

Interacción celular en la eritropoyesis

Benet Nomdedeu i Tobella

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Vigila, esperit, vigila
no perdís mai el teu nord,
no et deixis d'û a la tranquil la
aigua mansa de cap port

Joan Maragall

Excelsior 1895

A la meva esposa Carme

Als meus fills Meritxell i Jordi

Als meus pares

Als meus germans

Que el sacrifici de tots ells
tingui sentit

Al Profesor Ciril Rozman, amigo y maestro

Al Profesor Esmail D Zanjani, mi introductor
tor en la Hematología experimental, con afecto
to y agradecimiento

I N D I C E

1 M O T I V A C I O N

1 1 Motivación general	1
1 2 Motivación personal	3

2 R E V I S I O N D E L A B I B L I O G R A F I A

2 1 Stem cell pluripotente (CFU-S)	6
2 2 Mecanismos de inducción y regulación de la stem cell pluripotente	16
2 3 Cultivo "in vitro" de la stem cell pluripotente	28
2 4 Compartimiento eritropoyético	31
2 5 Aplicación de las técnicas de cultivo en medios semi-sólidos al estudio del compartimiento eritropoyético	37
2 6 Colony Forming Unit-Erythroid (CFU-E)	45
2 7 Burst Forming Unit-Erythroid (BFU-E)	53
2 8 Burst Promoting-Activity (BPA)	63

3 O B J E T I V O S

4 M A T E R I A L Y M E T O D O S

4 1 Descripción de la población estudiada	69
4 2 Bases técnicas para el cultivo	70
4 3 Bio-ensayo para la dosificación de eritropoyetina	85

4 4	Técnicas para la obtención de suspensiones de células mononucleares de sangre periférica	89
4 5	Técnicas para la separación de poblaciones linfocitarias humanas	109
4 6	Métodos estadísticos	117
5	R E S U L T A D O S	
5 1	Efecto modulador de los monocitos sobre la eritropoyesis "in vitro"	121
5.2	Efecto de las poblaciones linfocitarias T y B sobre la eritropoyesis "in vitro"	145
6	D I S C U S I O N	159
7	R E S U M E N Y C O N C L U S I O N E S	175
8	R E F E R E N C I A S B I B L I O G R A F I C A S	183

M O T I V A C I O N

=====

1 M O T I V A C I O N

1 1 MOTIVACION GENERAL

La eritropoyesis es el proceso fisiológico por el que la stem cell pluripotente se reproduce y diferencia hacia el compartimiento eritroblástico hasta alcanzar, tras una ordenada secuencia de estadios madurativos, su objetivo final la circulación sanguínea del hematíe. A grandes rasgos, los dos requerimientos más importantes para la realización de este proceso fisiológico en los mamíferos adultos son presencia de stem cells capaces de un amplio potencial de proliferación y diferenciación, así como regulación del proceso por la hormona eritropoyetina.

Sin embargo, el avance en el conocimiento de la fisiología de la eritropoyesis por el desarrollo de técnicas experimentales "in vivo" e "in vitro" que permiten estudiar sus etapas más precoces, así como la acumulación de evidencias fisiopatológicas que inciden en la cinética y calidad del proceso, dan soporte a una mayor complejidad en los mecanismos de inducción y regulación para la maduración eritroide, lo que incluye, sumariamente, evidencias sobre la existencia de mecanismos humorales distintos a la eritropoyetina, así como de mecanismos de interacción celular. El conocimiento de estos factores ha de contribuir, sin duda, a un progreso decisivo en la comprensión de la totali-

dad del proceso tanto en su dimensión fisiológica como en circunstancias patológicas no bien explicables

1 2 MOTIVACION PERSONAL

La Hematología se constituye actualmente en una disciplina de estudio con posibilidades ilimitadas, en permanente expansión hasta poder ser considerada como una auténtica vanguardia en determinados aspectos de los avances en medicina. El clínico que convive diariamente con el enfermo hematológico está sometido de forma permanente a estímulos derivados, de una parte, de la gravedad de los problemas que se le plantean, muchos de ellos sin una solución inmediata viable, y por otra, de la consciencia de que la hematología es una disciplina de gran viveza, sometida constantemente a revisión de conceptos, a nuevas aportaciones de conocimientos que tienden a ir cubriendo paulatinamente - las amplias lagunas de ignorancia fisiopatológica que caracterizan, aún actualmente, a la mayoría de hemopatías. En este ambiente de motivación para el estudio, es difícil sustraerse a la posibilidad de desarrollar una tarea investigadora, pues se es consciente de que la mentalización en tal sentido es una actitud que debe presidir el pensamiento del clínico. El desarrollo de esta actitud investigadora está al alcance del hematólogo en primer lugar a través de la investigación clínica, realizable por la sistematización en la asistencia de enfermos, con un minucioso espíritu observador y crítico de la experiencia diaria. De aquí surgirán las inquietudes que mueven a la investigación bá-

sica y que la hacen lícita en cuanto tiende, a corto o largo plazo, a ser soporte de nuevas orientaciones terapéuticas

Mi trayectoria profesional dentro de la medicina se ha desarrollado, desde 1972 hasta la actualidad, en la Escuela de Hematología Farreras Valentí, dirigida por el Profesor Ciril Rozman. En este centro, primer enclave de una concepción auténticamente científica de la Hematología en el país, he tenido ocasión de desarrollar una actividad marcada por la responsabilidad en la ampliación de conocimientos, siempre en base a una mejor tarea asistencial. La inquietud científica del grupo ha comportado la sensibilización hacia aspectos concretos de la especialidad por parte de cada uno de sus elementos integrantes. Así surgió mi interés por la temática de la eritropoyesis y, dentro de ella, por las nuevas perspectivas de conocimiento fisiopatológico que ofrece el cultivo de los precursores eritroblásticos en modelos "in vitro". Mi posterior contacto con el Profesor Esmail D. Zanjani, Director del "Human Diagnostic Bone Marrow Research Unit", ubicado en el Veterans Administration Hospital de Minneapolis y dependiente de la University of Minnesota (USA), supuso mi acceso directo al aprendizaje de la investigación como disciplina de trabajo intelectual y, en concreto, de la metodolo

gía en el cultivo de los precursores eritroblásticos
La indudable talla científica del Profesor Zanjani,
avalada repetidamente por sus numerosas aportaciones
al conocimiento de la fisiología de la eritropoyesis,
no desmerece de su categoría humana, asimismo excep-
cional. Bajo su tutela científica y constante apoyo
fué posible la realización de este trabajo.

REVISION DE LA
BIBLIOGRAFIA

=====

2 REVISION DE LA
BIBLIOGRAFIA

2 1 STEM CELL PLURIPOTENTE (CFU-S)

Los hematíes derivan de una población celular de la médula ósea poseedora de una extensa capacidad proliferativa. Este precursor celular, denominado stem cell pluripotente (77), está destinado, por la misma naturaleza de la hemopoyesis, a sustentar la homeostasis celular sanguínea, como compartimiento estable frente a las constantes y fisiológicas pérdidas de elementos celulares maduros presentes en la sangre circulante. Como consecuencia de ello, sus características más importantes deben ser la auto-renovación y consiguiente perpetuación como estirpe celular, a la vez que su capacidad de diferenciación hacia las distintas líneas madurativas de la sangre, de características morfológicas y funcionales tan dispares. Desde esta perspectiva, la reproducción de la stem cell comporta básicamente y de forma simultánea, dos posibilidades:

- a) La génesis de células hijas de características y potencialidad similares a las de su predecesor, concepto inherente a la auto-perpetuación de la especie celular.
- b) El tránsito obligado para acceder a compartimientos celulares madurativos progresivamente avanza

dos y especializados Las primeras etapas de esta alternativa de la stem cell pluripotente constituirán los denominados compartimientos "comprometidos" ("committed"), unipotenciales para cada línea madurativa de la sangre De entre ellos, el compartimiento eritroide y sus mecanismos de regulación centra el objetivo de esta Tesis

Aunque la stem cell pluripotente no ha sido aún caracterizada morfológicamente, se asume que posee características próximas a las del linfocito circulante (51,90) del que se diferenciaría ultraestructuralmente (112,139)

La existencia de la stem cell pluripotente halló soporte experimental en la infusión venosa a ratones receptores irradiados a dosis letales (131) ó del genotipo anémico W/W^V (78) de un número adecuado de células procedentes de la médula ósea de una ratón isogénico sano, observándose, de 9 a 14 días más tarde, la formación de colonias macroscópicas de tejido hemopoético en el bazo del ratón receptor, quien, respectivamente, sobreviviría a la irradiación ó corregiría el defecto genético Estas colonias esplénicas, sustrato anatómico de la evidencia experimental de la stem cell pluripotente, han determinado su denominación CFU-S (Colony Forming Unit - Spleen) (figura 1)

Ya desde las experiencias iniciales (131) fué

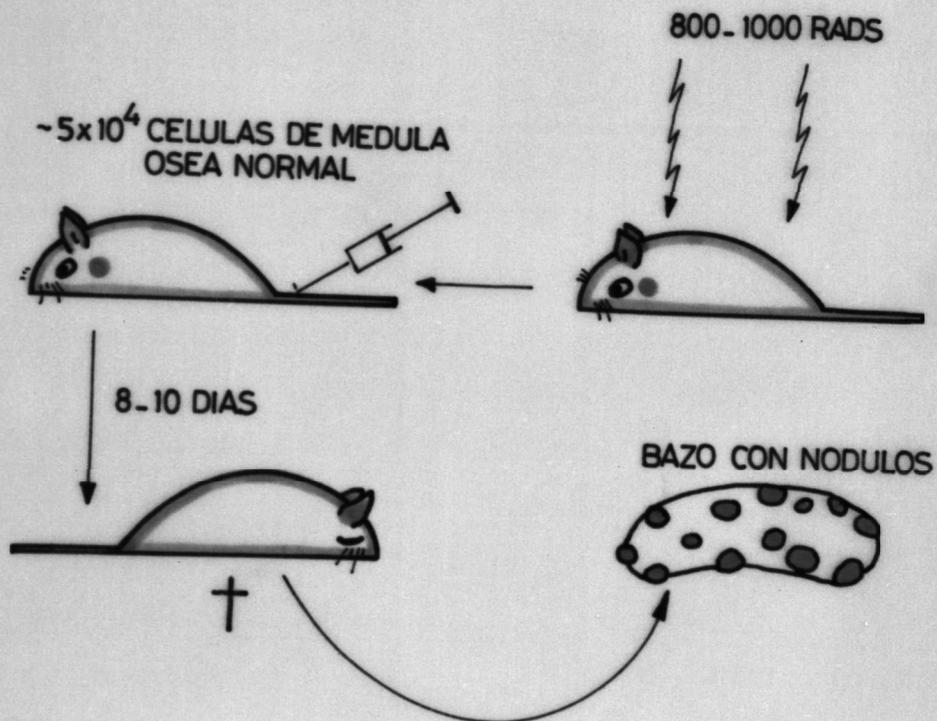


FIGURA 1: Producción de colonias esplénicas de naturaleza hemopoyética en ratones letalmente irradiados, por la infusión de células de médula ósea isogénica.

postulado que las colonias esplénicas eran de naturaleza celular clonal y por ello, cada colonia derivaría de una única stem cell CFU-S. Esta hipótesis, basada en cálculos de relación lineal entre el número de células infundidas, número de colonias observado y curvas de supervivencia a la irradiación, fue confirmada con posterioridad. Así, Becker y cols (8), usando radiación ionizante a efectos de causar lesión cromosómica en las células de la médula ósea del animal donante, obtuvieron un adecuado marcador citogenético con el que seguir el crecimiento de la CFU-S en las colonias esplénicas del animal receptor. El examen posterior de las colonias obtenidas a partir de estos donantes mostró que un cierto número de ellas contenía el marcador cromosómico inducido por la irradiación, así como que en cada colonia en que se halló el marcador, éste se evidenciaba en la práctica totalidad de células en metafase de la colonia (95 a 99%). De forma más concluyente (143), se inyectaron en animales receptores irradiados mezclas de células normales con otras exhibiendo determinadas traslocaciones cromosómicas como marcador. El estudio citogenético de las colonias obtenidas mostró para cada una de ellas el cariotipo normal ó bien el anómalo, no evidenciándose en ningún caso ambos en una misma colonia.

Distintos métodos han sido usados para demostrar que la CFU-S es de naturaleza pluripotente. Exámenes

histológicos de las colonias esplénicas en una fase temprana de su desarrollo mostraron un sólo tipo de diferenciación celular, sin embargo, más tardíamente era posible identificar en la mayoría de las colonias evidencias de maduración correspondiente a las tres series medulares, eritroide, granulocítica y megacariocítica (11,27,72) A través de la práctica de suspensiones celulares a partir de colonias individuales se pudo demostrar la coexistencia de positividad a las mieloperoxidasas con la de incorporación de Fe^{55} en células de una misma colonia, lo que se interpretó como evidencia simultánea de maduración granulocitaria y eritroide (38) La evidencia definitiva de la naturaleza pluripotente de la CFU-S fue aportada por Wu y cols (149), a través de la combinación de las técnicas de marcaje cromosómico mediante irradiación con estudios de incorporación de Fe^{55} y de actividad mieloperoxidasa En este estudio, cierto número de colonias mostró un marcador genético común para las células granulocíticas y eritroides

De modo similar, la capacidad de auto-renovación atribuida a la CFU-S pluripotente pudo ser demostrada experimentalmente cuando suspensiones celulares de colonias esplénicas disecadas cuidadosamente y reinyectadas a ratones receptores irradiados dieron lugar al desarrollo de nuevas colonias esplénicas en el segundo animal (81,121) La re-infusión de células obte

nidas a partir de colonias con características de diferenciación aparentemente correspondientes a una única línea madurativa permitió obtener colonias esplenicas que mostraron maduración indistintamente para las tres líneas celulares de la médula ósea. Ello indicaba la persistencia en la colonia de origen, de células del compartimento CFU-S pluripotente coexistiendo con otras correspondientes a fases madurativas más avanzadas y de carácter unipotente (61,71)

Vemos pues que, atendiendo a lo expuesto, la CFU-S reúne las condiciones de capacidad para la auto-renovación así como para la diferenciación hacia cualqquiera de las líneas madurativas de la médula ósea, cumpliendo ampliamente los requerimientos que la definen como stem cell pluripotente

Aunque las experiencias con el modelo de colonias esplénicas permitieron ver que estas no contenían linfocitos, por medio de la inducción de marcadores cromosómicos mediante radiación ionizante en las células de médula ósea previamente a su infusión al animal receptor, fué posible observar la existencia de un patrón cromosómico común para las células de las colonias esplénicas y las células linfoides repobladoras del timo, bazo y ganglios linfáticos (27,28,136). Este fenómeno argumentó en favor de la existencia de una stem cell de ubicación más primitiva que la CFU-S, presuntamente precursora de ella y de los progenitores

linfocitarios En un estudio posterior (1), la infusión de células de médula ósea con un marcador cromosómico único en receptores W/W^V definió tres tipos de resultados en algunos animales, el marcador cromosómico se evidenció en las colonias esplénicas (CFU-S) así como en las células linfoides del timo, bazo y médula ósea, y también en aquellos linfocitos susceptibles de activarse por la fitohemaglutinina y por li popolisacáridos Por ello, se puede concluir con certeza sobre la existencia de un precursor común para las células de la médula ósea y para los linfocitos, que se ha denominado CFU-LM En otros casos, el marca dor sólo se evidenció en las colonias esplénicas, lo que confiere a la CFU-S carácter de potencialidad diferenciativa restringida para las líneas celulares ma durativas de la médula ósea El tercer patrón observado permitió visualizar la alteración cromosómica restringida a las células linfoides del timo y a las células linfoides esplénicas estimulables por la fitohe mag glutinina, sugiriendo la existencia de un precursor celular específico para los linfocitos T

Bruce y McCulloch (16) usando el mismo modelo de colonias esplénicas en ratones receptores irradiados, observaron que el estímulo hipóxico incrementaba la producción eritroide esplénica, pero al mismo tiempo disminuía el compartimiento de stem cells CFU-S, hecho comprobable por un descenso en el potencial de

transplante a partir de éstas colonias esplénicas. A través de esta observación se postuló la existencia de un compartimiento celular intermedio de precursores eritroides, abastecido a partir del compartimiento pluripotente CFU-S, el que a cambio de esta función reduciría su capacidad pluripotencial y, consecuentemente a ello, su eficiencia para el transplante. Dada la íntima relación entre el estímulo hipóxico y la producción de eritropoyetina, se estableció la existencia de una célula precursora unipotente eritropoyetina-sensible, individualizable de la CFU-S. Esta hipótesis se hizo extensiva para cada una de las líneas madurativas de la médula ósea, eritroide, granulocítica y megacariocítica, cuyos compartimientos específicos pudieron evidenciarse mediante la aplicación de métodos que inhibían la reduplicación de uno ó más, pero no de todos los compartimientos de stem cell "comprometidas" a una maduración específica, mediante vincristina (127) y timidina suicida (67). Como resultado de estos estudios, McCulloch (77) propuso un modelo para el control de la proliferación y diferenciación de las células precursoras hematopoyéticas. Según él, el compartimiento CFU-S estaría normalmente en una situación estable, con la mayoría de sus células en fase no proliferativa G_0 . Estas células podrían ser inducidas, indistintamente, hacia un ciclo proliferativo destinado a la simple división ce

lular, ó bien hacia un proceso diferenciativo que culminaría en un "compromiso" madurativo específico, entrando a formar parte del compartimento de "stem cell" unipotencial de la línea celular correspondiente

Existen aportaciones bibliograficas que dan soporte a la existencia de una posible heterogeneidad - del compartimento celular pluripotente CFU-S. Así se distinguirían dos subpoblaciones, la CFU-S-1, pluripotencial y capaz de autorenovación, y la CFU-S-2, también pluripotencial pero incapaz de reduplicarse (115). Aunque parecería lógico que los compartimentos unipotentes se generaran específicamente a partir de la CFU-S-2, no se excluye la posibilidad de diferenciación directa a partir de la CFU-S-1 (74)

La capacidad de la CFU-S para la auto-renovación es muy amplia, excediendo, en roedores, la extensión media de vida de las especies estudiadas. Sin embargo, a través de experiencias de trasplantes seriados en ratones (122) ó exposición a agentes alquilantes (12,13,50) es posible evidenciar su agotamiento

La ubicación de la CFU-S en el ratón incluye la médula ósea, el bazo, y en mucha menor proporción la sangre circulante, localizaciones de otra parte similares a las detectadas en el hombre. Su capacidad para trasplante muestra una cierta heterogeneidad en función de su localización (114,141) ó fase de ciclo celular en que se encuentre (66), definiéndose una

fracción transplantable (f) valorada, en bazo de ratón, en valores oscilantes entre 3 y 24% (76,116,121)

Cabe por último, hacer mención de la posibilidad de criopreservar la CFU-S (dimetilsulfóxido ó glic₁cerol en nitrógeno líquido), lo que permite mantener intacta su viabilidad para trasplante (42,71,113) y su uso posterior en el rescate de pacientes oncológicos sometidos a terapéuticas citostáticas a dosis que supondrían una lesión irreversible de la stem cell. Esta perspectiva, sin embargo, debe ser contemplada con las debidas reservas, dado que habitualmente el paciente oncológico es sometido a tratamientos quimioterápicos previos con asociación de agentes alquilantes, lo que supone riesgo de limitación de las propiedades de la stem cell, con reducción de su potencial para la auto-renovación y trasplante.

2 2 MECANISMOS DE INDUCCION Y REGULACION DE LA STEM CELL PLURIPOTENTE

Bajo esta denominación vamos a referirnos a la multiplicidad de factores que, actuando a nivel de la reproducción y diferenciación celulares, modulan cualitativa y cuantitativamente la secuencia de la hemopoyesis. A través de éstos mecanismos, la stem cell se ve facultada para ejercer su papel fisiológico en el mantenimiento de la homeostasis celular sanguínea. Por ello, su importancia está a la altura de la propia stem cell. La naturaleza y modo de acción de estos factores es de índole muy diversa y en la mayoría de ellos no perfectamente conocida.

Dentro de la doble alternativa de la stem cell pluripotente, auto-renovación y diferenciación, la influencia reguladora de factores tales como la eritropoyetina ó el colony-stimulating factor (CSF) es totalmente nula, dado que su efecto hormonal se ejerce en etapas posteriores del proceso hemopoyético, correspondientes a los compartimientos celulares ya "comprometidos" a una determinada diferenciación. Surge así la primera incógnita, sobre que mecanismo/s controlarían directamente la reduplicación de la CFU-S así como su decisión de diferenciación hacia una línea madurativa específica. Existen numerosos indicios experimentales que dan soporte a la idea de que las fases más preco-

ces de la hemopoyesis, correspondientes a la actividad proliferativa de la CFU-S, vienen reguladas fundamentalmente a través de mecanismos de interacción celular. El aspecto más conocido de esta modalidad de regulación vino a través de la introducción del concepto de los denominados "Microambientes inductivos hemopoyéticos" (HIM) (27,29)

Microambientes inductivos hemopoyéticos -

Pese a que en un principio, se invocaba un mecanismo de azar en la decisión de diferenciación de la CFU-S pluripotente hacia uno u otro compartimientos "comprometidos" (132), el estudio minucioso de los fenómenos de "anidamiento" ("homing") de células de médula ósea infundidas para repoblar la médula ósea y el bazo de roedores letalmente irradiados, en situación de normo o policitemia, permitió sustentar la existencia de unas reglas de índole micro-geográfico en la decisión de diferenciación tanto en la médula ósea como en el bazo, presumiblemente dictadas por el estroma reticulo-endotelial de ambos órganos (134). Este estroma fué considerado subdividido en cuatro diferentes tipos de microambiente, determinantes de una maduración hemopoyética específica: eritroide, granulocítica-neutrófila, granulocítica-eosinófila y megacariocítica. La proporción de cada uno de ellos presenta una distribución distinta para la médula ósea

que para el bazo, de forma que el trasplante de estroma medular en el bazo ó de estroma esplénico subcutáneamente mostraron que cada tipo de estroma retenía sus características específicas de dar lecho a la hemopoyesis, ejerciendo un control cierto en la decisión de diferenciación (148)

Los microambientes granulocítico y eritroide presentan una distribución esplénica diferente y específica, según puede observarse en el bazo del ratón huésped irradiado e infundido con células de médula ósea. Las colonias granulocíticas se originan adyacentemente a la cápsula ó trabéculas esplénicas, ó en los folículos de pulpa blanca depleccionados por efecto de la irradiación. A diferencia de ello, las colonias eritroides pueden aparecer en cualquier localización en el seno de la pulpa roja del bazo, pero no en los folículos linfoides vacíos, a los que bordearán (27)

Sí, a efectos de supresión de la producción endógena de eritropoyetina, el ratón huésped irradiado es convertido en policitémico mediante hipertransfusión, las colonias eritroides, que habitualmente son las que exhiben el crecimiento más rápido en este modelo experimental (aparentes y reconocibles a los seis días post-infusión de médula ósea), muestran un crecimiento más lento con consiguiente reducción en su tamaño y ausencia de diferenciación morfológica, inclu-

so después de diez días del trasplante. En ningún caso entran en diferenciación granulocítica ó de otro tipo, cuando, de forma simultánea, se han desarrollado y diferenciado colonias adyacentes con otra especificidad madurativa (29). Ello probaría que la especialización diferenciativa es geográfica y no temporal. La administración al huésped de eritropoyetina condiciona en un momento dado la rápida proliferación y diferenciación eritroide de estas mismas colonias. La nueva supresión de la eritropoyetina revierte estas colonias a la indiferenciación morfológica, aunque manteniendo un mayor tamaño. Estos cambios indican que bajo la influencia de un microambiente eritroide, las células resultantes de la stem cell pluripotente que originó la colonia están abocadas a una diferenciación eritroide, fenómeno que requiere de la influencia adicional de la eritropoyetina para hacerse aparente. Así pues, el microambiente eritroide condiciona que parte de las células descendientes de la CFU-S pluripotente adquieran sensibilidad a la eritropoyetina, propiedad de la que carece el precursor de origen. Es establecida esta influencia inductiva del microambiente eritroide y suponiéndose su existencia para los otros microambientes, se elaboró el término "microambientes inductivos hemopoyéticos" (HIM). Sin embargo, debe remarcar que este mecanismo inductivo ha sido probado

sólo para el HIM eritroide

Como dato experimental aleccionador de la especialización de los microambientes, es de señalar que en el ratón irradiado, las colonias esplénicas muestran un predominio de la maduración eritroide sobre la granulocítica en una relación de 3 1. A diferencia de ello, las colonias desarrolladas en el estroma de la cavidad medular muestran un predominio granulocitario en una proporción de 2 1. Ante la posibilidad de que el fenómeno se explicara por un anidamiento "selectivo" para cada tipo de stem cell "comprometida", se procedió a infundir huespedes irradiados con dosis elevadas de células de médula ósea, procediéndose 24 horas más tarde a recoger las células anidadas en las cavidades medulares de estos huespedes, reinfundiéndolas en un segundo huesped irradiado. La relación eritroide granulocítica de las colonias esplénicas y medulares observadas en los huespedes secundarios fue similar a la hallada en los primarios. Esta experiencia descarta la hipótesis de un anidamiento "selectivo", reflejando la preponderancia del HIM eritroide en el bazo del ratón, así como del HIM granulocítico en su médula ósea, actuando ambos sobre la stem cell CFU-S pluripotente. Del mismo modo, bazos completos de ratón fueron transplantados subcutáneamente a ratones isogénicos, mostrando una relación eritroide granulocítica similar a la del ba

zo "in situ" El implante de fragmentos de estroma de la médula ósea por punción en el bazo de ratones isogénicos permitió observar una relación granulocítica eritroide similar a la de la médula ósea "in situ", con predominio del crecimiento granulocítico Al mismo tiempo, el parenquima esplénico intacto de alrededor mantuvo la proporción madurativa propia del bazo Aquellas colonias que crecieron en la interfase de ambos estromas mostraron invariablemente un cambio brusco del tipo hematopoyético en el límite entre uno y otro tipo de estroma, con eritropoyesis en la vertiente esplénica y granulopoyesis en la medular Esta sería la explicación para la típica colonia precoz mixta observable en el modelo experimental standard Habitualmente consiste en una gran colonia eritroide con granulopoyesis ó megacariopoyesis en la porción periférica, sugiriendo que una CFU-S asentada inicialmente en un microambiente eritroide, presentaría un crecimiento rápido hasta desbordar los límites geográficos de éste, contactando con otro microambiente granulocítico ó megacariocítico, que induciría una maduración distinta de las CFU-S pluripotenciales ubicadas en él

En un modelo experimental distinto, tal es la rata, la hemopoyesis esplénica tiene como característica llamativa el ser exclusivamente eritroide Así, usando una rata como huesped irradiado, la infusión

de células de médula ósea de ratón mostró una maduración esplénica exclusivamente eritroide. En la experiencia inversa, la infusión de células de médula ósea de rata en un ratón huésped irradiado mostró una maduración esplénica con una relación eritroide granulocítica propia de la especie del huésped, 31, pero con el marcador citogenético propio de la rata en las células obtenidas a partir de las colonias (109). Ello viene a constituir una evidencia experimental más en favor de la existencia de un HIM funcional.

