 500 ml de agua destilada.
b) Sol. B. 14.1965 g de Na_2HPO_4 (fosfato de sodio dibásico) en 500 ml de agua destilada.

Mezclar 250 ml de Sol. B con 130 ml de Sol. A. Adecuar el pH entre 7.0 a 7.1, estable por varios meses (4-6 °C).

6.- Hematoxilina de Meyer:

Solución preparada comercialmente (Sigma, USA).

7.- Acetona (pura).

8.- Suero fisiológico (NaCl al 0.9%).

PROCEDIMIENTO

1.- Fijación de los extendidos en solución fijadora durante 1 min.

2.- Lavar con suero fisiológico (dejar secar).

3.- Se incuba durante 60 min en la siguiente solución:

a) 1 gota de sol. de nitrito de sodio (0.05 ml) y 1 gota de sol. de pararosanilina (0.05 ml). Las dos soluciones se mezclan durante 1 minuto.

Se agrega 5 ml de solución de fosfatos 0.2 M pH 7.0 a 7.1.

b) diluir 10 mg de alfa-naftil acetato en 0.2 a 0.3 ml de acetona, después agregar agitando 20 ml de solución de fosfatos pH 7.0 a 7.1.

c) Mezclar las soluciones a y b, y filtrar.

4 - Lavar con agua destilada.

5.- Teñir 10-30 min con hematoxilina de Meyer, lavar abundantemente con agua destilada.

6 - Dejar secar

APENDICE B

TECNICA DE TINCION CLOROACETATO ESTERASA.

Esta técnica generalmente es utilizada para identificar específicamente al granulocito-neutrófilo.

REACTIVOS

1 - Naftol AS-D cloroacetato

- a) disolver naftol AS-D cloroacetato 5 mg
- b) en N-N, dimetil formamida 2.5 ml

Almacenar a 4 °C, estable por dos meses.

2 - Solución fijadora

- a) disolver en agua destilada 30 ml
- b) Na_2HPO_4 20 mg
- c) KH_2PO_4 0.1 g
- d) agregar acetona 45 ml
- e) formaldehído 40% 25 ml
- f) ajustar pH a 6.6

Refrigérese a 4 °C, estable por más de dos meses.

3.- Solución de fuccina nueva

- a) disolver fuccina nueva 1 g
- b) en solución de HCl 2N 25 ml

Disolver en caliente, filtrar cuando este a temperatura ambiente, estable por dos meses.

4 - Solución de nitrito de sodio al 4%

- a) disolver nitrito de sodio 1 g
- b) en agua destilada 25 ml

Refrigérese a 4 °C durante 7 días, preparar nueva al término de este tiempo.

5 - Solución de fosfatos pH 7.73.

- a) disolver Na_2HPO_4 0.852 g
- b) y KH_2PO_4 0.09 g
- c) en agua destilada 100 ml

6.- Hematoxilina de Meyer.

Solución preparada comercialmente (Sigma, USA).

PROCEDIMIENTO

1 - Fijación de los extendidos con solución fijadora durante 30 segundos.

2.- Lavar con suero fisiológico y dejar secar.

3.- Se incuba durante 30 min en la siguiente solución:

a) 1 gota de sol. de nitrito de sodio (0.05ml) y 1 gota de sol. fuccina nueva (0.05 ml). Las dos soluciones se mezclan durante 1 min antes de usarse.

b) agregar 9.5 ml de solución de fosfatos pH 7.73.

c) agregar sol. naftol AS-D cloroacetato 0.5 ml.

NO FILTRAR

4 - Lavar con agua destilada.

5.- Contrateñir con hematoxilina de Meyer 10-30 min.

6.- Lavar abundantemente con agua destilada.

7 - Dejar secar.

APENDICE C

TECNICA DE ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay).

REACTIVOS

1 - Solución amortiguadora de carbonatos (SAC) 1 M pH: 9.5.

Na ₂ CO ₃	7.0 g
NaHCO ₃	2.8 g
agua destilada	1000 ml

2.- Solución amortiguadora de fosfatos (SAF) pH:7.4 (NaCl 0.15 M, fosfatos 0.01 M).

NaCl	8.77 g
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	2.70 g (1.4 g anhidro)
NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O	0.4 g
agua destilada	1000 ml

3.- Tween al 0.1 % en SAF

Tween 20	1 ml
SAF	999 ml

4.- Solución de bloqueo (albúmina al 2 %)

Albúmina	2.0 g
SAF	100 ml

5.- Solución amortiguadora de citratos (SACr), pH:5.6.

Citrato de sodio	29.0 g
Acido cítrico	4.1 g
agua destilada	1000 ml

6.- Sustrato para peroxidasa (prepararse al momento y mantenerse en la obscuridad).

Orto-fenilendiamina (OPD)	0.006 g
Peróxido de hidrógeno al 3 %	10 µl
SACr	10 ml

7.- Acido sulfúrico 2.5 N.

PROCEDIMIENTO

1.- Introducir el antígeno a la inmunoplaaca diluido en SAC (100 µl). Incubar a 37 °C durante 1 h y toda la noche a 4 °C.

2.- Lavar con solución Tween-SAF 4 veces.

3.- Bloquear con SAF-albúmina incubando 1 h a 37 °C.

4.- Lavar con solución Tween-SAF 4 veces.

5.- Adicionar el primer anticuerpo diluido en SAF-albúmina (100 µl/pozo), incubar 1.5 hr. a 37 °C.

6.- Lavar con solución Tween-SAF 4 veces.

7.- Adicionar el conjugado o segundo anticuerpo (anticuerpo-enzima) en la dilución adecuada, incubar 1.5 hr. a 37 °C.

8.- Lavar con solución Tween-SAF 4 veces.

9.- Agregar el sustrato OPD (100 µl/pozo), y parar la reacción a los 10 min con 25 µl de H₂SO₄.

10.- Leer a 490 nm en espectro o lector de ELISA (Dynatech, USA).

ABREVIATURAS DE USO FRECUENTE

CFU.....	UNIDAD FORMADORA DE COLONIAS
CFU-S.....	UNIDAD FORMADORA DE COLONIAS DE BAZO
GM-CFC.....	CELULA FORMADORA DE COLONIAS DE GRANULOCITOS Y MACROFAGOS
CSF.....	FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS
GM-CSF.....	FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE GRANULOCITOS Y MACROFAGOS
G-CSF.....	FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE GRANULOCITOS
M-CSF.....	FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE MACROFAGOS
IL-1.....	INTERLEUCINA 1
IL-2.....	INTERLEUCINA 2
IL-3.....	INTERLEUCINA 3
IL-4.....	INTERLEUCINA 4
IL-5.....	INTERLEUCINA 5
IL-6.....	INTERLEUCINA 6
IL-8.....	INTERLEUCINA 8
ECGF.....	FACTOR DE CRECIMIENTO DE CELULAS EPIDERMALAS
TNF.....	FACTOR DE NECROSIS TUMORAL
INF- γ	INTERFERON GAMMA
SCF.....	FACTOR DE CELULAS TALLO
CR.....	RECEPTOR DE CITOCINAS
RTK.....	RECEPTOR TIROSINA CINASA
MEMD.....	MEDIO DE EAGLE MODIFICADO POR DULBECCO
rh.....	PROTEINA RECOMBINANTE HUMANA
rm.....	PROTEINA RECOMBINANTE DE RATON