La persistencia de actividad de los HIM en los modelos experimentales tras la irradiación permite afirmar que la radio-resistencia es una de las características de las células que ejercen este efecto. En general, se asume que estas células pertenecerían al sistema reticulo-endotelial (135). Diferentes evidencias permiten establecer que el HIM es una estructura funcional fija, no circulante, de forma que una agresión importante como puede ser una irradiación a dosis muy elevadas no propicia su restauración (63). Otro tipo de agresiones, tales como la isquemia ó el curetaje de la médula ósea, permiten la regeneración funcional del HIM en un intervalo de 2-3 semanas (64, 65, 147). Se ha pretendido una cierta especialización morfológica para determinadas células del HIM, especialmente aquellas que darían soporte a la maduración eritroide (70). Del mismo modo, el cultivo "in vitro"

de células del HIM permite, tras una aparente desdiferenciación morfológica ("fibroblastos"), su recuperación morfológica y funcional tras su reimplantación a un modelo animal "in vivo" (39)

Las evidencias experimentales que se han descrito, sustentan la hipótesis de los HIM a través del análisis minucioso de la secuencia y características del desarrollo del modelo de colonias esplénicas descrito inicialmente por Till y McCulloch. Otras observaciones, en modelos experimentales distintos "in vivo" e "in vitro", argumentan asimismo en favor de mecanismos de interacción celular en el control proliferativo de la CFU-S

Modelos de anemias genéticas en ratones -

En ratones, la práctica de una timectomía neonatal es capaz de generar anemia, cuya corrección corre a cargo de la adición de linfocitos T autólogos (89). Este hallazgo constituyó la primera evidencia de que el sistema linfóide inmunocompetente podría ejercer algún tipo de efecto regulador en el proceso eritropoyético.

La cepa de ratones W/W^V constituye un modelo de anemia genéticamente determinada, con características de macrocitosis y neutropenia acompañantes (86,106). Puesto que el defecto era susceptible de corrección mediante el trasplante de stem cells normales, se asu

mía que el defecto era debido a la presencia de una deficiente stem cell CFU-S (78,86) Sin embargo, recientes estudios han mostrado como la corrección del defecto mediante médula ósea normal podía ser prevenida mediante el pre-tratamiento de las células del donante con un antisuero anti-Thy-1.2 (específico anti-linfocito T) en presencia de complemento (144) Del mismo modo, la depleción de células T en la médula ósea del donante previamente a la infusión en el huesped, impidió también la corrección del defecto de la eritropoyesis La adición de timocitos normales se mostró capaz de reconstituir la capacidad de la médula ósea normal para corregir el síndrome anémico de la cepa W/W^V (119,144) Otras células, tales como las que constituyen la fracción adherente de exudado peritoneal de un ratón normal, mostraron asimismo capacidad para corregir el defecto (17) Dada su más que probable naturaleza macrofágica, es de suponer que su efecto se ejercería a través de mecanismos de interacción íntima con los linfocitos T

La prevención del efecto curativo ejercida por el antisuero anti-Thy-1.2 no afecta en absoluto al defecto en la granulopoyesis que se vé normalizada pese al antisuero anti-T (119,144)

La cepa de ratones Steel (Sl/Sl^d) se caracteriza por presentar con carácter genético anemia macrocít

tica severa, defecto en la pigmentación del pelo y aumento en su radio-sensibilidad (79,86) La infusión en este modelo de mutantes de células de médula ósea normales no corrige su defecto, mientras que sus stem cells son capaces de restituir a la normalidad la hemopoyesis de un huesped irradiado. Ello permite suponer que el defecto de la hemopoyesis se halla ubicado a nivel de un HIM defectuoso, de forma que sus stem cells pueden corregir la anemia macrocítica de la cepa W/W^V . Ambas cepas, W/W^V y Sl/Sl^d , en parabiosis, corrigen mutuamente el defecto de la hemopoyesis. La interrupción de la parabiosis supone persistencia del defecto en el Sl/Sl^d al tiempo que el W/W^V corrige definitivamente su defecto. Ello viene a confirmar la localización del defecto de la cepa Steel (Sl/Sl^d) en un HIM defectuoso y no circulante, asimilado como se ha mencionado anteriormente al sistema reticulo-endotelial (9,10)

La figura 2 esquematiza las anemias genéticamente determinadas de las cepas murinas Sl/Sl^d y W/W^V

Fenómeno de "resistencia híbrida" -

Sumariamente, consiste en un retraso en la maduración de la stem cell CFU-S que se observa al transplantar médula ósea de un donante de una cepa de ratones "inbred" (C 57 BL/6) a un híbrido F1 irradiado

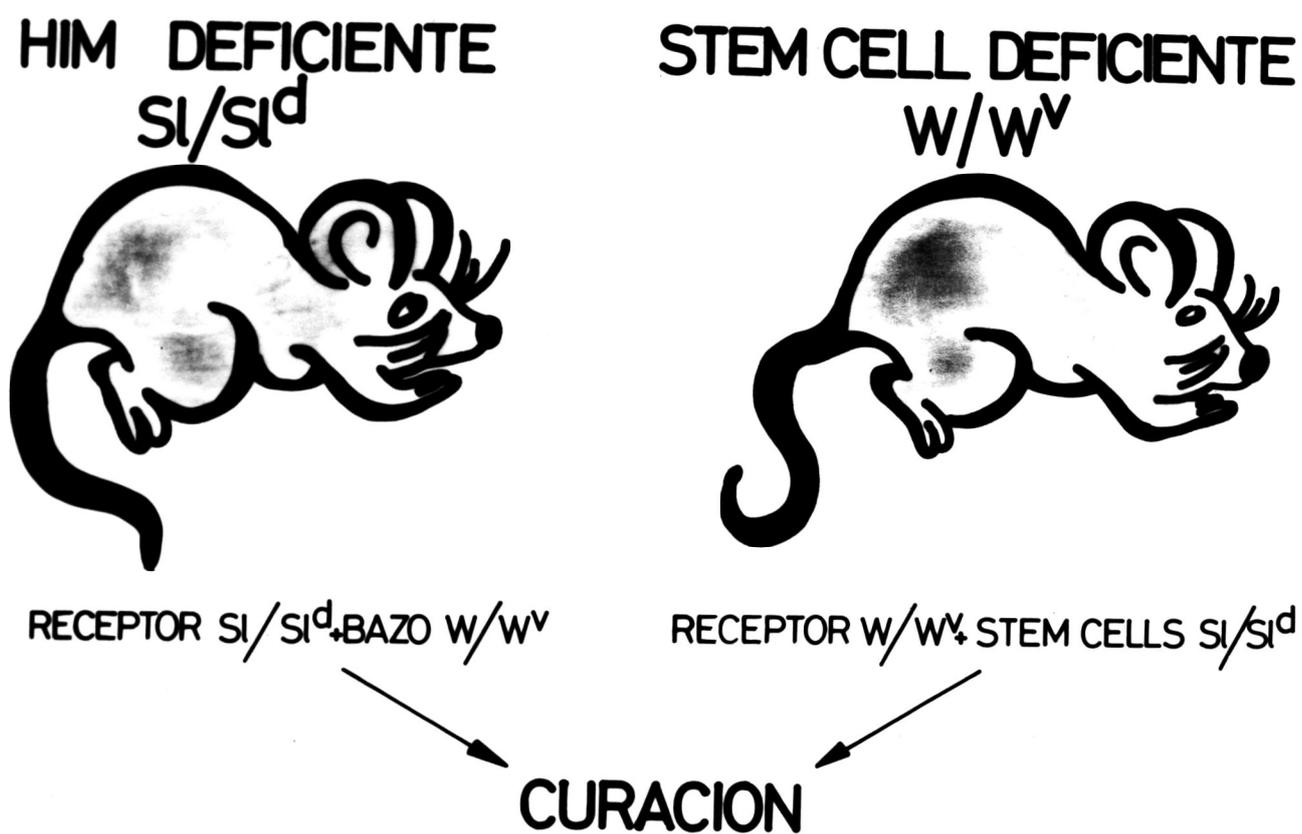


FIGURA 2: Esquema representativo de las anemias genéticamente determinadas en las cepas murinas Sl/Sl^d (defecto del HIM) y W/W^v (defecto de la stem cell).

(26,80) La aparición del fenómeno requiere de una in compatibilidad entre donante y receptor en el locus H-2. El fenómeno significa un retraso en la maduración de la CFU-S de alrededor de doce días, a partir del cual la secuencia de reduplicación de la CFU-S es similar a la normal observable entre huésped y donante singénicos.

Dado que la existencia de la incompatibilidad H-2 no supone obligatoriamente la aparición del fenómeno, y que la sensibilización previa del receptor con células del donante no incrementa la magnitud de éste, cabe plantear otros mecanismos como explicativos de su aparición. En este estudio, se demostró que el bloqueo del sistema mononuclear-fagocítico del receptor mediante partículas de sílice previamente al transplante inhibía la aparición del fenómeno. Del mismo modo, el pre-tratamiento con un protector del sistema mononuclear-fagocítico antes de la administración de las partículas de sílice, permitía la aparición del fenómeno (75). Todo ello lleva a adjudicar un papel protagonista del fenómeno a los macrófagos, lo que comporta un claro paralelismo con la hipótesis de su papel determinante en los microambientes inductivos hemopoyéticos.

2 3 CULTIVO "IN VITRO" DE LA STEM CELL PLURIPOTENTE

Hasta fechas relativamente recientes, la evidencia sobre la existencia de una auténtica stem cell pluripotente con una extensa capacidad para la auto-perpetuación sólo era demostrable a través del modelo experimental "in vivo" de las colonias esplénicas. En 1977, Dexter y cols (30) describieron un sistema de cultivo "in vitro" de médula ósea capaz de mantener a lo largo de muchas semanas la proliferación de la CFU-S y su posterior diferenciación hacia cada uno de los progenitores "comprometidos" en una línea madurativa específica (30,31,130,145). En este sistema, iniciado en el estudio de médula ósea murina, el ambiente propicio para la proliferación de la CFU-S viene dado por una población heterogénea de células adherentes obtenida de la médula ósea (fibroblastos, células "epitelioides", células adiposas) posiblemente representativas del estroma medular, que se desarrollan en un intervalo de cultivo de 2-3 semanas (2,3). La introducción en el cultivo de una segunda población de células de la médula ósea singénicas ó alogénicas (32,93) permite un mantenimiento de la hemopoyesis por un período muy prolongado, con presencia de CFU-S en íntima relación con el monolayer adherente heterogéneo anteriormente descrito. Este sistema, inicialmente descrito en la médula de ratón, ha sido adaptado a primates (*Tupaia glis*)

con un rendimiento de hasta un año de cultivo continuo, y con menor éxito en médula ósea humana (94,95) Todo ello constituye un notable soporte a la teoría de control microambiental de la CFU-S descrito inicialmente por Curry y Trentin (27)

La trascendencia futura del sistema de Dexter es indudable respecto a un mejor conocimiento de la fisiología de esta fase inicial de la hemopoyesis. Muy recientemente, la aplicación de este modelo experimental ha permitido conocer datos ontogénicos relativos a la CFU-S y sus sucesores "comprometidos". Así, mientras la primitiva CFU-S carecería del antígeno Ia, éste sería rápidamente adquirido por sus sucesores inmediatos pre-CFU-C, CFU-C día 7, CFU-C día 14 y BFU-E, desapareciendo en la evolución madurativa posterior de estos precursores "comprometidos" en su progresión hacia las formas celulares maduras de la serie granulocítica y eritroide (92)

La situación actual de conocimientos sobre la secuencia global de los precursores hemopoyéticos y sus mecanismos de regulación queda esquematizado en la Figura 3

MODELO DE HEMATOPOYESIS

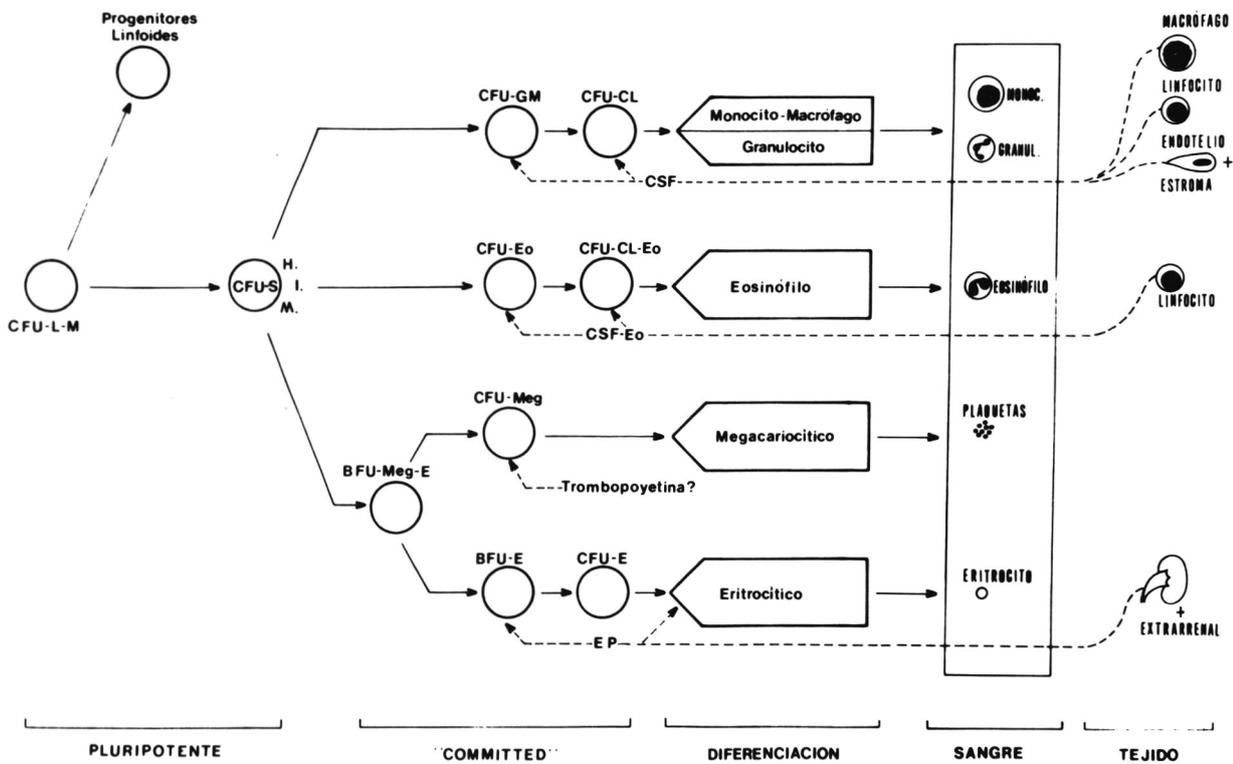


FIGURA 3: Secuencia global del proceso hemopoyético y sus mecanismos de regulación.

2 4 COMPARTIMIENTO ERITROPOYETICO

El estado actual de los conocimientos acerca del compartimiento eritroide permiten perfilar una ordenada secuencia de etapas de diferenciación y maduración, abarcando desde la primera célula "comprometida" hacia esta línea, sucesora inmediata de la CFU-S pluripotente, hasta su representante maduro, el hematíe circulante

En la médula ósea, el reconocimiento morfológico de la serie eritroide se inicia en el proeritroblasto, con características morfológicas definidas de las que la fundamental es la detección de las primeras fases de la síntesis y presencia intracitoplasmática de vestigios de hemoglobina. A partir del proeritroblasto, la secuencia madurativa es breve y bien establecida: eritroblasto basófilo, eritroblasto policromatófilo, eritroblasto ortocromático, reticulocito y hematíe. Sin embargo, desde el primer eslabón celular "comprometido" a la maduración eritroide, precursor más ancestral, hasta el reconocimiento morfológico de la serie, existe un amplio espacio de etapas celulares sucesivas, a las que es imposible reconocer morfológicamente como eritroides. De forma similar a lo expuesto respecto a la CFU-S, se les atribuyó una morfología similar ó indistinguible de la del linfocito

Ciertas observaciones clínicas permitieron estada

blecer que el intervalo de tiempo transcurrido entre la inducción de un estímulo eritropoyético y el incremento en la liberación medular de reticulocitos como respuesta efectora era de aproximadamente cinco días. Admitiendo que el intervalo entre el proeritroblasto y la liberación de reticulocitos es de aproximadamente 48-72 horas, la diferencia entre ambos períodos de tiempo supondría la ubicación temporal de la fase precoz y no reconocible del compartimiento. Esta aseveración, sin embargo, es un tanto ficticia cuando actualmente, y como analizaremos más adelante, existen evidencias experimentales que dan soporte a la existencia de una fase precoz del compartimiento escasamente sensible al estímulo eritropoyético experimentalmente clásico, la hipoxia, y de otra parte, bajo los efectos de un intenso estímulo eritropoyético, es posible asistir a un sustancial acortamiento del tiempo empleado en las etapas últimas del proceso madurativo, constituyendo el fenómeno denominado "eritropoyesis acelerada", presumiblemente explicable por auténticos "cortocircuitos" que obviarían etapas del proceso en un esfuerzo destinado a la rápida restitución de la masa eritrocitaria fisiológica (68,118)

A diferencia de la fase morfológicamente reconocible de la eritropoyesis, cuyos estadios celulares nucleados expresan una capacidad proliferativa casi

exclusivamente "vertical", con muy limitado o nulo potencial para la auto-renovación, sus predecesores del compartimiento mantienen en mayor ó menor grado esta capacidad, en proporción directa a su proximidad respecto a la CFU-S pluripotente. La propiedad de auto-renovarse, concepto inherente al de stem cell y en el que se basa la denominada "reserva funcional" de la médula ósea, fundamental para el mantenimiento de la homeostasis sanguínea, tiene, pese a lo expuesto, un mayor protagonismo fisiológico a nivel de la CFU-S pluripotente que de los compartimientos "comprometidos", siendo aquella la que proveerá a éstos de una extensa reserva, fisiológicamente "dormida" pero rápidamente activable a través de "señales" emergidas de los compartimientos unipotentes, presumiblemente generadas por deplección celular y supuestamente transmitidas por mecanismos de interacción celular (82)

La existencia del compartimiento unipotente "comprometido" a una diferenciación y maduración eritropoyéticas halló soporte experimental desde las primeras observaciones realizadas en el modelo experimental "in vivo" de las colonias esplénicas descritas por Till y McCulloch (131). La práctica de una deprivación eritropoyética experimental en el ratón huésped, por medio de un régimen de hipertransfusión

o a través de la administración de un anticuerpo anti eritropoyetina, dió lugar a un notable descenso en el número de colonias esplénicas reconocibles como eritroides, incrementando el número de colonias de pequeño tamaño y de características celulares indiferenciadas (29,69,117) La posterior administración de eritropoyetina al ratón huésped, siete a nueve días después de la infusión de las células de médula ósea, convirtió, en un intervalo de dos días, las pequeñas colonias indiferenciadas (100 a 200 células) en colonias eritroides de gran tamaño, conteniendo 2 a 4×10^4 células Este resultado sugirió la existencia de una extensa población de células "comprometidas" a la eritropoyesis derivadas de la CFU-S cuya existencia no era presumible por la simple valoración morfológica del aspecto de las colonias (11,29,36,37) Otros estudios sugirieron que la reduplicación de la CFU-S era independiente de la eritropoyetina (29,101,116) En circunstancias experimentales opuestas a las descritas, la estimulación eritropoyética del huésped a través de someterlo al stress hipóxico, condicionó un gran incremento en el número y tamaño de colonias esplénicas eritroides de rápida aparición, al tiempo que disminuía el número de CFU-S esplénicas, circunstancia evidenciable por descenso en el potencial de trasplante de dichas colonias (16) Por todo ello, se sugirió que el descenso en la capacidad de repoblación era debida a

la existencia de un compartimiento celular de precursores eritroides abastecido a partir del compartimiento pluripotencial CFU-S, quien a cambio de ello reducía su tamaño y por tanto su capacidad para transplante. El compartimiento eritroide fué considerado como eritropoyetina-sensible y perfectamente separado e individualizable del compartimiento CFU-S.

Una vez reconocida la existencia del compartimiento unipotencial eritroide, basada en las evidencias experimentales "in vivo" descritas previamente, este compartimiento se hizo sinónimo del denominado "compartimiento de células sensibles a la eritropoyetina" ("erythropoietin-responsive cells", ERC). Establecido el hecho de que la eritropoyetina es la hormona que ejerce como brazo efector en la estimulación de la eritropoyesis a través de la hipoxia tisular (34), todas las variables experimentales que manipularían la situación de oxigenación tisular del modelo experimental "in vivo", usarían como variable última la mayor o menor producción y efecto biológico de eritropoyetina "endógena". Por ello, todas las evidencias basadas en este modelo experimental, incluyendo lógicamente el uso en el huésped de un anticuerpo anti-eritropoyetina, definen obligatoriamente un compartimiento celular dependiente en su proliferación del efecto regulador de la eritropoyetina (ERC), lo que por otra parte no permite afirmar que en él quede incluida la totalidad del

compartimiento eritropoyético En este sentido, las etapas celulares más precoces del compartimiento no dependen mayoritariamente del efecto regulador de la eritropoyetina (56,57,58) sino de otros mecanismos mal conocidos y de mayor complejidad, muy sumariamente definibles como de interacción celular Si se considera el extraordinario efecto amplificador que viene a ejercer el compartimiento eritropoyético, de forma que la proliferación de un originario primer elemento celular "comprometido" progresa aritmeticamente a lo largo de sucesivas y múltiples mitosis hasta el estadio de eritroblasto ortocromático, con resultado final en una extensa producción de reticulocitos y hematíes, podemos concienciarlos de la trascendencia que encierra el conocimiento de estos mecanismos de regulación distintos de la eritropoyetina para la comprensión de múltiples situaciones en que un síndrome anémico no ofrece una explicación fisiopatológica minimamente verosímil

2 5 APLICACION DE TECNICAS DE CULTIVO EN MEDIOS SEMI-SOLIDOS AL ESTUDIO DEL COMPARTIMIENTO ERITROPOYETICO

La aplicación del modelo experimental "in vivo" de las colonias esplénicas, pese a ser el primer soporte experimental en que se basó el conocimiento de la existencia de la stem cell pluripotente y de los distintos compartimientos unipotenciales, presentaba severas limitaciones en su aplicación a un mejor conocimiento de las características, cinética y mecanismos de regulación de las etapas más precoces del compartimiento eritropoyético. Otras técnicas experimentales, tales serían los estudios de incorporación del radioisótopo Fe^{59} ó técnicas histoquímicas destinadas a la detección de hemoglobina en los precursores celulares, inciden tardíamente en la secuencia de la eritrona y no son, por tanto, útiles en el estudio de las primeras fases del proceso

Aunque técnicas de cultivo a corto plazo en medio líquido han sido usadas extensamente en el estudio de los mecanismos de control de la síntesis del hem dependiente de la eritropoyetina, es más que dudoso que estos cultivos puedan dar soporte a una proliferación eritropoyética valorable

El desarrollo de técnicas para el cultivo "in vitro" de precursores celulares hemopoyéticos en medios semi-sólidos posee una historia relativamente breve pe

ro altamente productiva, habiendo supuesto una contri
bución trascendental al conocimiento de la fisiología
de las etapas más precoces de los distintos comparti-
mientos madurativos unipotenciales. El primer precur-
sor desarrollado con éxito mediante el uso de estas
técnicas, correspondió a la serie granulocítica-mono-
cítica siendo denominado CFU-C (Colony Forming Unit-
Cell), terminología de escasa especificidad expresiva
de la poca perspectiva del momento sobre el futuro de
sarrollo de la entonces novedosa técnica. Las prime-
ras descripciones se deben a Bradley y Metcalf, en
1966 (15) y Pike y Robinson en 1970 (105), recogién-
dose en ellas las líneas generales que regirían poste-
riormente las variantes técnicas destinadas a obtener
el crecimiento "in vitro" de la misma ó distintas se-
ries, hasta hacer extensible la clonalización "in vi-
tro" a todas las líneas madurativas de la sangre.

En 1971, Stephenson y cols (125) describieron
originalmente un método de cultivo semisólido (coágu-
lo de plasma) en el que lograron el crecimiento y
diferenciación de colonias eritroides a partir de cé-
lulas de hígado fetal de ratón. El sistema desarro-
llado consistió en el "atrapamiento" de una suspen-
sión de células hemopoyéticas en un coágulo de plas-
ma formado a partir de un medio de cultivo que conte-

nía eritropoyetina. El precursor recibió el nombre CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid) y sus colonias, a los 2 días, estaban constituidas por 10-20 células identificables morfológicamente como eritroblastos basófilos. A los cuatro días de cultivo, el contenido celular de las colonias se incrementaba a 60-70, con una mayor maduración celular representada por eritroblastos ortocromáticos, asistiéndose inmediatamente después a la lisis de las colonias y a la desaparición de vestigios de crecimiento en el medio. Los mismos autores describieron la obtención de colonias eritroides también a partir de células de médula ósea de ratón adulto, en esta ocasión de un menor tamaño que las originadas a partir de las células de hígado fetal. La exposición previa del ratón donante de médula a un estímulo hipóxico incrementó sustancialmente el número de colonias en el cultivo en una proporción hasta tres veces mayor, lo que supuso una evidencia "in vitro" de su eritropoyetina-dependencia. Tres años más tarde, el mismo grupo reportó la descripción perfeccionada de esta técnica de cultivo de precursores eritroides, de forma que permitía la posibilidad de realizar valoraciones cuantitativas de los resultados (84). En este trabajo, desarrollado en médula ósea de ratones adultos, se establecieron los valores óptimos para el cultivo de contenido en plasma, suero fetal de buey, sero-albúmina bovina y L-asparagina. Del mismo modo,

se demostraba la dependencia en cuanto a rendimiento del cultivo respecto a la concentración en eritropoyetina, de forma que a concentraciones óptimas de la hormona, el número de colonias eritroides producido era directamente proporcional al número de células - medulares cultivadas

La adaptación del método de cultivo para crecimiento eritroide de médula ósea humana fué realizado por Tepperman y cols en 1974 (129) En este trabajo, como en otro anterior (5), se describió la presencia de dos precursores eritroides distintos, introduciéndose las nomenclaturas CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid) para el originalmente descrito por Stephenson, y BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid) para un precursor de mayor antigüedad respecto al anterior en el desarrollo ontogénico de la serie Las diferencias detectadas entre ambos fueron notables, incuyendo tiempo requerido para el desarrollo de las colonias "in vitro", morfología de las colonias, requerimiento en eritropoyetina y características físicas distintas, permitiendo su separación a través de gradientes de sedimentación (49)

Aunque la técnica de cultivo en coágulo de plasma se mostró idónea para el desarrollo de precursores eritroides, su uso es extensible al cultivo de precursos de otras líneas madurativas tales como CFU-C (84)

y CFU-M (Colony Forming Unit-Megakariocyte) (85) Del mismo modo, otras técnicas en medio semi-sólido son adaptables al crecimiento eritroide, fundamentalmente la metilcelulosa (59) y el agar (54) Técnicas distintas a los cultivos semisólidos, fundamentalmente cámaras de difusión "millipore" implantadas intraperitonealmente en ratones irradiados a dosis letales, se han mostrado también útiles en la obtención de crecimiento de precursores hemopoyéticos de distintas líneas madurativas (7) La dificultad técnica que comportan así como la difícil cuantificación de resultados han inclinado a un mayor desarrollo de los cultivos en medios semisólidos como técnicas "in vitro" - más idóneas

La presencia en la sangre circulante de precursores hemopoyéticos se halla caracterizada para la stem cell pluripotente, tanto "in vitro" (7) como "in vivo" (128) La presencia de precursores granulocitarios CFU-C en la sangre periférica fué asimismo evidenciada tanto en modelos animales (110) como en el hombre (20) Los estudios encaminados en este mismo sentido y referidos a los precursores eritroides permitieron demostrar la presencia en la circulación de uno de los precursores descritos, BFU-E, tanto en ratones (47) como en la sangre de humanos (22,104) Esta sería, pues, otra de las características diferenciales entre ambos precursores, posiblemente traduciendo, en este caso, un cierto papel en el mantenimiento del equilibrio fisiológico de la eritropoyesis a través de la re-distribución del precursor más antiguo de la serie entre las

distintas zonas del organismo donde se desarrolle el proceso fisiológico de la hemopoyesis, sujetas a mayor ó menor deplección en la presencia de precursores eritroides. Esta función estaría, por tanto, limitada ontogénicamente a los eslabones celulares más primitivos de la serie.

El cultivo de médula ósea humana en el sistema "in vitro" de coágulo de plasma y en presencia de eritropoyetina genera, secuencialmente, la aparición entre el 4º y 8º día de cultivo, de colonias que derivarían del precursor más evolucionado, CFU-E, constituidas por un acúmulo de células sintetizadoras de hemoglobina (benzidina-positividad) en número par, oscilando entre un mínimo de 8 y 50. En una fase posterior del mismo cultivo y previa lisis de las colonias correspondientes a CFU-E, se hace aparente otro tipo de colonias, cronológicamente evidentes entre los días 11 y 18 de cultivo. Estas colonias tardías se consideran derivadas del precursor más primitivo, BFU-E, y se caracterizan morfológicamente por estar constituidas por el acúmulo de subcolonias en número variable, en general entre 4 y 10, agrupadas constituyendo una unidad geográfica y confiriendo al total de la colonia un aspecto abigarrado, "de explosión" ("burst" estallido, explosión). Estas colonias poseen, por tanto, un tamaño notablemente superior al de las derivadas de CFU-E, mostrando también sus células capacidad para la síntesis de hemoglobina, aunque en menor intensidad que aque

llas En general, se admite que durante los primeros siete días de cultivo, una BFU-E se dividiría varias veces, constituyendo cada una de las células hijas el origen de cada sub-colonia. Cuando estas células hijas sobrevienen "comprometidas" a proliferar e iniciar la síntesis de hemoglobina, ello ocupa los siguientes siete días y culmina en la apariencia macroscópica característica de la colonia originada en una BFU-E. De hecho, las características de crecimiento de cada sub-colonia de BFU-E son muy similares a las de las colonias de CFU-E, extendiéndose la similaridad a la cronología de su desarrollo. Podría deducirse de ello que las sub-colonias constituyendo una colonia de BFU-E expresarían el número de CFU-E derivadas de una simple BFU-E y agrupadas por su origen clonal único (figura 4)

El cultivo de células mononucleares de sangre periférica, previa su obtención en la interfase de un gradiente de ficoll, permite identificar el crecimiento de colonias eritroides de aparición tardía, cuyas características morfológicas, cronología y requerimiento de eritropoyetina son similares a los de BFU-E de la médula ósea. La menor contaminación celular de la fracción mononuclear de sangre periférica con respecto a la médula ósea, así como la presencia de un sólo tipo de actividad eritroide, propiciaron un modelo experimental idóneo para el análisis de las característi

cas de este precursor, así como de los posibles factores determinantes de su actividad proliferativa

2 6 COLONY FORMING UNIT-ERYTHROID (CFU-E)

Con su descripción (125) se inició el campo de cultivo eritroide como modelo experimental "in vitro" Este precursor ocupa, en el desarrollo ontogénico de la eritrona, una etapa relativamente tardía, separada del inicio de la síntesis de hemoglobina por sólo una a tres divisiones celulares (24) Su ubicación fisiológica corresponde a los órganos hemopoyéticos, no habiéndose detectado en la circulación Su expresión en el cultivo es de escasa amplitud proliferativa, formando colonias celulares de pequeño tamaño (8 a 60 células) con evidente síntesis hemoglobínica (normoblastos tardíos y hematíes), que alcanzan su máximo tamaño a los dos días de cultivo para los precursores murinos y a los 7-8 días para la médula humana, desapareciendo posteriormente con relativa rapidez por lisis celular (figuras 5 y 6) La naturaleza clonal de estas colonias fue demostrada a través de su seguimiento directo en el cultivo por medio de técnicas cinematográficas (24) Su diferenciación del otro precursor eritroide, BFU-E, aparte de criterios de comportamiento biológico (aspecto y cinética de las colonias, dependencia de eritropoyetina, etc), se puede realizar

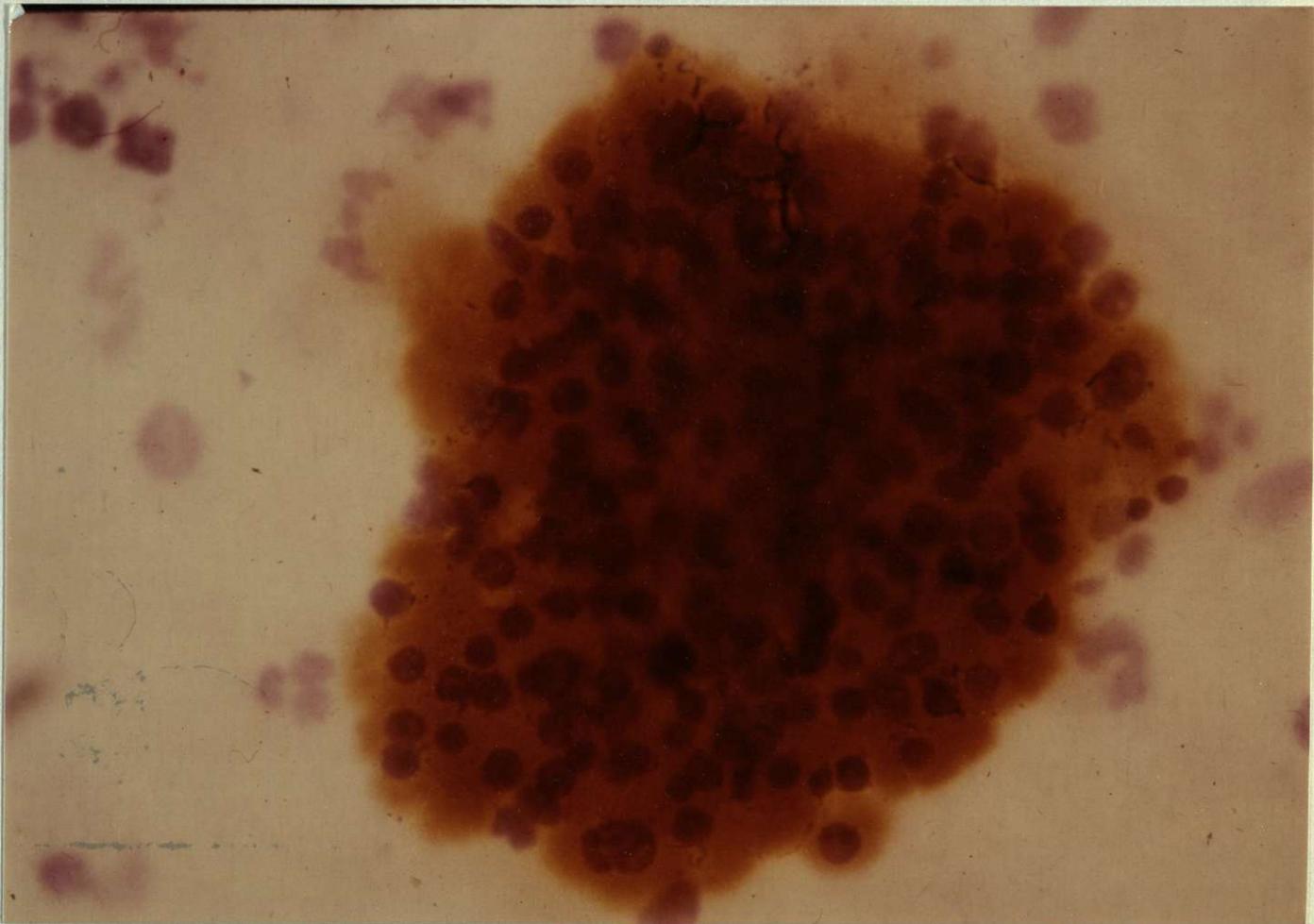


FIGURA 5: Colonia correspondiente a actividad proliferativa de CFU-E en medio de cultivo de coágulo de plasma y en presencia de eritropoyetina. La síntesis de hemoglobina queda evidenciada por la intensa benzidinapositividad de las células (x 400).

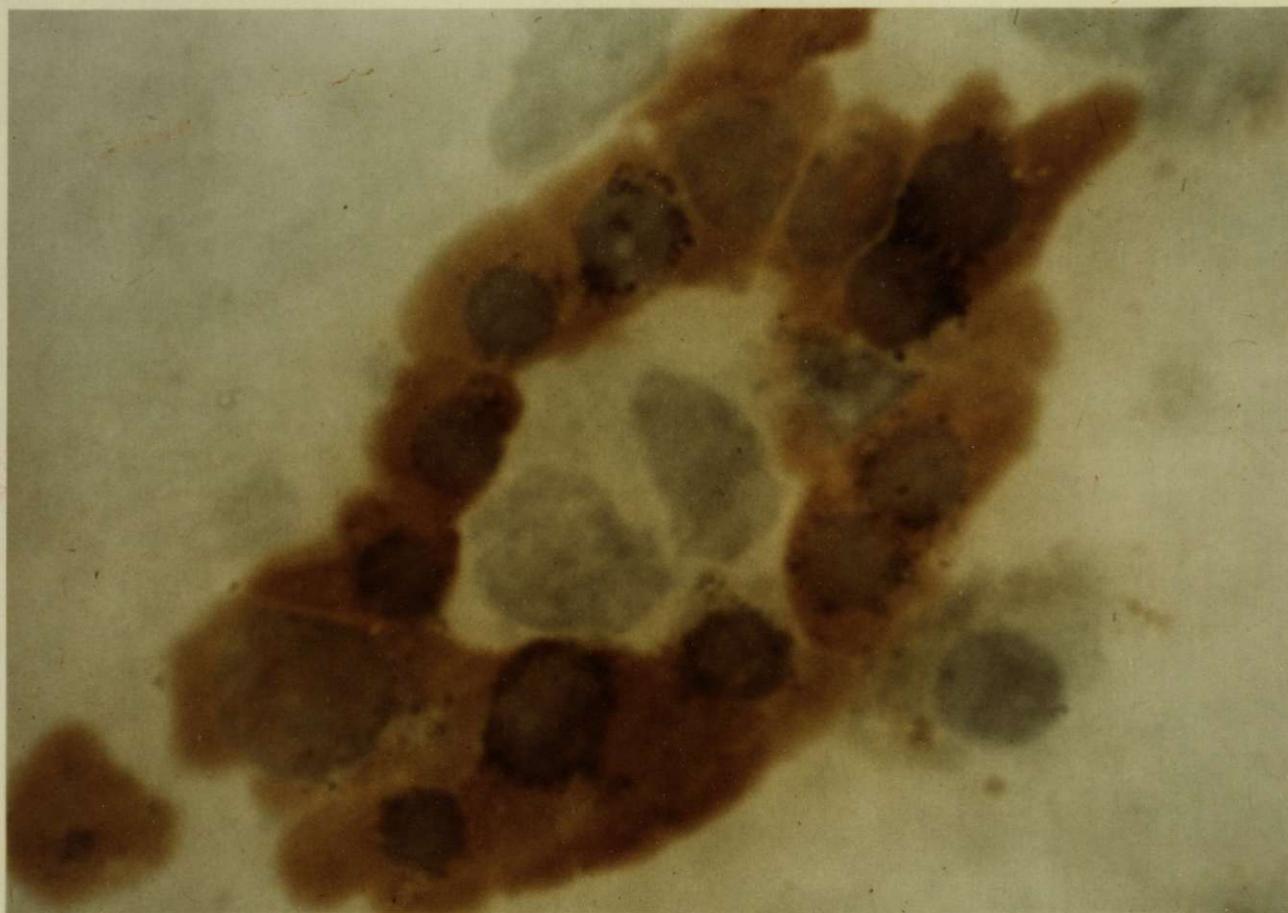


FIGURA 6: Colonia de CFU-E adoptando la morfología de islote eritroblástico, con célula macrofágica en disposición central (célula nodriza) y corona de eritroblastos a su alrededor (células benzidina -positivas) (x 400).

por procedimientos físicos, dado que la mayor densidad celular de la CFU-E le confiere una velocidad de sedimentación en gradientes de albúmina claramente superior a la de la BFU-E (6 4 mm/hora para la CFU-E y 3 9 mm/hora para la BFU-E) (49)

La actividad proliferativa de la CFU-E es estrictamente dependiente de la eritropoyetina (56,58, 137) En modelos "in vivo" se detectan rápidas y amplias oscilaciones, de hasta tres veces, en el número de CFU-E siguiendo a situaciones experimentales de hipoxia por sangrado, ó de hipertransfusión Una breve exposición al efecto letal de timidina tritiada condiciona una mortalidad del 75% en el compartimento de CFU-E, lo que de por sí es índice del alto número de células en fase activa S del ciclo celular presentes en condiciones basales El régimen de hipertransfusión disminuye ligera pero significativamente este porcentaje (60%) Por cultivo "in vitro" del precursor se demuestra que la CFU-E depende, a lo largo de la totalidad de su proceso proliferativo, de la eritropoyetina, sin cuya presencia su supervivencia en el medio es de un número limitado de horas De hecho, la dependencia de la eritropoyetina se establece en una fase diferenciativa previa a la CFU-E, siendo ésta ya dependiente en cuanto a su génesis a partir del precursor inmediatamente previo (56,58) Experiencias mediante tratamiento de células de médula ósea de ratón poli

citémico con BCNU y milerán mostraron, una vez más, la estricta dependencia de la CFU-E respecto de la eritropoyetina, a diferencia de precursores previos de crecimiento "in vitro" tipo "burst" (137)

El comportamiento cinético y mecanismos de regulación del precursor CFU-E permiten afirmar su individualidad e incluso alejamiento ontogénico respecto de su predecesor BFU-E, así como de otros precursores correspondientes a líneas madurativas distintas (CFU-C) y de la pluripotente CFU-S. En cultivo, se ha podido demostrar un requerimiento de la CFU-E para albúmina, transferrina, selenio y lípidos, así como su independencia de factores de crecimiento presentes en suero y conocidos como "burst-promoting activity" (BPA), altamente determinantes en la proliferación de los otros precursores citados BFU-E, CFU-C y CFU-S (58) (Figuras 7,8 y 9)

Existen evidencias experimentales que dan soporte al hecho de que, bajo condiciones normales, la CFU-E en cultivo genera colonias de células productoras de hemoglobina adulta (23,103,104), de forma que la decisión genética sobre la síntesis de cadenas de γ -globina se realizaría a un nivel previo del desarrollo ontogénico de la serie, presuntamente identificable con el precursor BFU-E

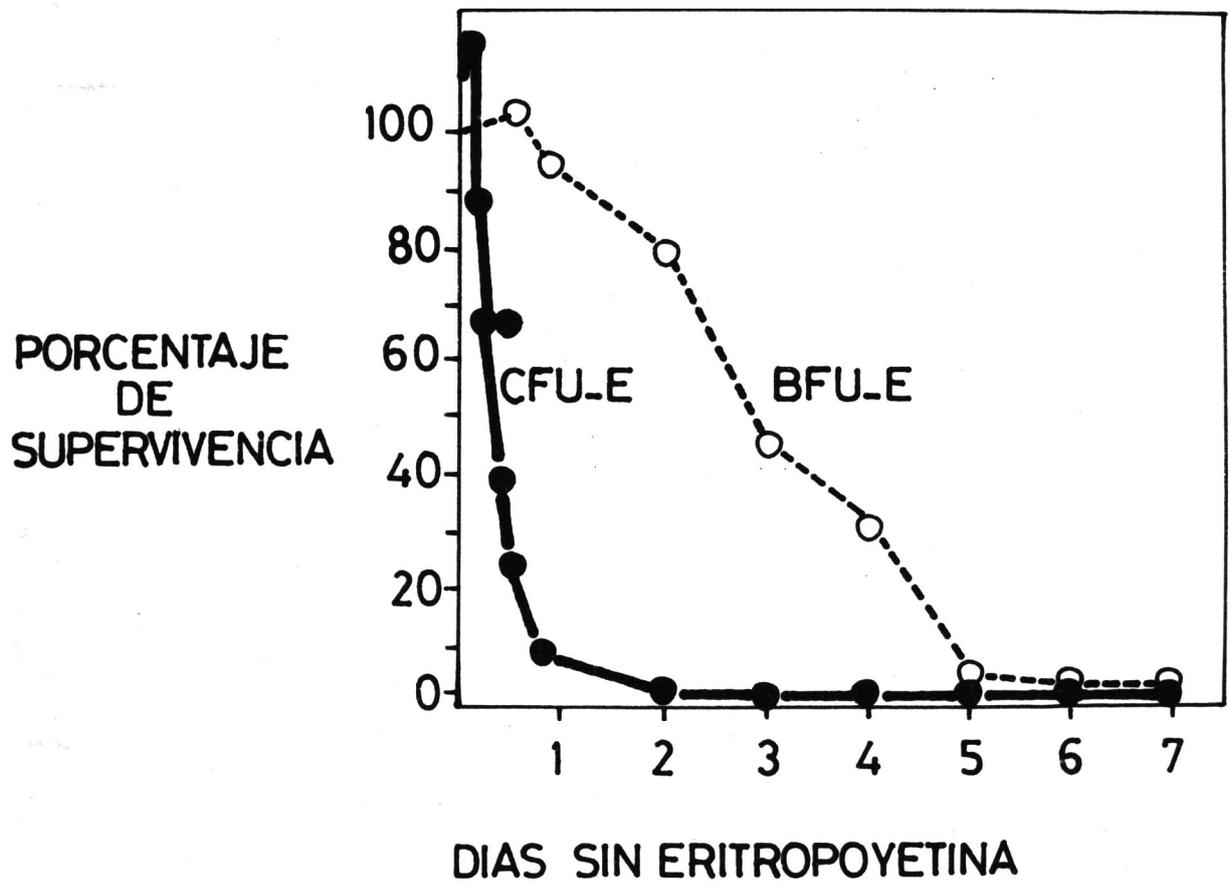


FIGURA 7: Supervivencia de CFU-E y BFU-E en ausencia de eritropoyetina en el medio de cultivo.
(58)

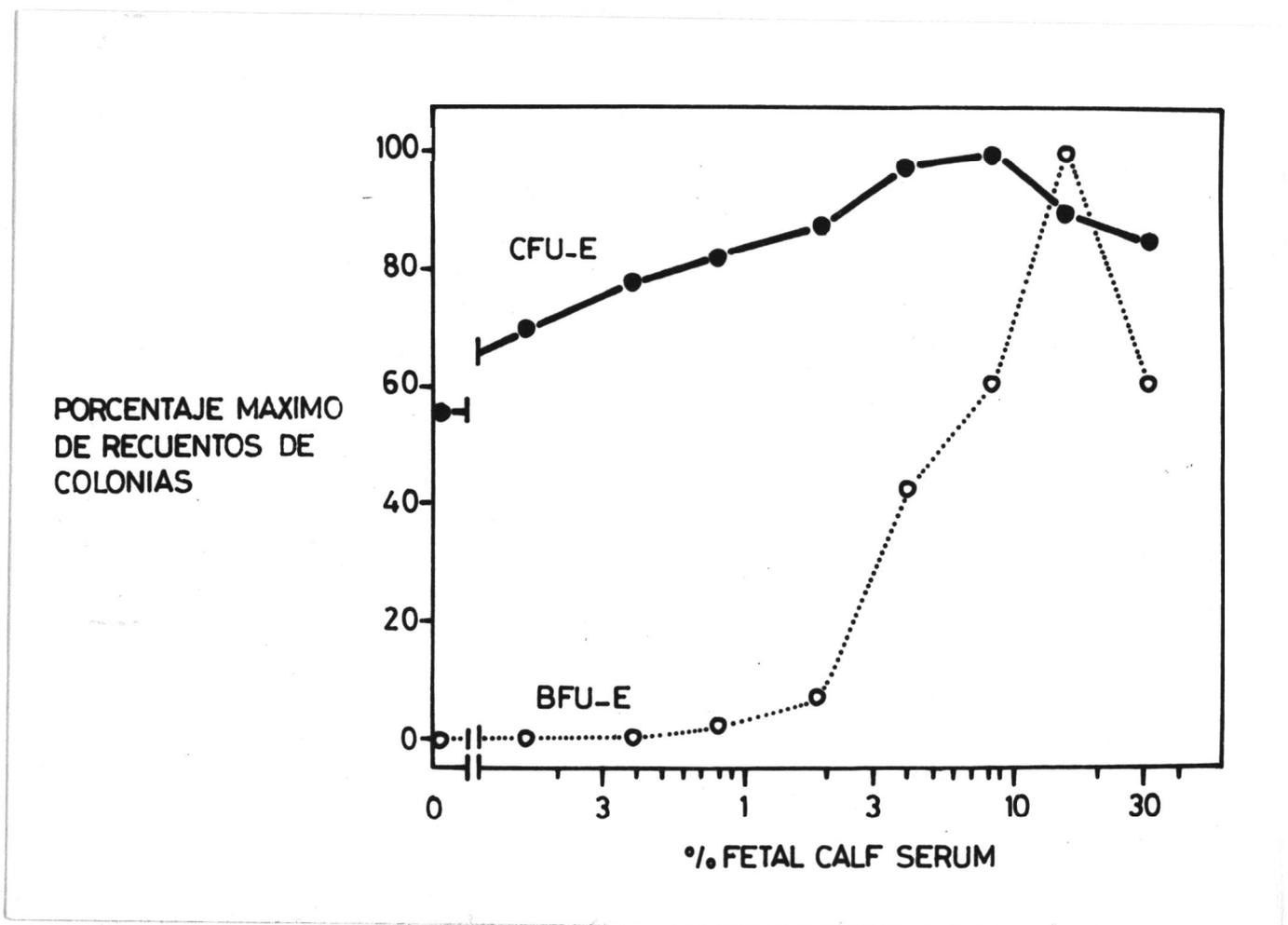


FIGURA 8: Dependencia del suero en la formación de colonias de CFU-E y BFU-E en cultivos con teniendo albúmina, transferrina, selenio y lípidos. (58)

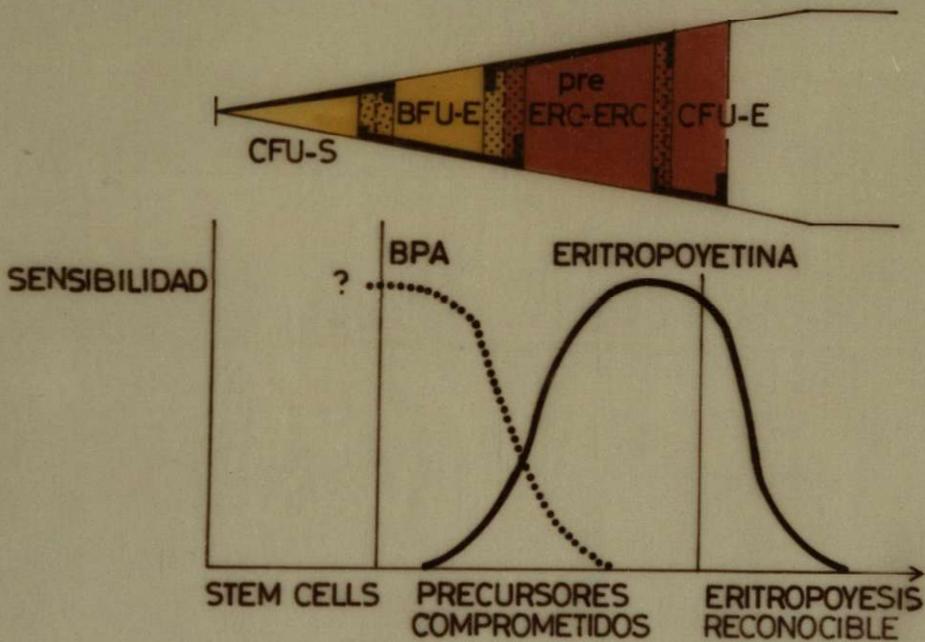


FIGURA 9: Mecanismos de regulación humoral de la secuencia proliferativa-diferenciativa CFU-S y del compartimiento eritroide. En amarillo quedan representadas las etapas celulares dependientes de BPA, incluyendo CFU-S y etapas precoces de BFU-E. En rojo, las etapas celulares dependientes de eritropoyetina ("erythropoietin-responsive cells", ERC), que incluyen fases tardías de BFU-E y la CFU-E. El tránsito entre ambos mecanismos es gradual.

2 7 BURST FORMING UNIT-ERYTHROID (BFU-E)

La detección de una doble actividad eritroide, expresada por distinta cinética y morfología de las colonias resultantes del cultivo "in vitro" de médula ósea, fué inicialmente reportada por Axelrad y cols. en 1974 (5). A la actividad eritroide descrita inicialmente por Stephenson y cols. en 1971 (125), correspondiente al crecimiento de pequeñas colonias celulares sintetizadoras de hemoglobina de aparición precoz en el medio, CFU-E, se añadió una segunda actividad eritroide, de cronología más tardía en su aparición, y cuya morfología incluía un mayor tamaño de las colonias, constituidas por un número de células elevado, entre varios cientos y millares, agrupadas en pequeñas sub-colonias ("clusters") cuyo crecimiento, más o menos disperso, mantenía una cierta entidad geográfica en el cultivo, confiriéndoles un aspecto peculiar denominado "burst" (figura 10). Esta actividad eritroide, expresiva del desarrollo "in vitro" del precursor BFU-E, supuso un modelo experimental de gran trascendencia en el conocimiento de la fisiología de la eritropoyesis, dado el interés que se deriva de su ubicación ancestral, cercana a la CFU-S, así como de su extensa potencialidad proliferativa.

La naturaleza clonal de las colonias de BFU-E fué demostrada por Prchal y cols. (107) merced al estu

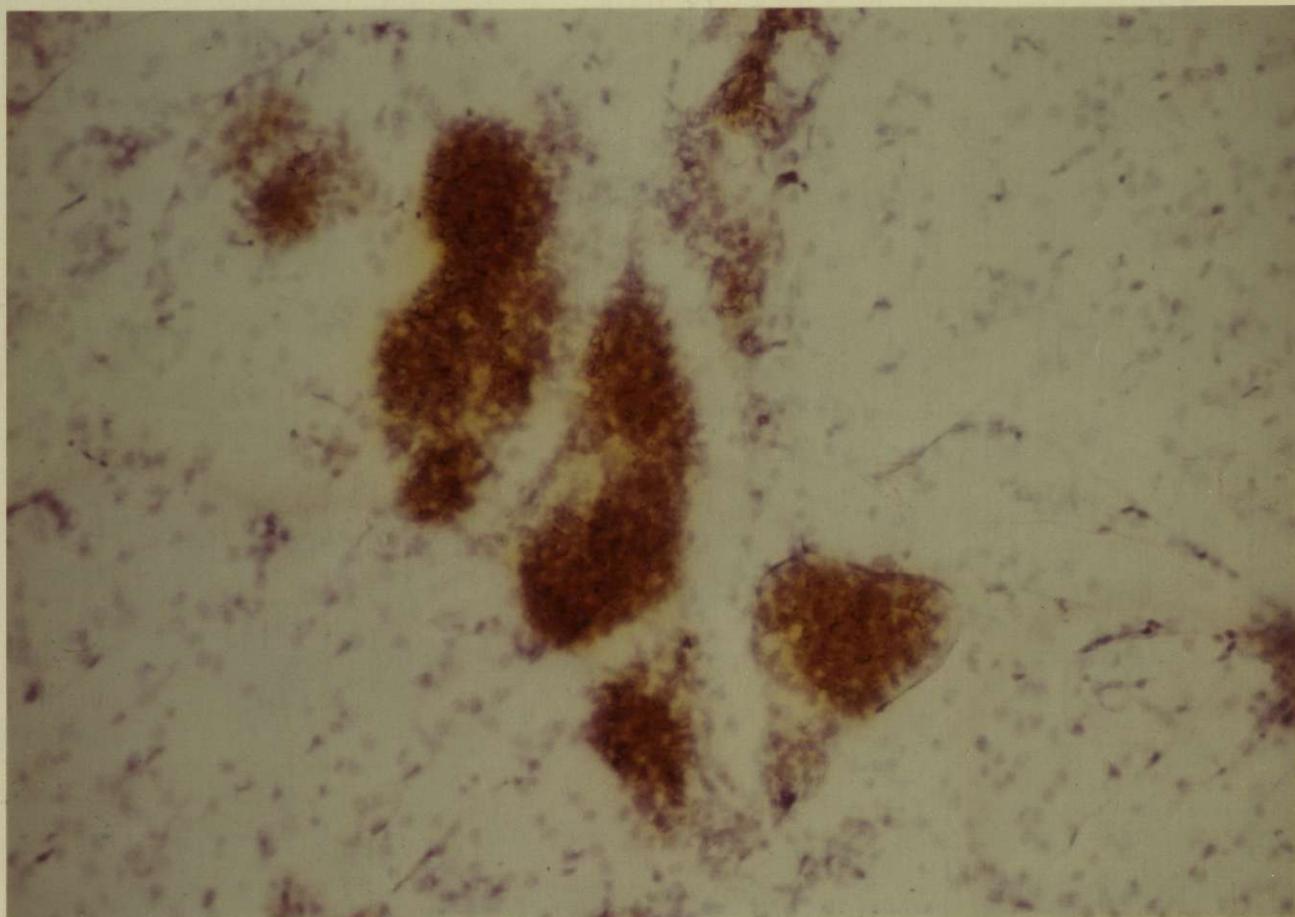


FIGURA 10: Colonia correspondiente a actividad proliferativa de BFU-E en medio de cultivo de coágulo de plasma y en presencia de eritropoyetina. Obsérvese el aspecto disperso de la proliferación, constituida por seis sub-colonias de células benzidina-positivas (x 100).

dio de colonias obtenidas a partir de médula ósea de mujeres heterocigotas para el sistema iso-enzimático de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD) Como es bien conocido, este sistema viene unido al cromosoma X La oportunidad de estudiar este mosaico natural permitió demostrar que en cada colonia individual de BFU-E sólo se hacía aparente uno de los isoenzimas de G-6-PD, guardando entre las colonias una distribución similar a la demostrable en las células de la sangre periférica y otros tejidos

A la luz de la observación de las características en cultivo de ambos precursores, BFU-E y CFU-E, se puede elaborar una teoría sobre el mecanismo de génesis de las colonias de BFU-E Así, considerando que a partir de un precursor originario y a través de sucesivas divisiones celulares, se accede a estadios diferenciativos más avanzados, esta progresión llevaría hasta un número variable, en función del número previo de mitosis, de células descendientes con capacidad, cada una de ellas, para constituirse en origen de una sub-colonia, cuyo mayor ó menor grado de agrupamiento marcaría el origen clonal en una única BFU-E Bajo esta perspectiva, se podría considerar a los precursores eritroides más ancestrales como poseedores de una limitada pero cierta capacidad para la migración en el medio de cultivo semisólido, característica cuya pérdi

da, más o menos coincidente con el inicio en la síntesis de hemoglobina, condicionaría un crecimiento celular abigarrado, denso, propio de las subcolonias constituyentes de la BFU-E, así como de la naturaleza morfológica de las colonias de CFU-E. La capacidad migratoria sería, pues, una característica más de los precursores primitivos de la serie, y su pérdida, en función del progreso diferenciativo, condicionaría el patrón de crecimiento de los precursores más avanzados, cercanos a la caracterización morfológica propia por la síntesis hemoglobínica. De lo expuesto, se podría extrapolar la identificación de las subcolonias de BFU-E como CFU-E, circunstancia de difícil verificación e importancia relativa, dada la probada heterogeneidad, dentro de la secuencia diferenciativa, de los precursores caracterizados "in vitro". Así, la homogeneidad de la actividad eritroide expresada en cultivo ha sido cuestionada por diversos investigadores (6,43,44,100), siendo Gregory y cols los más explícitos al respecto. Para estos autores (43,44), aparte de las colonias de CFU-E, es posible objetivar una doble actividad "burst" in vitro, con una primera expresión en el día tres de cultivo en los precursores murinos y diez-doce en los humanos, seguida de una segunda que alcanza su mayor grado de crecimiento el día ocho en el cultivo murino y entre los días dieci-

siete y veinte en el humano. De una parte, la posible continuidad entre una y otra actividad eritroide no es posible dado que, en todos los casos, la calidad del contenido celular de las colonias es similar, eritroblastos tardíos y células anucleadas, lo que sólo permite una breve supervivencia en el medio, con rápida lisis, que precederá a la aparición de la nueva formación de colonias. Tal circunstancia se cumple, tanto en la transición entre la actividad CFU-E y BFU-E "precoz" como entre ésta última y la BFU-E "tardía". Además, estos autores describen una caracterización morfológica distintas para las tres actividades eritroides "in vitro". Así, para la médula humana la expresividad proliferativa correspondiente a CFU-E viene constituida por un máximo de dos subcolonias por unidad de crecimiento, ampliada a tres-ocho subcolonias para la BFU-E "precoz" y más de dieciseis subcolonias para la BFU-E "tardía". Tal como ha sido referido previamente, las características cualitativas del contenido celular de las colonias son similares para la CFU-E como para ambas actividades BFU-E, con la salvedad de una mayor incidencia de células sin aparente hemoglobinización cuanto más tardía sea la actividad proliferativa observada, correspondiendo al desarrollo de un precursor más ancestral en la secuencia ontogénica de la serie.

Desde las primeras descripciones referidas al cultivo eritroide "in vitro" se hizo evidente la existen-

cia de requerimientos distintos para eritropoyetina entre BFU-E y CFU-E (5) Así, mientras la CFU-E se muestra sensible incluso a pequeñas dosis de eritropoyetina en el medio de cultivo, el desarrollo de la BFU-E requiere de una mayor presencia de la hormona. Experiencias "in vivo", a través de la inducción experimental de cambios en la producción endógena de eritropoyetina en ratones (sangría y plétora), mostraron gran variabilidad numérica en la actividad CFU-E, altamente influenciada y por tanto dependiente de la actividad de la hormona, a diferencia de la actividad del precursor BFU-E que se mostró altamente estable. Del mismo modo, por técnicas de incorporación de timidina tritiada y mediante tratamiento con sulfato de vinblastina, pudo demostrarse una alta actividad proliferativa en el precursor CFU-E, con un elevado porcentaje de sus células en fase activa (S) del ciclo celular, a diferencia de lo observable en el precursor BFU-E, que mostró escasa actividad proliferativa (44). De ello se puede concluir la existencia de una gran amplificación de la actividad proliferativa dentro del compartimiento eritroide, que se inicia en una fase del desarrollo ontogénico en que los precursores (BFU-E) muestran una alta estabilidad celular a la vez que una escasa o nula dependencia de la hormona eritropoyetina en cuanto a la regulación de su proliferación,

hasta alcanzar una etapa caracterizada por precursores ya avanzados en la secuencia madurativa (CFU-E), en los que la actividad proliferativa es notablemente mayor a la vez que estrechamente dependiente de la eritropoyetina. Ambos estadios, de perfecta individualidad y claramente identificables "in vitro", son secuenciales y por tanto admiten la existencia de etapas celulares intermedias, en las que el precursor va asumiendo progresivamente su condición de dependencia a la regulación por la eritropoyetina así como una mayor actividad proliferativa, del mismo modo como hemos ya mencionado previamente la heterogeneidad de ambos compartimientos. Los fenómenos de estabilidad celular y dependencia de efectos reguladores humorales no son progresivos tan sólo en lo referido a la secuencia BFU-E y CFU-E, sino también en la secuencia entre CFU-S y BFU-E, en éste caso respecto a la regulación por otro efecto humoral, la "burst promoting activity" (BPA) (58) (Figura 11)

Como ya se ha señalado previamente, la decisión sobre la síntesis de hemoglobina fetal (Hb F) o hemoglobina adulta (Hb A) se establece a nivel del precursor BFU-E. En este sentido, son esclarecedoras las evidencias experimentales referidas por Clarke y cols (23), en el sentido de que precursores BFU-E de sangre periférica estarían programados para producir colonias

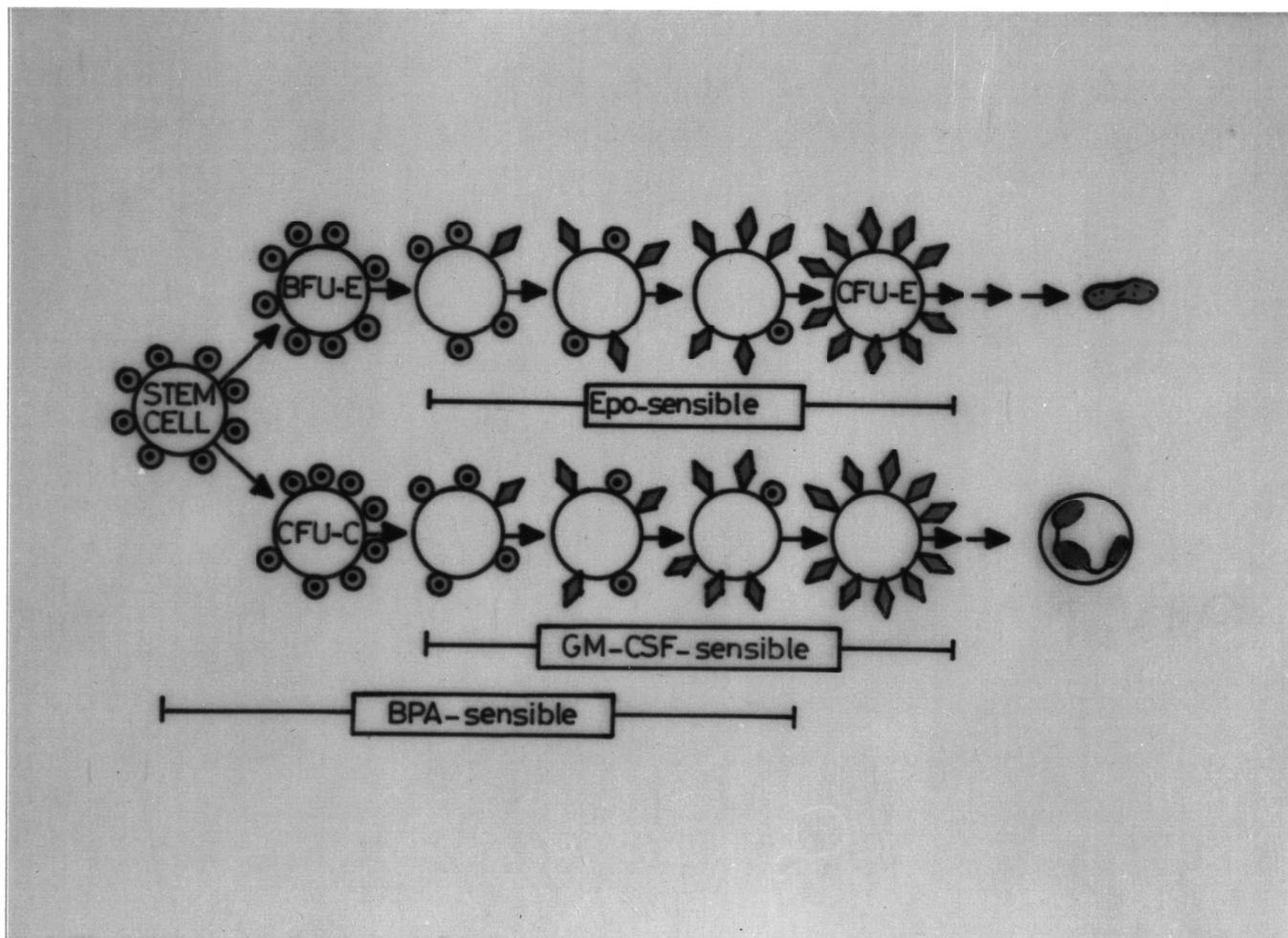


FIGURA 11: Modelo de regulación humoral de la hemopoyesis. Las células de las fases más precoces expresan receptores para BPA (círculos amarillos con punto central), pero no receptores para reguladores madurativos más específicos. En etapas más avanzadas se ilustra la pérdida progresiva de receptores para BPA, simultáneamente a la adquisición gradual de receptores para mecanismos de regulación, correspondientes al compartimiento eritroide y al compartimiento granulocítico-monocítico. (Rombos rojos: receptores para eritropoyetina; rombos verdes: receptores para CSF).

eritroides diferenciadas con un alto contenido en Hb F (siendo por ello denominados progenitores F), a diferencia de BFU-E de médula ósea, que no muestran esta capacidad en condiciones normales. Los precursores periféricos contienen un m-RNA productor de gamma globina, del que carecen los precursores medulares. Sin embargo, bajo condiciones anómalas, como puede ser stress anémico ó ciertas enfermedades hematológicas, la población de progenitores F se expande, detectándose cantidades similares de Hb F en colonias provenientes indistintamente de precursores periféricos o medulares. Ello constituye una adecuada explicación fisiopatológica para la no infrecuente detección de ta sas aumentadas de Hb F en diversas hemopatías (anemia aplástica, anemias refractarias, leucemias, etc) así como en situaciones de eritropoyesis acelerada (tras la reposición de principios madurativos a pacientes anémicos con un déficit específico). Cabe añadir que la decisión del progreso secuencial de progenitores F a progenitores A parece venir altamente determinado por influencias microambientales actuando sobre la BFU-E. En este sentido, es ilustrativa la experiencia de Zanjani y cols (150) en la que la práctica de un trasplante de médula ósea a partir de un feto de ove ja como donante a un receptor adulto irradiado propició en éste último la producción de hemoglobina de ti

po adulto, tras una fase transitoria de producción del tipo fetal, fenómeno de otra parte común en las fases iniciales de regeneración del injerto, expresando presumiblemente un efecto inespecífico de eritropoyesis acelerada. De lo expuesto se podría deducir un nuevo enfoque en la interpretación fisiopatológica de los síndromes talasémicos, expresando posiblemente alteraciones en la secuencia madurativa de BFU-E ó del microambiente de la médula ósea más que una problemática a nivel de ingeniería molecular.

2 8 BURST PROMOTING-ACTIVITY (BPA)

La proliferación y diferenciación dentro del sistema hemopoyético viene regulada probablemente por mecanismos de control específico que actuarían en sub poblaciones de precursores en diferentes estadios dentro de la secuencia diferenciativa. Circunscribiéndonos al sistema eritroide, el papel desarrollado por la hormona eritropoyetina está bien caracterizado dentro del denominado "compartimiento de células sensibles a la eritropoyetina" ("erithropoyetin-responsive cells", ERC). En este sentido cabe afirmar que este compartimiento vendría básicamente definido funcionalmente por su mecanismo de regulación más que por otras características de las células que lo componen. Más precisa se nos ocurre la evidencia de alta dependencia del precursor CFU-E por la misma hormona (58). A diferencia de esta observación, el precursor BFU-E muestra menor ó nula dependencia de la eritropoyetina. Como ya hemos documentado previamente, los trabajos de Gregory y cols son demostrativos al respecto (44). Otras observaciones han demostrado que la BFU-E es capaz de so brevivir en cultivo e incluso alcanzar una cierta acti vidad proliferativa en ausencia de un aporte exógeno de eritropoyetina (56), al tiempo que otras evidencias "in vivo" muestran ausencia de fluctuación en el número y actividad proliferativa de BFU-E bajo la influen-

cia de diferentes niveles de producción de eritropoyetina endógena (58)

El mecanismo que determina la regulación de la actividad proliferativa del precursor BFU-E está aún poco definido, aunque existen múltiples evidencias experimentales que tienden a precisarlo. En primer lugar, a diferencia de la CFU-E, el crecimiento de BFU-E "in vitro" es altamente dependiente de la presencia de suero en el medio de cultivo. Mientras la CFU-E puede desarrollarse de forma estándar en cultivo con sólo un uno por ciento de suero (46), el crecimiento en cultivo de BFU-E requiere un diez por ciento de suero para adquirir un crecimiento comparable, lo que permitió postular la presencia en suero de una actividad biológica distinta a la eritropoyetina, que se denominó "burst-promoting activity" (BPA) (58).

Existen también otras evidencias sobre la producción, a cargo de ciertas células de la médula ósea, de factores necesarios para el crecimiento de BFU-E. Al respecto, el crecimiento de médula ósea normal en presencia de eritropoyetina, mejora su producción "in vitro" de colonias de BFU-E por la adición de medio condicionado de leucocitos de sangre periférica (6). Este efecto se hace evidente en ausencia de células adherentes de la médula (previamente separadas por adherencia a fibras de poliéster), pero no sobre una médula

la cultivada sin previo fraccionamiento lo que sugiere que el medio condicionado leucocitario aporta un factor humoral normalmente producido por las células adherentes de la médula ósea (6) Este efecto biológico de BPA a partir de medio condicionado leucocitario no se hace evidente en ausencia de eritropoyetina en el medio de cultivo, del mismo modo a como es incapaz de producir cambios en la actividad proliferativa "in vitro" de CFU-E

Otras líneas celulares, por su presencia en el medio de cultivo o bien a través de medio condicionado, han mostrado capacidad para generar el efecto biológico de BPA. En este sentido cabe mencionar células de médula ósea de ratón previamente irradiadas (142), linfocitos T (97), macrófagos (41,96), fibroblastos (40), células mononucleares no adherentes resistentes a radiaciones ionizantes (88), etc. La presencia de BPA en suero (98) y orina (33) de pacientes con anemia severa sugiere que la BPA es un regulador fisiológico de la eritropoyesis, de forma que la mayoría de células del compartimento BFU-E lo requerirían para su proliferación.

Ciertas experiencias son demostrativas de que situaciones tales como la inducción de anemia mediante fenil-hidrazina o el cese de una situación de hipoxia "in vivo" generan aumentos séricos de BPA (142)

Estos hallazgos, comparados con los niveles de producción endógena de eritropoyetina, ofrecen un comportamiento paralelo en el primer caso, pero radicalmente opuesto en el segundo, lo que sugiere la existencia de mecanismos distintos en la producción de BPA a los clásicamente conocidos para la eritropoyetina (estímulo hipóxico).

El exacto papel "in vivo" de la BPA en la regulación de la eritropoyesis está por establecer de una forma definitiva, pero el alto nivel ontogénico del precursor y su amplitud proliferativa posterior permiten presumir que este campo constituye un punto crucial en la comprensión definitiva en la dinámica celular de la serie eritropoyética

O B J E T I V O S

=====

3 O B J E T I V O S D E L A T E S I S D O C T O R A L

El desarrollo adquirido por las técnicas de cultivo celular en medios semi-sólidos, junto al empleo de un factor estimulante del crecimiento de la especificidad de la hormona eritropoyetina, han permitido reconocer y deslindar perfectamente dos precursores celulares eritropoyéticos BFU-E y CFU-E. Ambos constituyen eslabones sucesivos de la fase más temprana del compartimento eritroide, de forma que su desarrollo "in vitro" constituye un modelo experimental idóneo en el estudio de factores determinantes en la diferenciación y maduración de la serie roja desde sus etapas más incipientes como compartimiento "comitted".

En esta Tesis Doctoral, a través de la técnica de cultivo del precursor BFU-E presente en la sangre periférica, se pretende establecer la presencia e importancia de mecanismos de interacción celular en su crecimiento, básicamente

- 1º Papel modulador de los monocitos en el crecimiento "in vitro" de la BFU-E
- 2º Ubicación de la BFU-E dentro de las poblaciones celulares linfocitarias
- 3º Efecto de las poblaciones linfocitarias T y B sobre el citado crecimiento de la BFU-E circulante

M A T E R I A L Y M E T O D O S

=====

4 MATERIAL Y METODOS

En la descripción del material y métodos empleados en esta Tesis Doctoral, vamos a considerar sucesivamente los siguientes apartados

- 1º Descripción de la muestra de donantes empleada
- 2º Técnica empleada en el cultivo de los precursores eritroides, incluyendo reactivos, cultivo - en sí, y lectura de los resultados
- 3º Método de valoración de la actividad biológica de eritropoyetina (Bio-ensayo con ratones policitémicos-ex-hipóxicos)
- 4º Técnicas para la obtención de suspensiones de células mononucleares de la sangre periférica
- 5º Técnicas para la separación de poblaciones linfocitarias humanas
- 6º Descripción de los métodos estadísticos aplicados

4 1 DESCRIPCION DE LA POBLACION ESTUDIADA

Para la totalidad de experimentos realizados en esta Tesis Doctoral, se han empleado quince donantes sanos, de ellos doce varones y tres mujeres, con edades comprendidas entre los 22 y 48 años, con una media de edad de 31 años. Algunos de ellos fueron donantes para más de un experimento. Todos ellos pertenecían a la plantilla de empleados del Veterans Administration Hospital de Minneapolis, (Minnesota)

4 2 BASES TECNICAS PARA EL CULTIVO

La descripción inicial del crecimiento de colonias eritroides "in vitro" se remonta a 1971 (125) - Las características más definitorias de esta aportación fueron el empleo de eritropoyetina como estimulante específico de la serie así como la indiscutible filiación eritroide del crecimiento obtenido, dada la capacidad para sintetizar hemoglobina que mostraron los elementos celulares de las colonias. El medio de cultivo empleado fué un rudimento del que sería denominado "Plasma-clot culture system" (Sistema de cultivo en coágulo de plasma), medio semi-sólido que permitió por vez primera la obtención de colonias eritroides correspondientes al precursor CFU-E a partir de células de hígado fetal de ratón. La metodología descrita, fué sometida a perfeccionamientos técnicos que permitieron una mayor resolución en la interpretación de los resultados del cultivo, así como su aplicación a otros sistemas, entre ellos el humano (5,84,129). Del mismo modo, otras técnicas de cultivo semi-sólido, tales como la metilcelulosa (59,99) ó el agar (105) han mostrado también utilidad para el desarrollo "in vitro" de colonias correspondientes a precursores eritroides.

En esta Tesis Doctoral, nuestro sujeto ha sido el desarrollo del precursor BFU-E, para lo que hemos

utilizado sistemáticamente el método de coágulo de plasma siguiendo la técnica descrita en la primera referencia existente sobre BFU-E circulante en humanos (22), que encierra mínimos cambios metodológicos respecto a la técnica descrita primitivamente

Método de cultivo en coágulo de plasma

(Plasma-Clot culture method)

Material

- Jeringas estériles de tuberculina (1 ml)
desechables
- Agujas estériles desechables de calibre 20
- Tubos de plástico para cultivo, de 5 ml
(Bechton-Dickenson, Culture tubes "RTU" nº
7813)
- Platos de plástico estériles para cultivo
(Falcon Plastics)
nº 3001 35 x 10 culture dishe
nº 3003 100 x 20 culture dishe
- Micropocillos (platinillos microtitulados,
Linbro-Scientific, Division of Flow Labs,
no estériles, no procesados, sin cubierta,
en forma de U catálogo nº 76-311-OS)
- Pipetas (estériles, serológicas, de presen-
tación con envoltorio individual)
Falcon Products-Division of BBl
nº 7521 1 ml graduada 1/100
nº 7551 10 ml graduada 1/10
nº 7543 5 ml graduada 1/10
nº 7507 2 ml graduada 1/100

Kimble-Division of Owens, Illinois
nº 72105 0 o ml graduada 1/100
nº 72020 pipeta Pasteur 5 3/4 largo

Clay-Adams
nº 4696 Selectapette pipet tips
nº 4690 Selectapette gun

- Filtros estériles

Falcon Plastics nº 7102 150 ml rejilla
0 45 micras
nº 7103 150 ml rejilla
0 22 micras

Millipore Corp
nº HABG-025-00 rejilla de 0 45 micras
nº SXHA-025-0S rejilla de 0 45 micras

- Porta objetos de cristal

- Cubre-objetos de cristal

- Bálsamo Eukitt (Calibrated Instruments, Inc)
botella de 100 ml

- Estufa de Co₂

- Microscopio invertido

- Microscopio convencional (aumentos x 10 y
x 40)

Método de cultivo en coágulo de plasma

(Plasma-clot culture method)

Reactivos

- Suero de buey fetal (Fetal calf serum), inactivado por el calor (Gibco)
- Alfa-thioglicerol (3-mercapto-1, 2 propanediol 97%, peso molecular 108 16) (Aldrich Chemical Co)
- Seroalbúmina bovina (10%) (Calbiochem Bovina Albumin Fraction 4, grade B, nº 12659)
(Bio Rad Labs Analytical Grade Mixed Bed Resin AG501-x8 (D) 20-50 Mesh, Cat nº 142-6425)
- Trombina (10 u/ml) (Parke Davis and Co cat nº 4-2073-1)
(Trombina tóptica, bovina, 1000 u/ml)
- L-Asparagina (0.2 mg/ml) (Sigma Chemical, cat nº A-8381)
- Alfa-Medio (Modificación alfa del medio esencial mínimo de Eagles)
(Flow Labs cat nº 12-313-54)
- Eritropoyetina
(eritropoyetina urinaria humana, NIH,USA)
- Plasma citratado bovino (PCB)
(Colorado Serum Co cat. nº CS-2605)

Método de cultivo en coágulo de plasma Composición del medio de cultivo (figura 12)

- 0 3 ml Suero de buey fetal
- 0 1 ml Alfa-thioglicerol
- 0 1 ml Seroalbúmina bovina
- 0 1 ml Trombina
- 0 1 ml L-Aspargina
- 0 1 ml Alfa-Medio
- 0 1 ml Células a cultivar en Alfa-Medio
- 0 1 ml Eritropoyetina disuelta en Alfa-Medio
- 0 1 ml Plasma Bovino citratado

Preparación de los correspondientes reactivos antes de su uso en el medio de cultivo

- 1 Suero de Buey fetal (Fetal Calf Serum)
 - Uso directo de Stock (inactivado por el calor, 30' a 56°C y debidamente preservado en congelador)
- 2 Alfa-Thioglicerol
 - 1) Stock A 0 1 ml de Alfa-Thioglicerol y 9 9 ml NCTC 109 10^{-1} M
 - 2) Stock B 0 1 ml de Stock A y 9 9 ml de NCTC 109 10^{-3} M
- 3 Preparación de la Seroalbúmina Bovina (BSA)

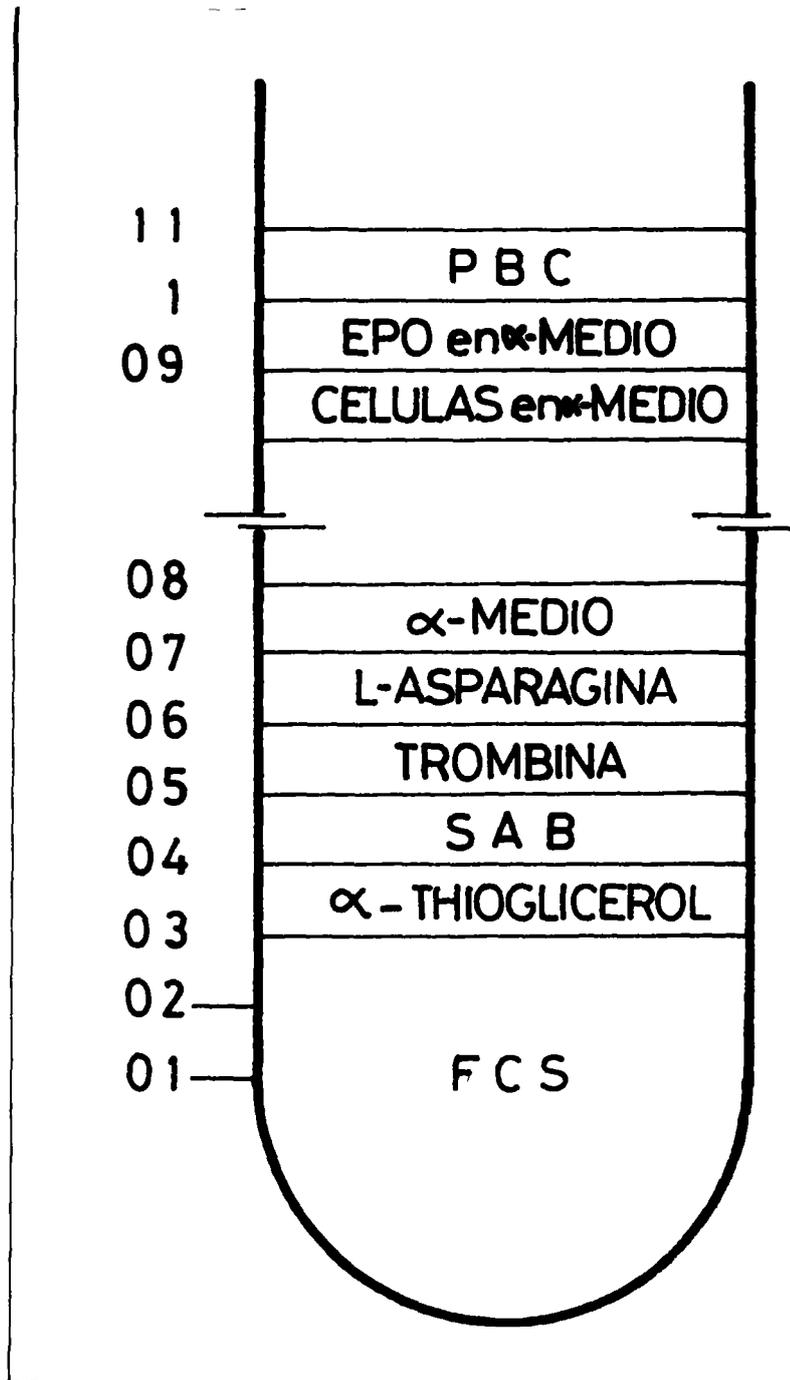


FIGURA 12 Componentes del sistema de cultivo en coágulo de plasma

- P.B C. plasma bovino citratado
- E.P O. eritropoyetina
- S A B seroalbúmina bovina
- F.C S suero bovino fetal

- 1) Veinte gramos de SAB en 36 4 ml de H₂O doblemente destilada y estéril Agitar suavemente en forma rotativa cada 30' por 24 horas, a una temperatura de 4°C
- 2) Después de 24 horas, añadir 2 grs de resina a la SAB Durante las dos horas siguientes, agitar suavemente en forma rotativa cada quince minutos
- 3) Filtrar la mezcla a través de una gasa disponiéndola en un frasco limpio Añadir otros 2 gr de resina Disponer la mezcla a 4°C y agitar suavemente en forma rotativa por una hora Realizar la misma maniobra en la hora siguiente, a la temperatura de la habitación Dejarlo reposar por 24 horas a 4°C
- 4) Filtrar la mezcla a través de una gasa y medir el volumen Hacer la solución isotónica añadiendo 1.1 ml de x 10 PBS para cada 15 ml de SAB La solución pasa a ser 37% peso/volumen
- 5) Determinar el contenido proteico total (método de Lowry) Diluir hasta una concentración de SAB del 10% mediante 1 x PBS Esterilizar la solución pasándola a través de un filtro de 0 45 micras.
- 6) Disponerla en alíquotas de 4 5 ml y congelarla
- 7) Inmediatamente antes de su uso en cultivo, taponarla con CO₃HNa al 7.5%, 0 1 ml No se pue-

de volver a congelar

- 8) Concentración final en el cultivo (1% peso/volumen)

4. Trombina

- 1) Diluir 1 ml de Trombina al 1/1000 u/ml en 99 ml de NCTC. Solución final 10 u/ml
- 2) Congelar en alíquotas de 4 ml
- 3) La concentración final en el cultivo es de 1 u/ml.

5. L-Asparagina

- 1) Diluir 2 mgs de L-Asparagina en 1 ml de NCTC 109
- 2) Filtrar a través de millipore (0.45 micras). Congelar alíquotas de 0.5 ml
- 3) Previo a su uso en cultivo, añadir a la alíquota 4.5 ml de NCTC 109
- 4) La concentración final en cultivo es de 0.02 mg/ml.

6. Medio Alfa

Uso directo del stock

7. Plasma bovino citratado

- 1) Inmediatamente antes de su uso en cultivo, calentar el stock (viene congelado) y alíquotar en pequeños tubos. No debe volverse a congelar para otros usos puesto que ya se han formado

mallas de fibrina y no constituiría coágulos en el me
dio de cultivo en caso de re-utilización

Metodología del cultivo

La técnica que a continuación pasamos a describir debe ser realizada preferiblemente en medio estéril, dándose las condiciones idóneas a través de la utilización de un mostrador de flujo laminar. Asimismo, la manipulación de reactivos y componentes del cul
tivo debe ser ágil y pulcra

- 1) Preparar los componentes del medio de cultivo en cantidad suficiente para el número de dosis requeridas, con un pequeño excedente (una o dos dosis extras). Las células a cultivar en la con
centración adecuada, la eritropoyetina a la di
lución exigida y el plasma bovino citratado deben ser la excepción, ya que deben aplicarse al cultivo en el último momento y en el orden cita
do. Sin ellas y por cada cultivo, el volumen será de 0.8 ml, que quedará depositado en el tu
bo correspondientemente señalado, siguiendo las normas del protocolo experimental.
- 2) Diluir las células a la concentración deseada en 0.1 ml de medio alfa. Añadir la suspensión celular al tubo de cultivo correspondiente.
- 3) Añadir la eritropoyetina, previamente disuelta a la concentración deseada en 0.1 ml de medio alfa.

- 4) Inmediatamente antes del cultivo, añadir a cada tubo conteniendo los 0.8 ml de medio inicialmente preparado + las células en 0.1 ml de medio alfa + la eritropoyetina disuelta en 0.1 ml de medio alfa, 0.1 ± 0.05 ml de plasma bovino citrado (calentado previamente a 37°C), mediante una jeringa de tuberculina de 1 ml estéril con una aguja de calibre 20 adosada. Esta manio
bra debe ser realizada tubo a tubo, usando la -
jeringa -a través de aspirar y volver al tubo re
petidas veces el total del medio de cultivo- a
fin de obtener una mezcla adecuada y distribución
uniforme de las células en el medio. Inmediata-
mente después y con presteza, se distribuye el
total del medio, todavía fluido, en ocho micro-
pocillos dispuestos cada cuatro en el interior
de un plato de cultivo de 35 x 10 mm, cubrien-
do el plato inmediatamente. La rapidez de esta
operación es requerida dado que la mezcla que
constituye el cultivo definitivo coagula a los po
cos minutos de añadir el PBC.
- 5) Los dos platos que contienen ocho micropocillos
correspondientes a cada cultivo del experimento,
se disponen dentro de un plato de cultivo mayor
(100 x 20), quedando espacio para un tercer pla-
to adicional de 35x10, que se llenará de agua

destilada a fin de asegurar la humedad del medio. Tras ello, el plato continente de los tres platos pequeños (dos con cultivo y el tercero con agua) es debidamente cubierto (figura 13)

- 6) Los cultivos se disponen en una estufa de CO_2 en aire con un alto grado de humedad. En el caso de tratarse de cultivos de colonias correspondientes a CFU-E, la concentración óptima de CO_2 será del 1%, realizándose la lectura del cultivo en los días 5-7 de su inicio. Si el cultivo corresponde a BFU-E, la concentración óptima de CO_2 en aire es del 3-5%, realizándose la lectura a los 13-15 días de iniciado el cultivo.
- 7) Al final del período de incubación, los coágulos de plasma conteniendo el cultivo eritroide son extraídos de los micropocillos a fin de cuantificar el crecimiento obtenido. Aunque es posible controlar la existencia o no de su crecimiento e incluso su calidad por observación directa mediante un microscopio invertido, la preparación de slides sobre porta, previa fijación de los coágulos mediante glutaraldehído y prensado manual, permitirá la práctica de tinciones específicas para hemoglobina (benzidina) así como el conteo de colonias por medio de un microscopio normal, mediante aumentos x 10 (BFU-E) y x 40 (CFU-E)

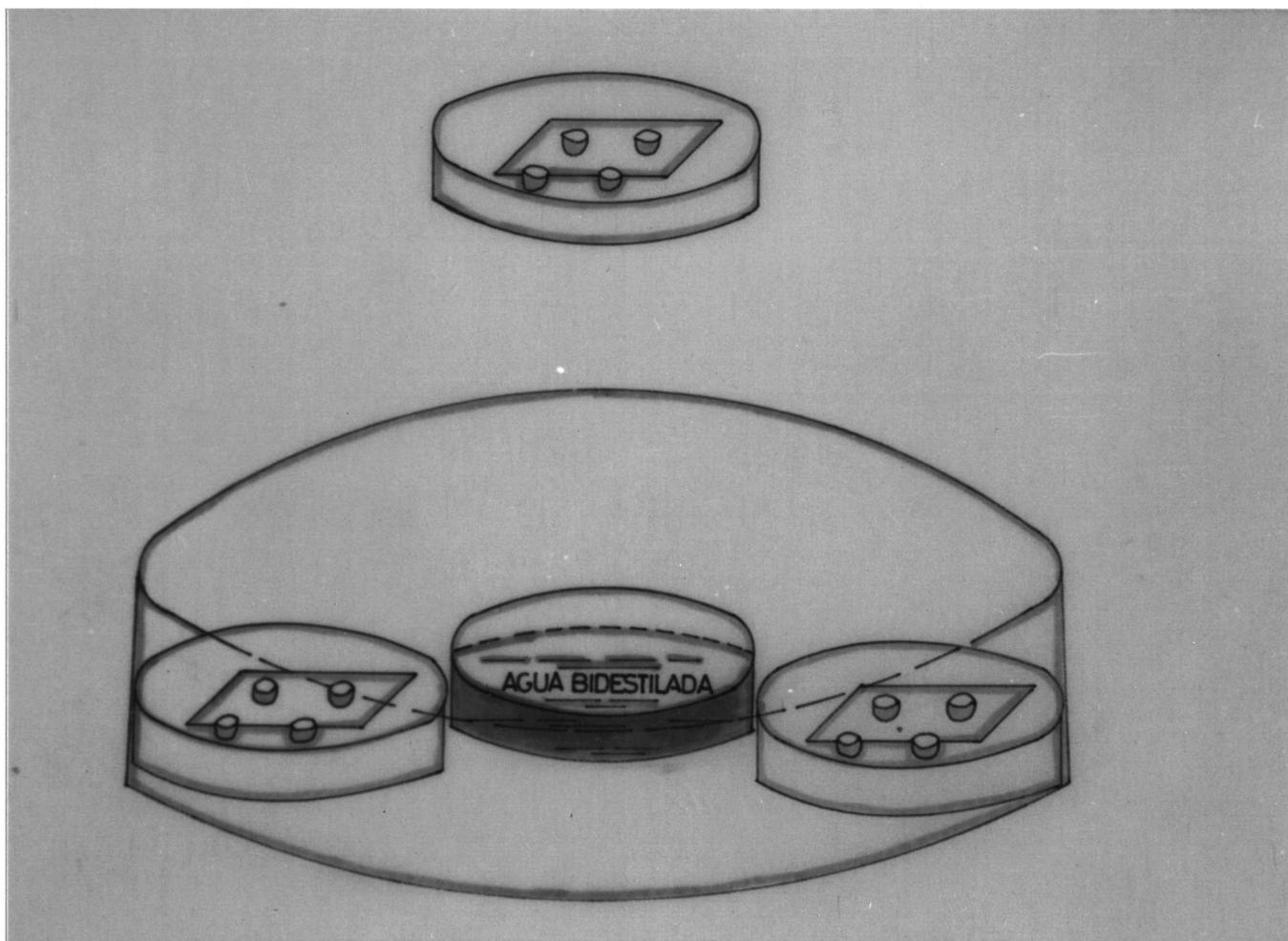


FIGURA 13: Metodología de cultivo en coágulo de plasma. El cultivo se realiza en ocho micropocillos dispuestos en el interior de dos platos de plástico de 35x10 mm, dispuestos a su vez en un plato de plástico de 100x20 mm. La presencia de agua bidestilada en un tercer plato garantiza un elevado grado de humedad, condicionado mayoritariamente por las condiciones ambientales de la estufa donde se realiza la incubación.

Tinción de las colonias

Material

- Benzidina (3,3 Dimethoxy Benzidina Practica, Eastman-Kodak) 1 gr/100 ml metanol
- H_2O_2 Stock de peróxido al 30% Etanol al 70% Diluir 1 parte de stock con 11 partes de etanol
- Hematoxilina de Harris Cualquier preparado comercial

Técnica

- 1) Lavar los portaobjetos ligeramente en una corriente de agua fría por 10 minutos, a fin de retirar totalmente el glutaraldehído usado en la fijación. Dejar secar completamente en aire
- 2) Metanol absoluto, 1'
- 3) Benzidina, 5'
- 4) H_2O_2 , 3'
- 5) Agua destilada, 1'
- 6) Hematoxilina, 8'
- 7) Agua fría corriente, 10'
- 8) Dejar secar completamente en aire
- 9) Aplicar el cubre-objetos, previo depósito de una gota de bálsamo Eukitt. Evitar atrapamiento de gotas de aire

Lectura de los cultivos

Material

- Microscopio ordinario con aumentos de x10 y x 40
- Contador digital

Método

El contaje de las colonias eritroides comporta en primer lugar su reconocimiento como tales, a través del color pardo-rojizo intenso correspondiente a la benzidina-positividad de la hemoglobina contenida en el citoplasma de las células que constituyen las colonias eritrocitarias. Será exigible para considerar una colonia como eritroide, la presencia de la citada benzidina-positividad en todas ó parte de las células que constituyen la colonia. (Es posible la existencia de células en fase previa a la síntesis hemoglobínica, de forma que su identificación eritroide dependerá de coexistir en una misma colonia con otras células claramente benzidina-positivas) De otra parte, es posible el evidenciar en el cultivo colonias correspondientes a precursores de otras líneas no eritrocitarias, del tipo de serie blanca (CFU-C) ó megacariocítica (CFU-M) Su identificación morfológica correrá a cargo de la tinción por la hematoxilina

La identificación de las colonias eritroides como provenientes de BFU-E ó CFU-E, aparte de las circuns

tancias del cultivo (días, origen medular ó periférico) suele ser claramente morfológica. Mientras las CFU-E son colonias habitualmente más pequeñas (se valoran a partir de ocho o más células) y dispersas en el medio, las BFU-E son morfológicamente mayores, con un número de células muy elevado, y característicamente constituidas por agregados de subcolonias (morfológicamente cercanas a las provenientes de CFU-E) en número variable de 3 a 11. En función del tamaño, por tanto, es conveniente realizar la numeración de colonias con mayor aumento en las CFU-E ($\times 40$) que en las BFU-E ($\times 10$). Se cuentan por separado las colonias correspondientes a cada coágulo, estableciéndose posteriormente la media y desviación standard del total de ocho colonias correspondientes originariamente a un mismo cultivo. De otra parte, en múltiples ocasiones es difícil evitar subjetivismos en el conteo de colonias, sobre todo si su número es alto y aparecen dispuestas abigarradamente. Por ello, a efectos de una mayor verosimilitud en los resultados, es conveniente que el conteo se realice por parte de varios observadores a fin de comparar resultados.

4 3 BIO-ENSAYO PARA LA DOSIFICACION DE ERITROPOYETINA

Este método se fundamenta en el uso del modelo experimental de ratones policitémicos ex-hipóxicos (25) En estos animales, la formación "endógena" de eritropoyetina viene abolida por la circunstancia previa de hipoxia prolongada y consiguiente policitemia, seguida de reintegración a presión ambiental, con oxigenación tisular normal En este punto, cualquier incremento en la eritropoyesis, cuantificable por la incorporación de Fe^{59} , expresará la actividad biológica de la muestra inyectada al animal El uso de un patrón internacional de referencia permitirá transformar la incorporación de Fe^{59} en Unidades Internacionales (18).

Material

- Ratones hembra vírgenes Swis-Webster (peso aproximado 22-25 gramos)
- Jeringas estériles de 5 ml Agujas de calibre 25.
- Jeringas estériles de insulina (1 ml)
- Cámara hipobárica
- Fe^{59} (en solución de ClNa)
- Tubos capilares de micro-hematocrito
- Tubos-test de cristal para contaje gamma
- Muestra "standard" de eritropoyetina
- Curva " standard" de referencia (International Reference Preparations of Erythropoietin).

Método

- 1) Para cada espécimen a estudiar se requiere un grupo de cinco ratones
- 2) Los ratones son expuestos por un total de 219 horas a una presión de 0.4 atmósferas (456 mm Hg) en una cámara hipobárica, a razón de 19 horas por día. La presión de la cámara y la duración de la exposición de la hipo-presión deben ajustarse hacia la obtención de los niveles de hematocrito deseados. Debe proveerse a los animales de suficiente agua y comida durante el experimento
- 3) Las muestras a estudiar son procesadas de la siguiente forma
 - Orina La muestra de 24 horas es recogida sin preservativos. Medir el volumen total y guardar una alícuota de 10-15 ml a -20°C
 - Suero Recoger 10-15 ml y congelar a -20°C
 - Otros fluidos corporales Son requeridos alrededor de 10-15 ml. Conservar a -20°C
- 4) Después que los animales han sido expuestos a la hipopresión atmosférica el tiempo pertinente, se les permite la re-aclimatación a presión am-

biental por cinco días

En el quinto día post-hipoxia, la mitad del volumen del espécimen a estudiar es inyectado intraperitonealmente en el grupo de cinco ratones. La mitad restante de la muestra se administra al sexto día.

En el día séptimo, cada ratón recibe 0.5 mCU de Fe^{59} en 0.2 ml de ClNa, por vía IV ó IP.

Setenta y dos horas más tarde, el animal es pesado y previa anestesia (éter), mediante punción cardíaca se obtienen 0.6 ml de sangre que se recoge en una jeringa de insulina previamente heparinizada. Previo llenado de dos tubos capilares de micro-hematocrito, el resto de sangre se deposita en un tubo de cristal pequeño a efectos del contaje gamma.

5) Se calcula el % de incorporación de Fe^{59} mediante la fórmula

$$\% \text{ de incorporación de } Fe^{59} = \frac{\text{CPM/ml sangre} \times \text{vol sangre tot}}{\text{total CPM inyect}} \times 100$$

El volumen total de sangre se admite que constituye el 7% del peso corporal. Aquellos ratones con hematocrito inferior al 54% se excluirán de la consideración estadística. Calcular la media y desviación estándar para el % de incorporación.

- 6) En cada ensayo, al menos se dispondrá de cuatro grupos de control
 - a) Salino
 - b) Suero normal
 - c) 0 1 u.I eritropoyetina
 - d) 0 4 u I eritropoyetina

- 7) El equivalente en U I. de eritropoyetina se determinará por comparación con la curva "estan-dard" establecida por la "International Reference Preparations of Erythropoietin".

4 4 TECNICAS PARA LA OBTENCION DE SUSPENSIONES DE
CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA

Material

- Pipetas (Falcon Products-Division of BBK)
 - nº 7521 1 ml graduada 1/100
 - nº 7551 10 ml graduada 1/10
 - nº 7543 5 ml graduada 1/10
 - nº 7507 2 ml graduada 1/100

- Platos de cultivo (Falcon plastics)
 - nº 3002 60 x 15 mm , estéril

- Tubos-test (Falcon plastics)
 - nº 2070 50 ml tubos plásticos cónicos de cen-
trifuga, estériles (30 x 115 mm)
 - nº 2095 15 ml tubos plásticos cónicos de cen-
trifuga (17 x 120 mm)
 - nº 2003 12 x 75 mm tubos estériles con tapón,
individualmente envueltos, de poliestireno,
6 ml de capacidad
 - nº 2001 17 x 100 mm estériles con tapón, indi-
vidualmente presentados, de poliestireno, 16
ml de capacidad

- Filtros (ya descrito en material y métodos)

Reactivos

Dextrano Salino 3%

8 5 gr ClNa
30 gr Dextrano (Peso molecular 150 000) (Pharma-
cia Fine Chemicals)

Añadir agua bidestilada hasta 1000 ml
Filtrar a través de Millipore a efectos de esterilización

PBS (Phosphate-buffered saline)

1 69 grs $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na H}_2\text{O}$
1000 ml. H_2O bidestilada Monobásico

2. 71 grs $\text{PO}_4\text{H Na}_2$
1000 ml H_2O bidestilada Dibásico

Para preparar la solución, añadir el monobásico al dibásico hasta un pH de 7,4 Diluir 1 10 con H_2O bidestilada para conseguir una solución 0 05 M. A cada litro de solución añadir 8 5 grs de ClNa . Esterilizar pasando a través de un filtro Millipore (membrana de 0 45 micras) Guardar a 4°C Volver a filtrar antes de su uso.

SBSS (Selegmans' Balanced Salt Solution)

15 3	gr	ClNa
0 4	gr	ClK
3 0	gr	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ (si Trihidratado usar 4 9 gr)
0 1	gr	$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$
0 2	gr	$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$
1 4	gr	$\text{CO}_3\text{H Na}$
2 0	gr	D-glucosa
0 006	gr	Acido Ascórbico

Agua bidestilada hasta 2000 ml
Filtrar a través de Millipore

Ficoll-Hypaque

Ficoll 400 (P M 400 000) 9% peso/volumen

Hypaque acuoso 34% (Winthrop Labs)

El hypaque viene presentado al 50% Debe diluirse al 34% por medio de agua bidestilada estéril

La solución final consta de 24 partes de ficoll al 9% y de 10 partes de Hypaque al 34% La densidad resultante es de 1 08 La solución debe esterilizarse por filtración a través de un millipore (0 45 micras) Debe preservarse a 4°C resguardado de la luz La solución es útil durante 60 días En caso de usarse, debe volverse a filtrar

Preparación de la solución standard

Solución A 180 grs de ficoll
Añadir hasta 2 000 ml de agua bidestilada
Agitar vigorosamente

Solución B 566 ml de hypaque al 50%
Añadir agua bidestilada hasta 833 3 ml
Añadir solución A + solución B Mezclar bien

HBSS (Hanks Balanced Salt Solution)

ClNa	8	gr
ClK	0 4	gr
PO4HNa2 2H2O	0 06	gr
SO4Mg 7H2O	0 1	gr
PO4H2K	0 006	gr
Glucosa	1	gr
CL2Ca	0 14	gr
CO3HNa	0 35	gr
Cl2Mg 6H2O	0 1	gr

Presentación en frasco de 50 ml conteniendo so
lución x 10 HBSS Para su uso final, debe añadirse a
los 50 ml de x 10 HBSS, 400 ml de H₂O bidestilada,
10 ml de bicarbonato sódico (17.5 gr/100) y 1 ml de
rojo fenol (1%) Se debe completar la solución añadiendo
agua bidestilada hasta un volumen total de 500 ml
Filtrar a través de millipore Preservar a 4°C Fil-
trar nuevamente inmediatamente antes de su uso

RPMI 1640 (Associated Biomedic Systems, Inc)

Uso directo de la preparación comercial

Tinción de Giemsa

Stock	Giemsa	1 gr
	Glicerina	66 ml
	Metanol absoluto	66 ml

Solución final

HBSS	10 partes
Stock	1 parte

Fijar las preparaciones con metanol al 70% durante un minuto Lavar con H₂O y secar Sumergir en la solución de giemsa durante diez minutos Lavar con H₂O y secar

Tinción Sudán Negro

Disolver 0 3 grs de sudán negro B en polvo en 100 ml de etanol absoluto Ello requiere 1-2 días a temperatura ambiente

Mezclar 16 grs de fenol con 30 ml de etanol absoluto y añadir 0 3 grs de $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua bidestilada Esto es una solución buffer

Formalina solución al 40%

Mezclar 60 ml del stock de sudán negro B con 40 ml del buffer Filtrar por succión Esta solución es estable por varias semanas

Uso de la tinción

Las preparaciones a teñir son secadas al aire y fijadas en vapor de formalina por 10' (Ello se reali

za disponiendo las preparaciones secas en un compartimiento cerrado conteniendo una pequeña cantidad de la solución de formalina al 40%, cuidando de que las preparaciones no entren en contacto directo con la solución) Secar Sumergir las preparaciones en la solución de sudán negro B durante sesenta minutos Lavar en etanol al 50-60% a fin de evitar una tinción excesiva Lavar en agua corriente Disponer las preparaciones en una solución de hematoxilina de Harris Lavar en agua corriente durante cinco minutos Secar en corriente de aire

Tinción de Trypan Blue

Stock Trypan blue (Gibco) 0.4% en salino

Diluir 1/1 en ácido acético al 2% Filtrar (millipore)

Usarlo como la solución de uso corriente en los recuentos celulares en cámara Calcular el número de células viables (las células no viables incorporan el colorante azul en su interior)

Método

Previa obtención de consentimiento documentado, la sangre fué obtenida de punción venosa a partir de donantes sanos, disponiéndola en jeringas esteriles conteniendo heparina pura (sin preservativos)

FRACCION I (F I) Suspensión de células mononucleares
(Linfocitos + Monocitos) (figura 14)

- 1 Mezclar la sangre heparinizada con un volumen mitad (2 l) de PBS (0.05 M, pH 7.4)
- 2 Veinte ml de la mezcla sangre + PBS se deposita sobre un volumen idéntico de ficoll hypaque (densidad 1.08), procurando preservar la integridad de la interfase creada
- 3 Centrifugar el gradiente a 400 g, durante treinta minutos y a una temperatura de 15°C (14)
- 4 Recoger cuidadosamente las células de la interfase (mediante jeringa y aguja, ó pipeta Pasteur), que una vez reunidas serán lavadas x 3 mediante RPMI 1640, ó SBBB, ó HBSS, dependiendo del destino final del experimento (ver más adelante)
- 5 Posibles variantes de esta técnica
 - a) Uso de ficoll hypaque (D 1.08), centrif 25'Ta 15°C
 - b) " " " " " 40'Ta 25°C
 - c) Uso de ficoll paque (X)(D 1.077), " 25'Ta 15°C
 - d) " " " " " 40'Ta 25°C

(X) Ficoll-paque (Pharmacia Chemicals, Piscataway, N J)

FRACCION II (F II) Suspensión enriquecida en linfocitos (figura 15)

Los detalles sobre este método se han descrito

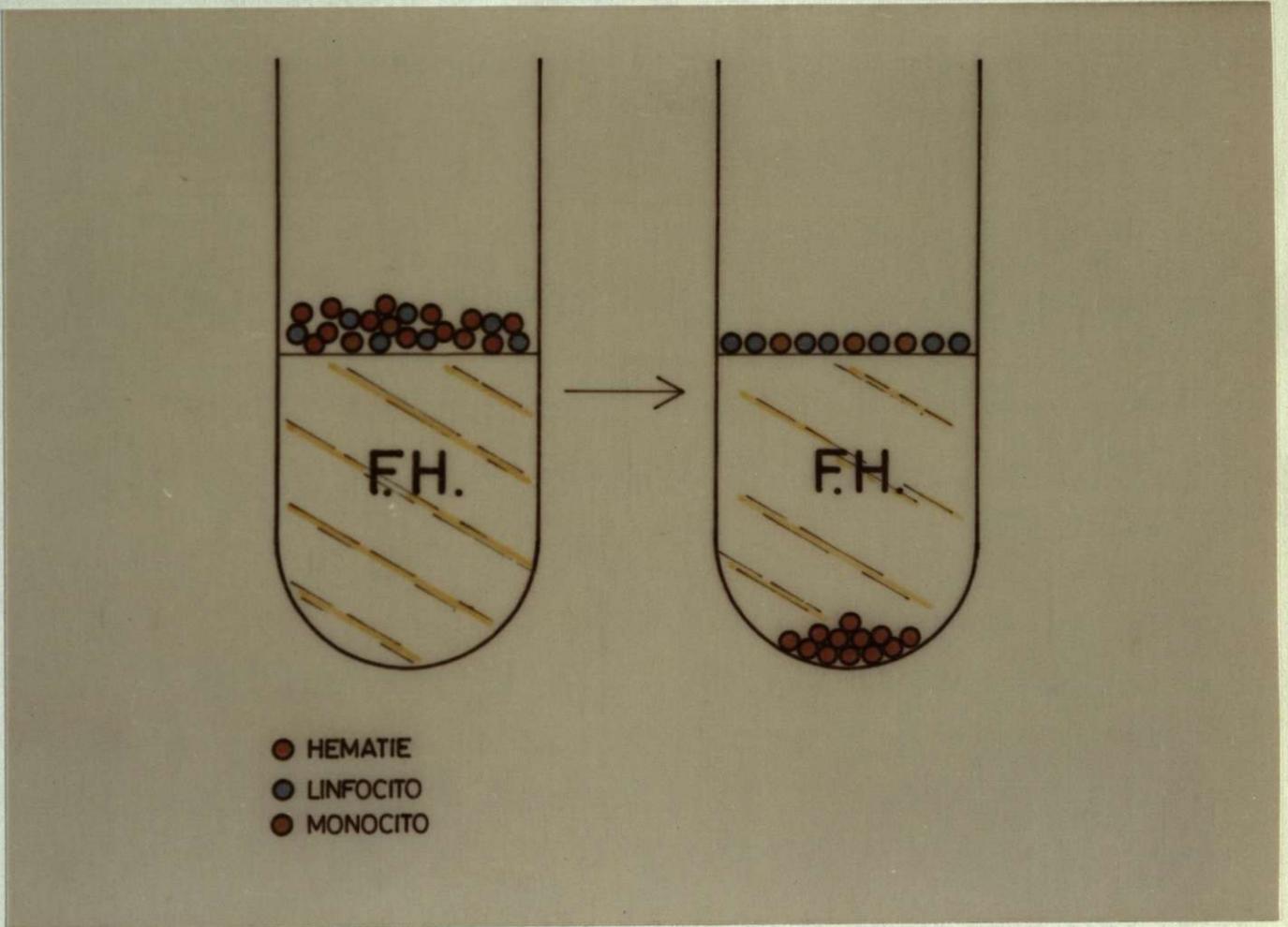


FIGURA 14: Obtención de suspensiones de células mono nucleares de sangre periférica mediante gradiente de ficoll-hypaque. La interfase retiene selectivamente linfocitos (azul) y monocitos (marrón), mientras los hematíes (rojo) sedimentan en el fondo del tubo.

recientemente (111) (figura 15)

- 1 Obtener suspensión de células mononucleares (F I) a través del gradiente de ficoll-hypaque, como se ha indicado anteriormente (Centrifugación a 15°C, 400 g -1550 RPM en PR-6 -30')
- 2 Disponer las células de la interfase (F I) en tubos policarbonatados de 40 ml y fondo redondo Centrifugar por diez minutos a 400 g en SBSS frío (4°C) Lavar x 2 en SBSS, centrifugando durante diez minutos a 190 g y a una temperatura de 4°C Las células deben manipularse con presteza y los sedimentos celulares tras la centrifugación deben resuspenderse vigorosamente a fin de evitar agregados de monocitos Los lavados con SBSS son importantes para retirar las plaquetas de la suspensión celular (Su presencia posterior podría interferir seriamente con el rendimiento de la técnica)
- 3 Resuspender las células en 10 ml de SBSS frío (4°C) Reservar una alícuota de la suspensión celular para contaje celular y fórmula diferencial
- 4 Diluir la suspensión hasta 40ml mediante SBSS y guardar en frío (hielo) hasta que el contaje y fórmula diferencial estén realizados En aquel momento, centrifugar por diez minutos a 190 g, resuspendiendo el sedimento celular en RPMI 1640 con un 20% de suero autólogo inactivado por el calor (56°C durante 60')

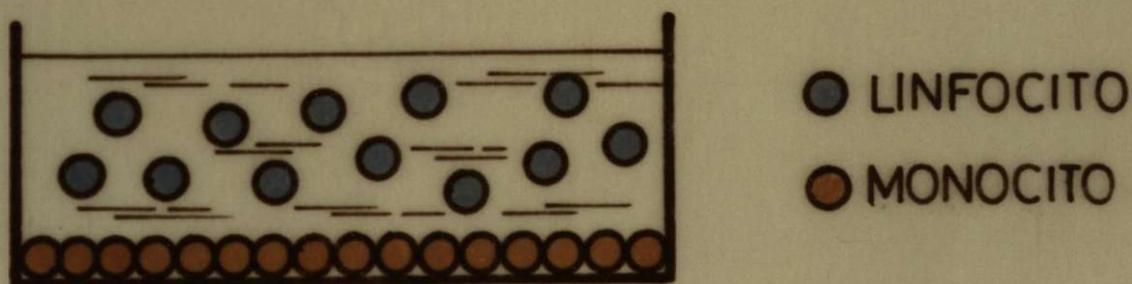


FIGURA 15: Separación de monocitos por adherencia al plástico. Durante la incubación de la suspensión de células mononucleares en platos de plástico, los monocitos (marrón) observan un comportamiento adherente al fondo de plato, quedando los linfocitos (azul) en suspensión.

- 5 Disponer 3 ml de la suspensión celular (4.5×10^6 monocitos) en platos de cultivo estériles de plástico de 60 x 15 mm. Incubar los platos durante una hora a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y alto grado de humedad.
- 6 Pasado el período de incubación (60') Recoger la fracción de células no adherentes por decantación de los platos y x 6 lavados cada uno de ellos mediante 3 ml de HBSS.
- 7 La fracción celular NO ADHERENTE A LOS PLATOS DE PLASTICO constituye la denominada F II, enriquecida en linfocitos (alrededor de un 95% de pureza).

La ausencia de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ en la solución utilizada en las primeras fases de esta técnica (SBSS) es un determinante importante para el mantenimiento de la capacidad adherente de los monocitos como característica selectiva.

FRACCION III (F III) Suspensión linfocitaria "pura"

Existen tres vías técnicas alternativas para la obtención de esta fracción.

A Via Ficoll-Adherencia-Incubación con Fe-carbonilo

- 1 Una vez obtenida la que denominamos fracción II, se resuspende en HBSS con un 20% de suero autólogo inactivado por el calor.

2. Esta fracción II, no adherente, es tratada con Fe-carbonilo (GAF Corp N Y , N Y) a razón de 25 mg /ml , procurando asegurar una mezcla homogénea de partículas finas del polvo de Fe-carbonilo en la -suspensión celular
- 3 Incubar la suspensión a 37°C por 30', a la vez que es sometida a una rotación continua mediante un rotor dispuesto en el interior de la estufa
- 4 Finalizada la incubación, la suspensión celular se deposita en un gradiente de ficoll-hypaque (20 ml), que será centrifugado por 30' a 400 g y temperatura ambiente (Previo al depósito de la suspensión celular en el gradiente, es conveniente cambiarla de tubo, a efectos de liberarla del exceso de Fe-carbonilo que podría provocar disrupción de la interfase del ficoll)
- 5 Tras la centrifugación del gradiente, las células de la interfase final constituyen la denominada fracción III Su contaminación monocitaria debe ser inferior al 1%

B Vía de la doble adherencia

- 1 Partiendo de la fracción II (No adherente a los platos de plástico) suspendida en HBSS-20% suero autólogo (inactivado por el calor) a una concentración de 4×10^6 células/ml, 3 ml de esta suspensión son

reincubados, como en la fase anterior, en platos de plástico para cultivo de 60 x 15 mm , a 37°C y atmósfera de 5% CO₂ en aire, así como alto grado de humedad durante sesenta minutos

2. La fracción no-adherente es recogida por decantación y x 6 lavados de los platos mediante HBSS
3. Previos lavados (x 3) en HBSS (centrifugación a 190 g), ésta nueva fracción no-adherente constituye la fracción III

C Via Dextrano-Fe-Carbonilo - Ficoll-Hypaque (111)

- 1 Mezclar la sangre heparinizada con dextrano salino 3% (proporción de 2 1) Dejar sedimentar durante 30 minutos a 37°C
2. Recoger la capa plasmática rica en leucocitos (superior), evitando en lo posible la contaminación eritrocitaria de la capa inferior
- 3 Mezclar esta capa plasmática con Fe-carbonilo (proporción de 1 gr de Fe-carbonilo por cada 50 ml de sangre de que se partió) Asegurar una mezcla homogénea y fina dispersión del Fe-Carbonilo
- 4 Incubar a 37°C por treinta minutos sometiendo la suspensión a rotación continua en el interior de la estufa
- 5 Tras la incubación, depositar la suspensión en gra-

- dientes de ficoll-hypaque (20 ml) a igual volumen
Centrifugar por 30'a 400 g a una temperatura de 15°C
(Previamente al gradiente y tras la incubación, cam
biar la suspensión de tubo, a fin de evitar la dis-
rupción del gradiente por partículas groseras de Fe
a la vez que valorando el hecho de que los monocito-
s y el Fe se adherirán a las paredes de plástico
del tubo original)
6. Recoger cuidadosamente las células de la interfase
del gradiente y lavar con HBSS (partes iguales de
HBSS y suspensión de la interfase) centrifugando por
15 minutos a 400 g y 15°C Lavar x 2 con HBSS Con-
taje celular y fórmula diferencial
 7. Resuspender las células en RPMI 1640 con un 20% de
suero autólogo (0 FCS) inactivado por el calor, a
una concentración final de 15×10^6 células/ml
 - 8 Depositar 3 ml de la suspensión celular en platos
de cultivo estériles (60 x 15 mm) de plástico Incu-
bar durante una hora a 37°C, 5% CO₂ en aire y alto
grado de humedad
 - 9 Recoger la fracción celular no-adherente mediante
decantación de los platos de cultivo así como x 3
lavados de los mismos, cada uno de ellos mediante
3 ml de HBSS
 10. Lavar la suspensión celular x 3 con HBSS Contaje y
fórmula diferencial El resultado obtenido es la
llamada fracción III

FRACCION IV (F IV) Suspensión enriquecida en monocitos (111)

- 1 Siguiendo la técnica descrita para la obtención de la F II (Suspensión enriquecida en linfocitos), el procedimiento técnico es idéntico hasta el apartado 6 de nuestra anterior descripción
- 2 La fracción adherente a los platos de cultivo, básicamente constituida por monocitos, debe ser recogida tras los seis lavados con HBSS del plato. Para ello se utilizará una solución de lidocaina en SBSS y 10% de suero (ver más adelante). Tres ml de esta solución se depositarán en cada plato conteniendo la fracción celular adherente. Incubar a temperatura ambiente durante 10-15 minutos (Un tiempo superior disminuirá la viabilidad de los monocitos)
- 3 Pasado el tiempo de incubación, aspirar las células con una pipeta Pasteur estéril. Lavar los platos x 1 mediante SBSS, repipeteando
- 4 Resuspender las células en tubos policarbonatados de 40 ml de fondo redondo. Lavar x 2 con SBSS frío (todas las maniobras deben realizarse a baja temperatura y las células deben guardarse en hielo), centrifugando a 190 g por diez minutos. Tras las centrifugaciones, los sobrenadantes deben eliminarse por aspiración (no decantar el tubo)

- 5 Realizar contaje celular y fórmula diferencial El resultado final es la fracción IV, enriquecida en monocitos (superior a 90%)
- 6 Durante la realización del inicial gradiente de fi coll, debe ponerse especial cuidado en no recoger células situadas por debajo de la interfase del gra diente, pues ello propiciaría la contaminación granulocitaria del resultado, dado que los granulocitos se comportan también como células adherentes

SOLUCION DE LIDOCAINA

Lidocaina de stock (40 mg/ml) (Astra Pharmaceutical Products, Inc)

4 38 ml

SBSS 20 62 ml

CO₃HNa al 7 5% 6 gotas

Suero autólogo ó AB (inactivado) 2,6 ml

Tras preparar la solución, comprobar el pH Si es nece rario , ajustarlo a 7 4 mediante CO₃HNa al 7 5%

Suspensión de granulocitos

- 1 Preparar fracción I mediante gradiente de ficoll-hypaque
- 2 Tras la centrifugación del gradiente, recoger el sedimento eritrocitario Añadir un volumen equivalente de suero inactivado (autólogo ó AB ó FCS), diluido en SBSS

- 3 Añadir dextrano salino 3%, en un volumen equivalente a 1/3 del existente
4. Sedimentar durante treinta minutos Recoger la ca
pa plasmática y centrifugar por diez minutos a 200
g
5. Lisar los hematíes mediante H₂O bidestilada esté-
ril, 2 ml durante dos segundos Diluir rapidamen-
te con SBSS hasta 40 ml Lavar x 1 en SBSS Conta-
je y fórmula diferencial
- 6 Guardar las células a 4°C (hielo) hasta su uso, sus
pendidas en SBSS

Consideraciones generales en el manejo de las suspen-
siones celulares

- 1º Las fórmulas diferenciales de las suspensiones ce-
lulares se deberán realizar mediante un doble con-
trol
 - Tinción ordinaria con giemsa
 - Tinción de sudán negro
- 2º Los contajes celulares es aconsejable practicarlos
mediante la técnica del Trypan blue, a fin de eva-
luar la viabilidad celular, especialmente en técni-
cas con gran manipulación celular, larga duración,
ó tras haber guardado las células por un cierto
tiempo antes de su aplicación al ensayo del culti-
vo en coágulo de plasma

3º Antes del uso de las células en cultivo, se procederá a un nuevo lavado con posterior ajuste a la concentración deseada en el cultivo en medio alfa

Todos los procedimientos referidos y las distintas fracciones celulares obtenidas con los mismos se representan en el siguiente esquema (figura 16)

FIGURA 16 Secuencia de técnicas destinadas al fraccionamiento de la suspensión mononuclear de sangre periférica en suspensiones celulares con diferente concentración de linfocitos y monocitos

4 5 TECNICAS PARA LA SEPARACION DE POBLACIONES
LINFOCITARIAS HUMANAS

1 Separación de linfocitos B en columna anti-inmuno-
globulina humana (figura 17)

Material Fragmentos Fab'2 de inmunoglobulina poli-
valente de cabra con especificidad anti-
inmunoglobulinas humanas (146)

- Sefarosa 6 MB

- Columnas de cromatografía 1 x 15 cm

Los fragmentos Fab'2 son acoplados a la
Sefarosa 6MB activada mediante cianuro de Bromo
(CNBr) y posteriormente introducidos en las colum-
nas de cromatografía. El procedimiento es de mayor
extensión y detalle (21)

Método Previamente a su aplicación a las colum-
nas cromatográficas, las células fueron incubadas a
37°C por treinta minutos y lavadas a igual temperatura,
a efectos de eliminar los anticuerpos citofílicos uni-
dos pasivamente a los receptores Fc (55). Una suspen-
sión celular con 200×10^6 células fué aplicado a cada
columna cromatográfica. Después de la elución de la
fracción celular no adherente a la columna (depleccio-
nada de linfocitos B) mediante salino buffer-borato,
la fracción adherente a la columna (enriquecida en lin-
focitos B) fué desprendida aplicando una solución de
inmunoglobulina humana (fracción II de Cohn) a una con-
centración de 10 mg/ml y mediante agitación física
del lecho de resina.

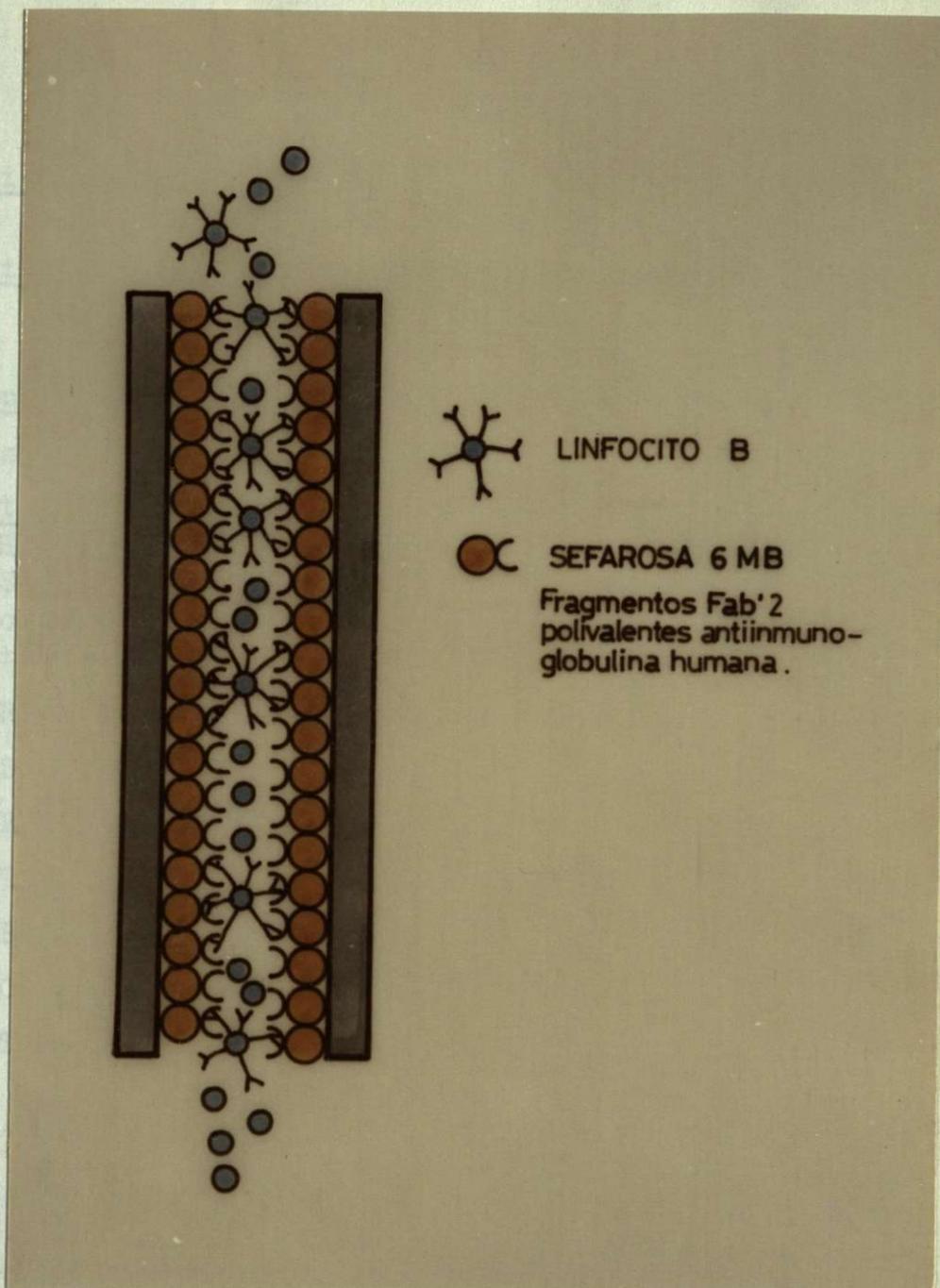


FIGURA 17: Separación de linfocitos B mediante adherencia a columna de sefarosa con anti-inmuno-globulina humana polivalente. Los linfocitos con inmunoglobulinas de superficie (linfocitos B) quedan fijados a la columna, mientras que los que no las poseen (linfocitos no-B) la atraviesan.

<u>Fracción no-adherente</u>	Suspensión depleccionada en linfocitos B
<u>Fracción adherente</u>	Suspensión enriquecida en linfocitos B

2. Deplección de linfocitos T (Macro-método de rosetas espontáneas con hematíes de carnero) (figura 18)

Material

- Hematíes de carnero pre-tratados con AET (62)
- Suero de buey fetal (FCS) previamente absorbido con hematíes de carnero AET-pretratados, e inactivado por el calor
- RPMI 1640
- Suero autólogo
- Ficoll-hypaque
- Tubos policarbonatados de fondo redondo, de 40 ml
- Baño a 37°C
- Centrifuga refrigerada (PR-6)
- Tris-ClNH₄

Método

- 1 Preparar la suspensión celular y realizar contaje de células
- 2 Previo centrifugado a 200 g, resuspender las células en RPMI-1640 con 20% de suero de buey fetal, a una concentración de 5×10^6 células/ml
- 3 Suspender los hematíes de carnero tratados con AET en RPMI-1640 con 20% de suero de buey fetal, a una concentración del 1%

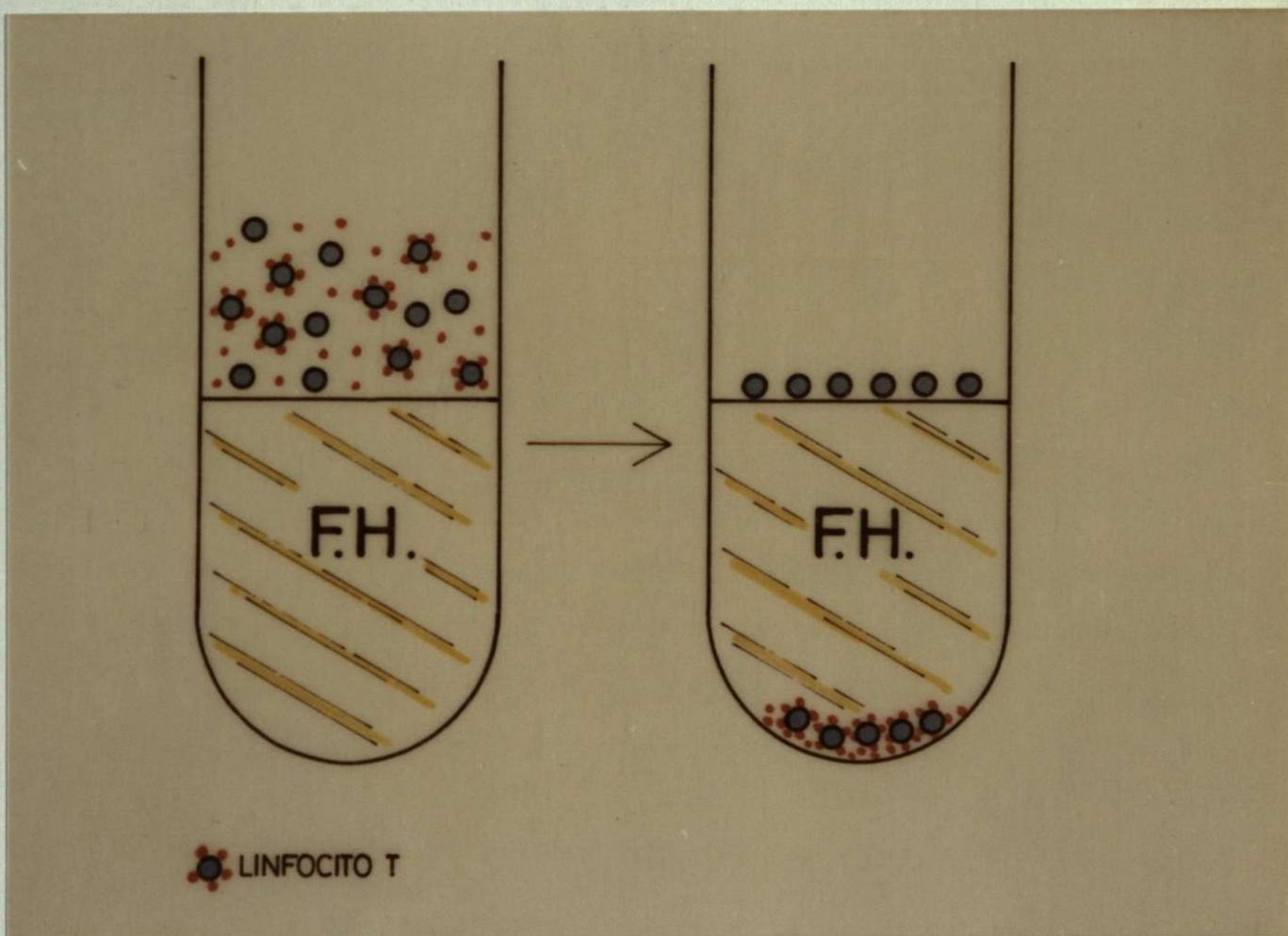


FIGURA 18: Separación de linfocitos T mediante la producción de rosetas espontáneas con hematíes de carnero. Los linfocitos formadores de rosetas (linfocitos T) sedimentan en el gradiente de ficoll-hypaque. Los linfocitos no permanecen en la interfase del ficoll-hypaque.

- 4 En los tubos estériles policarbonatados, añadir 2 ml de la suspensión celular a 2 ml de la suspensión de hematíes de carnero
- 5 Incubar a 37°C en baño de agua, por quince minutos
- 6 Centrifugar a 190 g por diez minutos a una temperatura de 4°C
- 7 Incubar el sedimento obtenido con la centrifugación en hielo (4°C), por espacio de sesenta minutos No agitar los tubos
- 8 Extraer la mitad del sobrenadante de cada tubo y guardarlo Suavemente, resuspender el sedimento en el resto del sobrenadante Aplicar el resultante de 1 ó 2 tubos a un gradiente de ficoll-hypaque (20 ml) Lavar el tubo otra vez con 1 ml del resto de sobrenadante guardado previamente Centrifugar los gradientes a 400 g por treinta minutos a una temperatura de 15°C
- 9 Recoger cuidadosamente las células de la interfase (pipeta Pasteur), lavar x 3 en RPMI Contar CELULAS NO-T
- 10 Reunir los sedimentos de los gradientes Lavar x 1 en RPMI Realizar lisis de hematíes de carnero
 - a) mediante suero autólogo no inactivado (resus

penden en 3 ml de suero autólogo, agitar durante cinco minutos a 37°C - baño de H₂O - ó hasta que la lisis de los hematíes sea completa) Lavar x 2 en RPMI Contar CELULAS T

- b) mediante Tris-ClNH₄
Usar ClNH₄ (9 partes) y Tris buffer (1 parte). Añadir 5 ml de Tris-ClNH₄ a los sedimentos reunidos Incubar a 37°C por cinco minutos agitando. Diluir con SBSS y lavar x 1 centrifugando por 10 minutos a 200 g

La secuencia de métodos de separación de poblaciones queda resumida en la figura 19

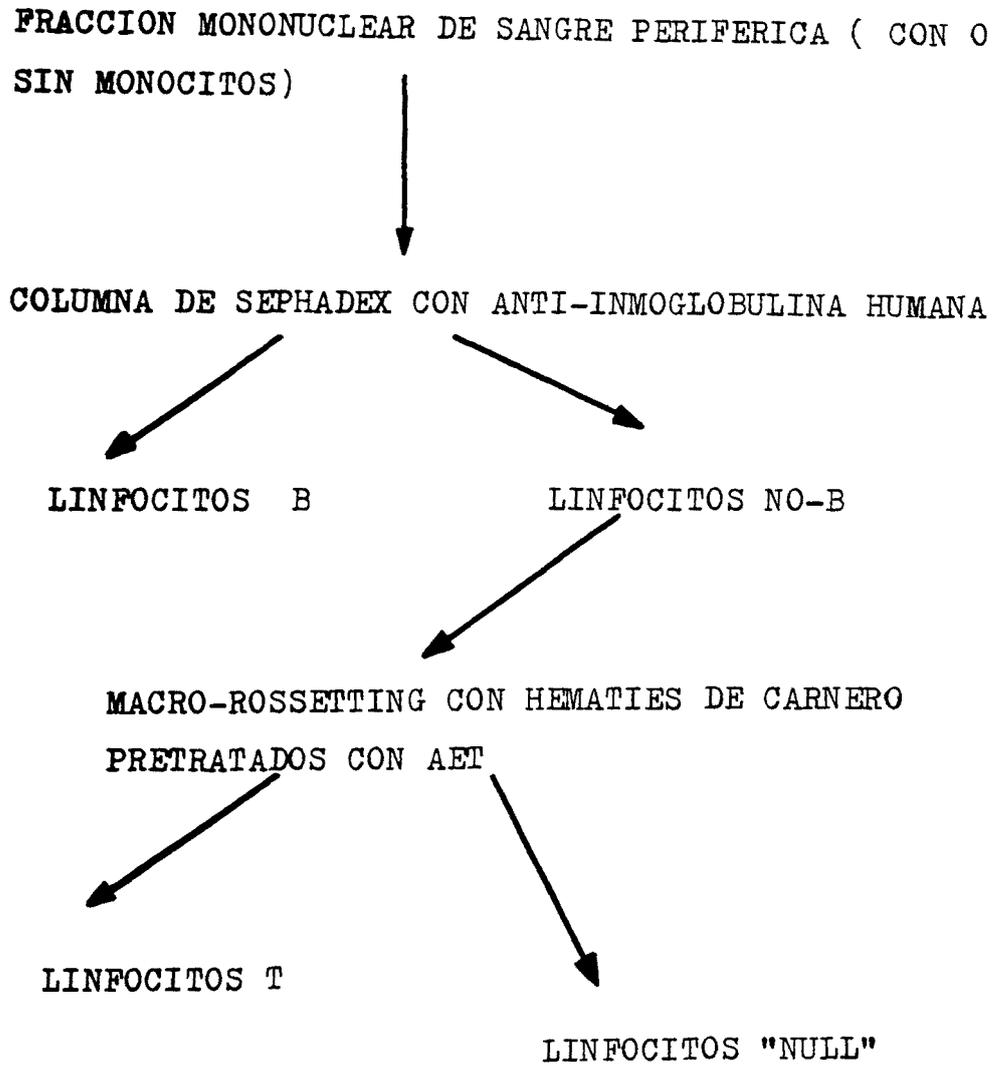


FIGURA 19

Fraccionamiento de una suspensión linfocitaria en sus correspondientes sub-poblaciones

4 6 METODOS ESTADISTICOS

En la presente tesis doctoral hemos empleado los siguientes métodos estadísticos

1. Media aritmética
- 2 Desviación estandard
- 3 Error estandard de la media
- 4 T de Student
- 5 Método de los mínimos cuadrados para correlación

En este capítulo se exponen resumidamente las bases de esta metodología estadística. Se han empleado como referencias bibliográficas los textos de Armigtage (4) y Sokal y Rohlf (123)

1 Media aritmética (\bar{x})

Queda definida por la fórmula

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n} \quad \text{donde}$$

\bar{x} = media aritmética

Σ = suma

X = valores individuales

n = número de observaciones

2 Desviación estandard (s)

Es la medida más utilizada de la dispersión que sufren los valores individuales de una muestra. Se obtiene aplicando la siguiente fórmula

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n}} \quad \text{donde}$$

s = desviación estandard

Σ = suma

X = valores individuales

\bar{X} = media aritmética

n = número de observaciones

3 Error estandard de la media (SEM)

Constituye en realidad la desviación estandard de varias medias, obtenidas a partir de muestras de varios valores individuales. Se obtiene por la fórmula

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{do de}$$

SEM = error estandard de la media

s = desviación estandard

n = número de valores individuales a partir de los que se ha obtenido cada media

4. T de Student (T)

Se obtiene por la fórmula

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{(SEM_1)^2 + (SEM_2)^2}} \quad \text{donde}$$

t = t de Student

\bar{X} = medias aritméticas

SEM = errores estandard

5 Método de los mínimos cuadrados para correlación

Técnica estadística adaptada para analizar si dos variables de una misma muestra se desplazan de modo correlacionado. Para ello se considera

a) Coefficiente de correlación (r)

Va de 0 a 1, siendo 1 la correlación perfecta. Se calcula por la fórmula

$$r = \frac{\sum (X - \bar{X}) (Y - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X - \bar{X})^2 \sum (Y - \bar{Y})^2}}$$

b) Error estandard de r

Se calcula por la fórmula

$$\frac{1-r^2}{n}$$

c) Coefficiente de determinación

Equivale a r^2

d) Significado estadístico de r

Se obtiene a través de la t de Student según la fórmula

$$t = r \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}}$$

e) Ecuación de regresión

$$y = a + bx$$

$$b = \frac{\sum (x - \bar{x}) (y - \bar{y})}{\sum (x - \bar{x})^2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

5 R E S U L T A D O S
=====

5 R E S U L T A D O S

5.1 EFECTO MODULADOR DE LOS MONOCITOS SOBRE LA ERITROPOYESIS "IN VITRO"

En un estudio preliminar, siguiendo las referencias existentes sobre la descripción de un precursor eritroide circulante (22,47,97,104), se procedió a la separación de células mononucleares de sangre periférica de quince donantes sanos, por medio de la técnica del gradiente de ficoll-hypaque (14) Los resultados obtenidos en la aplicación de un número determinado de estas células al sistema de cultivo con coágulo de plasma en presencia de eritropoyetina, queda expresado en la Tabla I

T A B L A I**ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE LA PRESENCIA DE BFU-E EN SANGRE PERIFERICA**

<u>Donantes normales (x)</u>	<u>Nº de colonias de BFU-E/10⁵ células</u>
1	6
2	7
3	11
4	9
5	7
6	12
7	10
8	4
9	11
10	8
11	18
12	9
13	10
14	6
15	7

9 ± 0.8 (media ± SEM)

- (x) La sangre fué diluida con HBSS, dispuesta sobre un gradiente de ficoll-hypaque (densidad 1077) y centrifugada en tubos de cristal a 400G por 30 minutos a 20°C. Las células de la interfase fueron lavadas mediante HBSS y preservadas en tubos de cristal, en hielo por una hora. Posteriormente, se procedió a su cultivo en el sistema de coágulo de plasma con 4 u de eritropoyetina/2 x 10⁶ células a la concentración de 2 x 10⁵ células / 0.1 ml de cultivo.

Ante el hecho de la variable concentración monocitaria presente en la suspensión de células mononucleares obtenidas mediante el gradiente de ficoll-hypaque (tal concentración no venía referida en las publicaciones precedentes acerca de la BFU-E circulante), se iniciaron experimentos destinados a valorar el posible papel de esta variable en el resultado final del número de colonias derivadas de BFU-E obtenidas. De esta forma, se procedió a estandarizar la técnica de separación con el fin de preservar constante el número de monocitos así como su viabilidad en la primera fase de la separación. En etapas posteriores, se procedió a la deplección progresiva y específica de la contaminación de monocitos en la suspensión de células mononucleares. El procedimiento de separación permitió distinguir entre una fracción I de células mononucleares, con contaminación monocitaria importante (30%), una fracción II con sensiblemente menor contaminación (6%), una fracción III, "linfocitaria pura" y finalmente una fracción IV, obtenida a partir de células "adherentes" separadas de la suspensión mononuclear inicial (fracción I), notablemente enriquecida en monocitos (95%)

(111)

La Tabla II muestra los valores obtenidos en cuanto a concentración monocitaria de las sucesivas fracciones, así como su rendimiento en la formación de colonias eritroides derivadas de BFU-E en cuanto fueron aplicadas al sistema de cultivo de coágulo de plasma en presencia de la hormona eritropoyetina

T A B L A II

CORRELACION ENTRE FRACCIONES CELULARES, CONCENTRACION DE MONOCITOS Y COLONIAS DERIVADAS DE BFU-E EN LOS CULTIVOS DE COAGULO DE PLASMA

Fracción celular	% Monocitos	Nº de BFU-E / 10^5 células ^(x)	
		No Ep ^(xx)	4 UI Ep
F-I	30 ± 3	0	1 1 ± 0 5
F-II	6 ± 1	0	10 9 ± 2 5
F-III	0 6 ± 0 2	0	20 7 ± 2 9
F-IV	95	0	0

(x) Los valores representan la media ± 1 error estándar de la media de nueve estudios separados. El conteo de las colonias se realizó en el día +14 del cultivo.

(xx) La eritropoyetina (Ep) usada en estos estudios fué recogida y concentrada por el Departamento de Fisiología, Universidad del Noreste, Corrientes, Argentina, y posteriormente procesada y evaluada biológicamente por el Hematology Research Laboratory, Children's Hospital of Los Angeles, California, con el soporte de la grant HE-10880 del National Heart, Lung and Blood Institute of the National Institutes of Health (USA).

La lectura del número de colonias se realizó mediante un aumento de x 40. Se considero como una colonia derivada de BFU-E la área constituida por grupos de sub-unidades mostrando actividad eritroide a través de la detección de síntesis de hemoglobina en las células, evidenciada por la positividad a la tinción con benzidina.

A concentraciones de 2×10^6 células de fracción III / 1.1 ml de medio de cultivo, no existieron dificultades en la identificación de las distintas áreas de actividad eritroide "burst" (literalmente "explosiva", uso semántico referido a la apariencia morfológica de este tipo de colonias) (Figura 20). Sin embargo, a concentraciones mayores de células en medio de cultivo (3×10^6 /1.1 ml) se hizo más difícil la identificación individualizada de las colonias, que finalmente adoptaban una disposición confluyente, inindividualizable, cuando se cultivaron 4×10^6 células/1.1 ml ó más.

El cultivo de 2×10^5 células de fracción-III/micropocillo en presencia de concentraciones progresivamente crecientes de eritropoyetina permitió apreciar un incremento lineal en el número de colonias eritroides entre las concentraciones de 0.5 a 2 U I de Ep / 1.1 ml de cultivo, estableciéndose un "plateau" a concentraciones superiores (figura 21).

De igual modo, el número de colonias eritroides

formadas fué directamente proporcional al número de células de fracción III cultivadas ($0.5 - 3 \times 10^6$ células / 1 l ml de medio de cultivo) en presencia de una concentración constante de eritropoyetina en el medio de cultivo (figura 22)

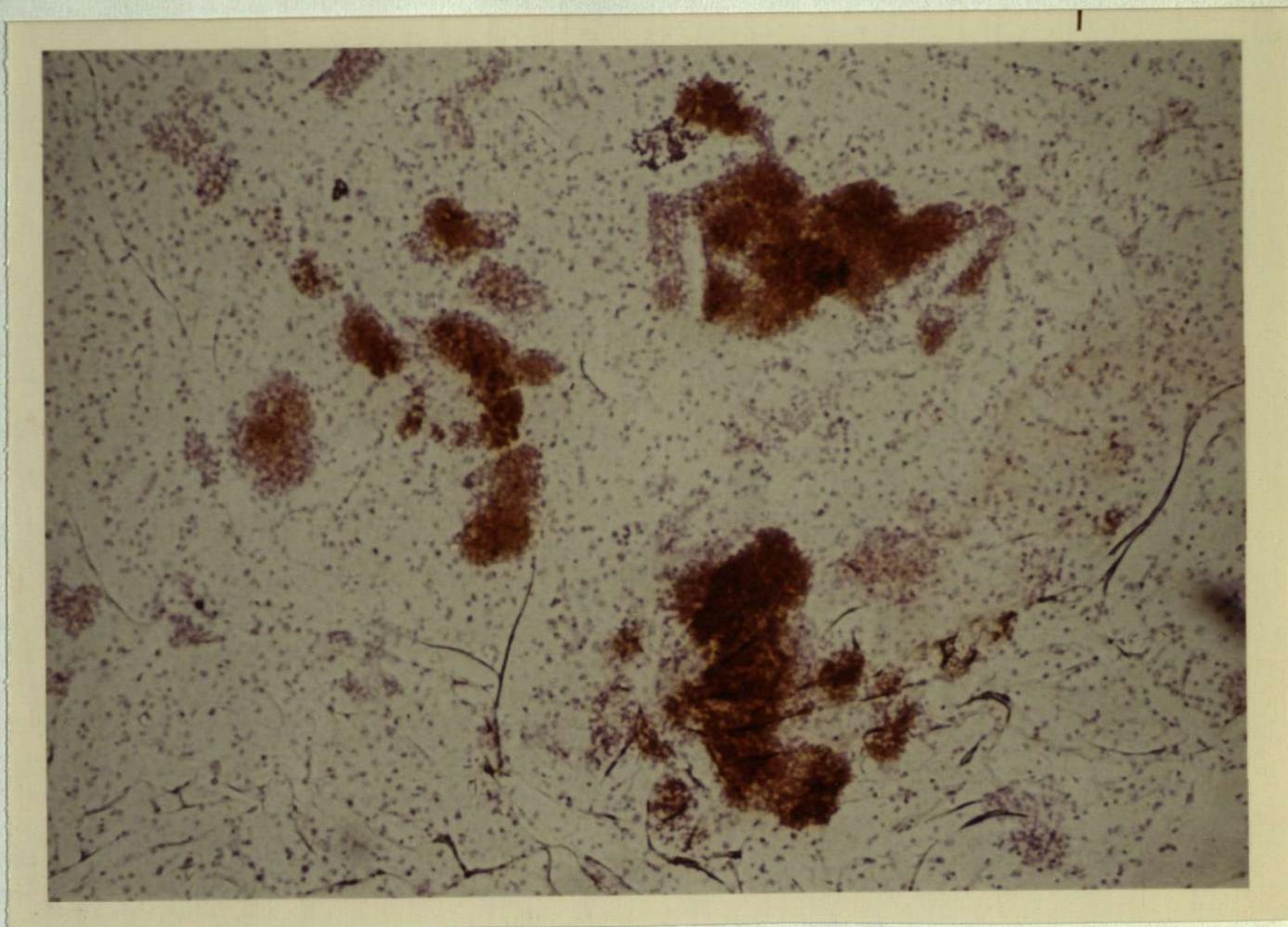


FIGURA 20: Actividad proliferativa de BFU-E de sangre periférica (fracción III, linfocitaria "pura"), en el medio de coágulo de plasma y en presencia de eritropoyetina. Obsérvese la presencia de tres colonias exhibiendo síntesis de hemoglobina y con las características morfológicas correspondientes a BFU-E (x 40).

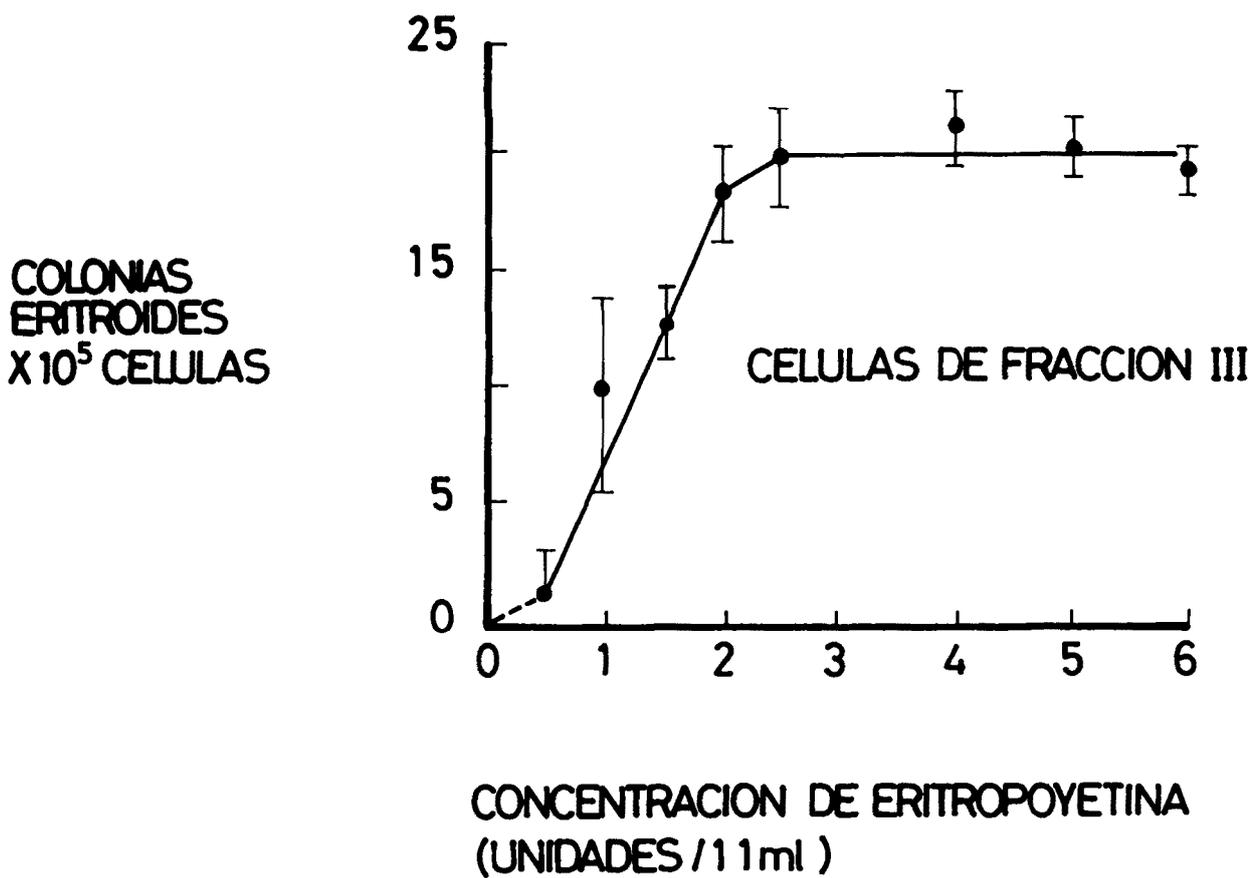


FIGURA 21 Eficiencia en cultivo de BFU-E de concentraciones crecientes de eritropoyetina en el medio (concentración constante de células en el cultivo)

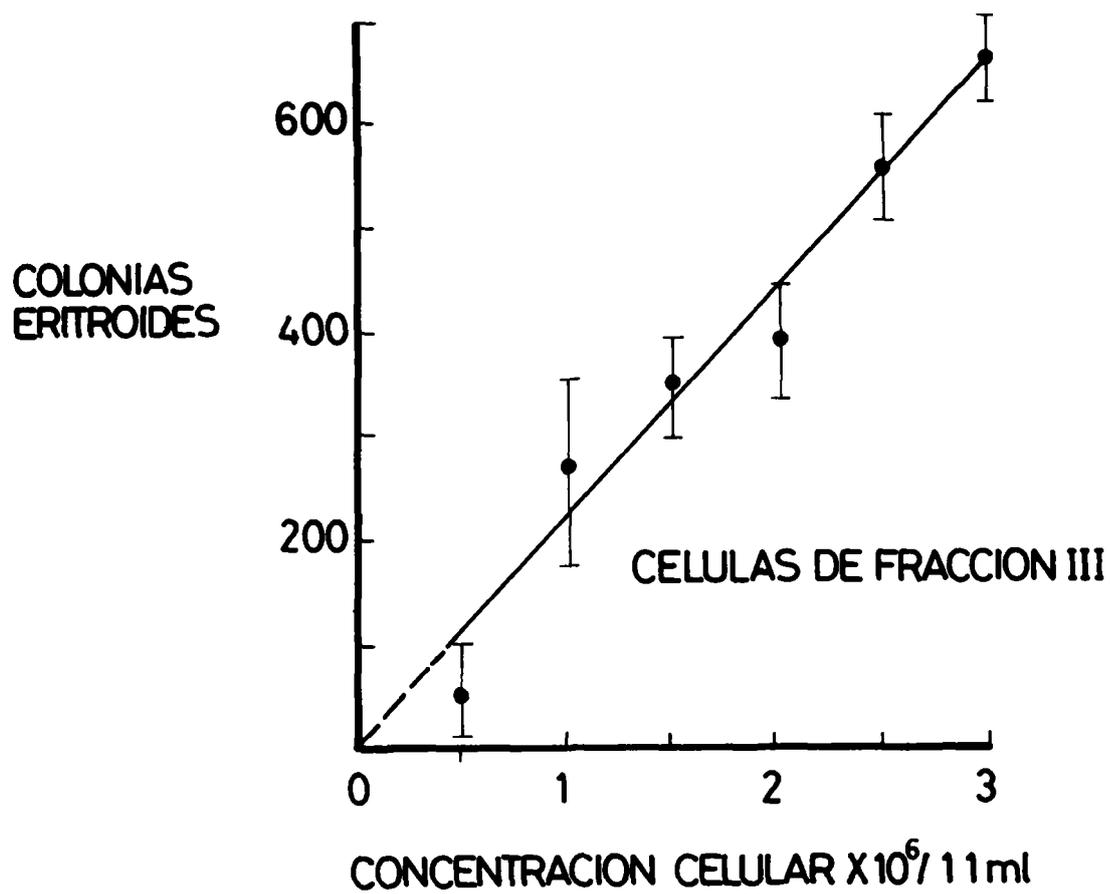


FIGURA 22 Eficiencia en cultivo de BFU-E de concentraciones crecientes de células cultivadas (concentración constante de eritropoyetina en el medio)

Cuando las células de las fracciones I, II y III fueron cultivadas separadamente, el número de colonias eritroides derivadas de BFU-E formadas el día +14 de cultivo, estuvo inversamente relacionado al número de monocitos presentes en cada fracción (Tabla II)

El coeficiente de correlación entre el porcentaje de monocitos (0-15%) y el número de colonias eritroides formadas a partir de 10^5 células de fracción I, II ó III fué de -0.96 ($p < 0.001$) Esencialmente, no se formaron colonias eritroides cuando en el cultivo existió una presencia de monocitos superior al 20% (Figura 23)

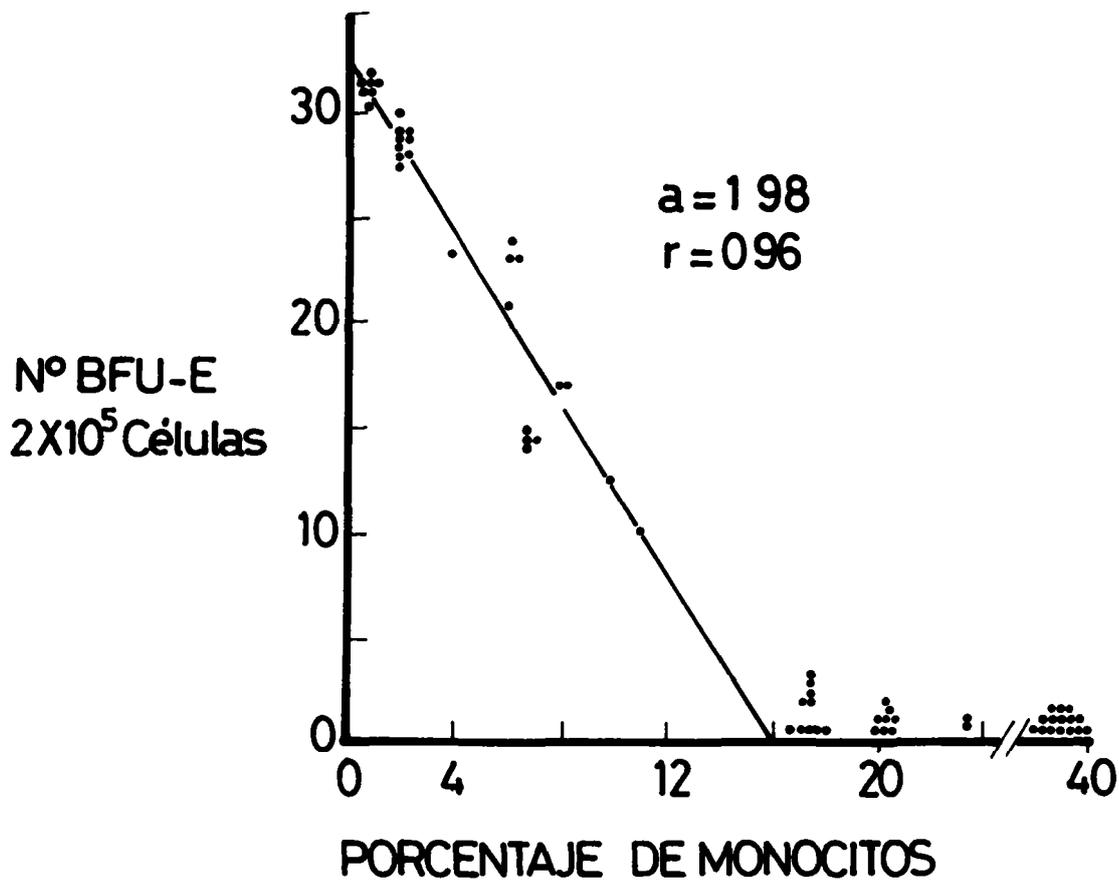


FIGURA 23 Influencia de concentraciones crecientes de monocitos en la actividad proliferativa "in vitro" de BFU-E de sangre periférica ($p < 0.001$)

Para profundizar en el conocimiento del fenómeno de relación entre la concentración de monocitos en cultivo y proliferación de BFU-E, se mezclaron monocitos autólogos purificados (fracción IV) con células de fracción III, llevando a cultivo una concentración final de 2×10^6 células / 1 l ml conteniendo 0, 5, 15 y 30% de monocitos. Bajo estas condiciones, el número de colonias eritroides formadas fue nuevamente inversamente proporcional al porcentaje de monocitos presente (Tabla III)

T A B L A III

EFEECTO DE LOS MONOCITOS AUTOLOGOS PURIFICADOS (FRACCION IV) SOBRE LA FORMACION DE COLONIAS ERI-TROIDES DE UNA FRACCION DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA PREVIAMENTE DEPLECCIONADA DE MONOCITOS (FRACCION III) EN EL MEDIO DE CULTIVO DE COAGULO DE PLASMA

Nº de células de F-III	Nº de células de F-IV	Nº de BFU-E/10 ⁵ células (x)	
		No Ep	4UI Ep
1 4 x 10 ⁶	0	0	17 8 ± 1 0
1 4 x 10 ⁶	600 000	0	0
1 7 x 10 ⁶	0	0	21 4 ± 1 3
1 7 x 10 ⁶	300 000	0	2 1 ± 0 5
1 9 x 10 ⁶	0	0	22 9 ± 1 5
1 9 x 10 ⁶	100 000	0	11 3 ± 1 0

(x) Cada valor representa la media ± 1 error standard de ocho estudios separados. Los valores están referidos al número de células de fracción-III cultivadas. El número total de células (F-III + F-IV) fué de 2×10^6 / 1 l ml de cultivo. La lectura de los cultivos fué realizada el día +14.

En los experimentos descritos previamente, se vino utilizando un número constante de células en el medio de cultivo, independientemente del porcentaje de monocitos que presentaran. Dada la evidente separación de la BFU-E dentro de la fracción mononuclear "linfocitaria", existía la posibilidad de que la reducción observada en la formación de colonias eritroides, directamente proporcional a la contaminación monocitaria, fuera debida a simple dilución de las BFU-E por los monocitos. A fin de examinar esta posibilidad, un número constante de células de fracción-III (99% de linfocitos) fué co-cultivado con proporciones distintas de células de fracción IV (95% de monocitos). Como resultado de ello, el número de colonias eritroides derivadas de BFU-E se redujo ante proporciones crecientes de células de fracción IV añadidas. De ello se pudo deducir que el fenómeno de supresión en la formación de colonias eritroides no era explicable por la simple dilución en la concentración de BFU-E (Tabla IV)

T A B L A IV

EFEECTO DE LOS MONOCITOS AUTOLOGOS PURIFICADOS (F-IV) SOBRE LA FORMACION DE COLONIAS ERITROIDES DERIVADAS DE BFU-E A PARTIR DE NUMEROS CONSTANTES DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA DEPLECCIONADAS DE MONOCITOS (F-III) EN EL MEDIO DE CULTIVO DE COAGULO DE PLASMA

Nº de células de F-III	Nº de células de F-IV	Nº de BFU-E /10 ⁵ células (x)	
		No Ep	4 UI Ep
2 x 10 ⁶	0	0	24 6 ± 2 1
2 x 10 ⁶	40 000	0	18 3 ± 1 8
2 x 10 ⁶	80 000	0	12 9 ± 2 3
2 x 10 ⁶	120 000	0	9 7 ± 1 2
2 x 10 ⁶	200 000	0	5 1 ± 0 8
2 x 10 ⁶	300 000	0	2 6 ± 0 7
2 x 10 ⁶	480 000	0	0

(x) Cada valor representa la media ± 1 error standard de seis estudios separados. Los valores están referidos al número de células de fracción III cultivadas. El número total de células en cultivo va rió entre 2 04 - 2 48 x 10⁶ células / 1 1 ml de medio de cultivo, dependiendo del número de monocitos añadido en co-cultivo.

Dada la evidencia de la imprescindibilidad de la eritropoyetina para el desarrollo "in vitro" de las BFU-E hasta colonias eritroides sintetizadoras de hemoglobina (nunca se obtuvo crecimiento eritroide en ausencia de eritropoyetina en el medio de cultivo), una posible explicación para el fenómeno de supresión del crecimiento eritroide podría venir dada a través del consumo de la eritropoyetina por los monocitos presentes en el medio. Esta hipótesis se perfilaba como poco probable puesto que en los experimentos descritos se utilizó un exceso de eritropoyetina en el medio de cultivo (4 UI/1 ml). Para descartar definitivamente esta posibilidad, proporciones de 1 a 4 x 10⁶ células mononucleares de sangre periférica (fracción I) fueron pre-incubadas con 1-4 UI de Ep/ml por un espacio de tiempo de 0 5 ó 36 horas. Posteriormente, previa centrifugación para eliminar las células, el medio fué sometido a evaluación en cuanto a persistencia de actividad biológica de la eritropoyetina, mediante el denominado bio-ensayo de ratones policitémicos ex-hipóxicos. La ausencia de reducción en la actividad de eritropoyetina del medio pre-incubado con fracción I excluyó de forma objetiva la hipótesis del consumo de eritropoyetina por los monocitos, con la consiguiente reducción en la disponibilidad de la eritropoyetina para las BFU-E (Tabla V)

T A B L A V

EFEECTO DE LAS CELULAS MONONUCLEARES DE LA SANGRE
 PERIFERICA (F-I) SOBRE LA ERITROPOYETINA (Ep)
 "IN VITRO" (1)

Nº de células mononucleares (3)	Unidades de Ep (PRI) / cultivo (2)	
	En medio sólo	Medio + células mononucleares
1×10^6	1 (13 6 ± 1 3) ⁽⁴⁾	1 (14 8 ± 2 1)
1×10^6	2 (19 4 ± 1 9)	2 (17 9 ± 2 3)
1×10^6	4 (16 2 ± 1 7)	4 (16 5 ± 0 8)
2×10^6	1 (8 2 ± 0 9)	1 (9 3 ± 1 0)
2×10^6	2 (12 7 ± 1 1)	2 (15 8 ± 2 9)
2×10^6	4 (15 3 ± 2 0)	4 (14 7 ± 1 6)
4×10^6	1 (11 2 ± 1 2)	1 (13 6 ± 1 4)
4×10^6	2 (9.9 ± 0 5)	2 (11 3 ± 1 7)
4×10^6	4 (19 8 ± 1 8)	4 (19 0 ± 2 0)

- (1) Eritropoyetina y proporciones distintas de fracción I fueron incubadas conjuntamente por 0 5 horas (1 y 2×10^6 células) ó 36 horas (4×10^6 células), a 37°C y atmósfera húmeda de CO₂ al 5% en aire, los controles consistieron en incubación de la eritropoyetina en medio sin fracción I
- (2) El medio fué valorado en ratones policitémicos ex-hipóxicos, convirtiendo el porcentaje de incorporación eritrocitaria de Fe⁵⁹ en unidades equivalentes de Ep por referencia a la curva de dosis-respuesta establecida por la PREPARACION DE REFERENCIA INTERNACIONAL (PRI) de eritropoyetina

T A B L A V

/

- (3) La fracción I usada en la incubación contenía alrededor de un 30% de monocitos
- (4) Los valores entre paréntesis indican el porcentaje de incorporación de Fe^{59} en el ensayo de ratones, inducido por volúmenes similares de medio a partir de cada muestra

A fin de determinar si el efecto de supresión en el crecimiento de BFU-E mediatizada por monocitos pudiera tratarse de un efecto inespecífico inherente al co-cultivo con cualquier línea celular no linfocitaria, se llevaron a cabo experimentos en los que las células de fracción III fueron co-cultivadas con monocitos (F-IV), granulocitos ó bien cultivadas sóloas (TABLA VI)