

00381

RECEIVED
LIBRARY
UNIVERSITY OF
MICHIGAN
ANN ARBOR
MICHIGAN
JUN 10 1964

CARACTERIZACION Y CINETICA DE LAS DIFERENTES
POBLACIONES DE CELULAS SANGUINEAS NUCLEADAS
DE CONEJO BAJO DISTINTAS CONDICIONES DE ANEMIA.

Alejandra Mainero del Paso

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

ANTECEDENTES	Página	1.
INTRODUCCION		
Ontogenia del Sistema Hematopoyético		3.
Origen de las Células Hematopoyéticas		4.
Modelo de la Hematopoyesis		6.
Regulación de la Hematopoyesis		8.
Características Morfológicas de las Células Nucleadas		12.
Hierro y Transferrina: su papel en la hematopoyesis		15.
OBJETIVO		20.
MATERIALES Y METODOS		
Inducción de la Anemia		23.
Obtención de la Sangre		23.
Hematocrito		24.
Hemoglobina		24.
Número de Células Nucleadas y Células Rojas		24.
Preparación de los Frotis		25.
Tinción de los Frotis		26.
Conteo Diferencial		27.
Inyección de Transferrina		27.
Aislamiento de Microlinfocitos		28.
Determinación de Hierro Sérico		30.
Concentración de Transferrina		31.
RESULTADOS		

1er Experimento	Página	34.
2° Experimento		54.
3er Experimento		73.
4° Experimento		89.
DISCUSION		95.
RESUMEN Y CONCLUSIONES		106.
BIBLIOGRAFIA		108.

A N T E C E D E N T E S

La sangre ha representado desde tiempo inmemorial un tópicoco de investigación continuo. Desde la época de Empédocles se consideraba que la sangre constituía uno de los cuatro humores del cuerpo (1), y su estudio se ha proseguido a través de las diferentes épocas históricas enfocándose desde los más diversos puntos de vista. Está formada no sólo por células:leucocitos y eritrocitos, sino también por una amplia variedad de proteínas, lípidos y otros compuestos orgánicos que la facultan para realizar importantes y diversas funciones en el organismo entre las que cabe mencionar:

- i) el transporte de oxígeno a todas las células del cuerpo a través de la hemoglobina contenida en los eritrocitos;
- ii) el transporte de metabolitos y hormonas desde el sitio de su producción y/o liberación hasta los órganos blanco estableciendo la comunicación entre las diferentes partes del organismo;
- iii) la formación de una barrera, en la mayoría de los casos sumamente efectiva, contra la invasión de componentes ajenos a lo propio, a través de la capacidad de algunos de sus componentes celulares para la destrucción de partículas extrañas y la capacidad para establecer la respuesta inmune.

Sin embargo, es poco lo que se conoce acerca de los mecanismos que regulan la diferenciación de las células sanguíneas, de las células que las originan, y de los cambios que se presentan en ellas cuando existe un factor que altere su producción,

ya que los casos en los cuáles puede realizarse una observación más detallada, generalmente corresponden a patologías más o menos severas.

El presente trabajo tiene como propósito la caracterización y el estudio de la cinética de los componentes celulares nucleados de la sangre bajo distintas condiciones de anemia. Para ello, se utilizará un modelo experimental en el cual al sangrar diariamente por punción cardíaca a conejos, se logra la amplificación de los mecanismos que normalmente regulan la producción de células sanguíneas al inducir un estado de anemia así como un posible estado de hipoxia.

I N T R O D U C C I O N

ONTOGENIA DEL SISTEMA HEMATOPOYETICO

Los elementos celulares de la sangre, es decir, eritrocitos, granulocitos, células mononucleares y plaquetas, se originan en los mamíferos de células hematopoyéticas en las células mesenquimatosas o tejido conectivo embrionario. En ellos, estas células se forman primero en las islas sanguíneas del saco vitelino, y más tarde ya en el embrión, en las áreas del tejido mesoblástico (2). Los estudios realizados con embriones de ratón, han demostrado que las células hemopoyéticas de las islas sanguíneas son el único sitio genuino de formación de novo de células madre hemopoyéticas. Toda la hematopoyesis subsecuente depende de la migración, colonización y proliferación de esta población primordial de células madre, cuyo patrón de diferenciación es determinado por las condiciones del microambiente local (3). Este primer periodo se ha denominado Mesoblástico, es de duración desconocida y se caracteriza por la ausencia de un órgano hematopoyético (4).

Posteriormente las células hematopoyéticas se extienden entre las células hepáticas y ya puede encontrarse eritroblastos, megacariocitos y leucocitos granulares, aun cuando los monocitos y los linfocitos pequeños de la sangre adulta no se encuentran en esta etapa, que ha sido llamada periodo Hepático de la hemopoyesis. En el bazo y en el timo, la hemopoyesis es de corta duración, y aunque de predominancia linfopoyética, se encuentran eritroblastos y algunos mielocitos (4). Esta abundante producción es característica de la primera mitad de la hematopoye

sis fetal, y disminuye progresivamente hasta el momento del nacimiento (5).

El periodo final o Mieloide de la hemopoyesis se inicia al establecimiento de la circulación placentaria. La médula ósea toma a su cargo no sólo la leucopoyesis, sino también la eritropoyesis con un aumento significativo en la producción de granulocitos (5). Es así, como se reconoce actualmente a la médula ósea como el órgano hematopoyético por excelencia, conteniendo células precursoras tanto mieloides como linfoides (6). Se ha postulado que las células hematopoyéticas se originan en la médula ósea y es la sangre la que opera el sistema de transporte de estas células a otros tejidos como fuente de células hemopoyéticas, pudiendo regresar al "almacén" provisto por el tejido meloide(6,7).

ORIGEN DE LAS CELULAS HEMATOPOYETICAS

El tejido hematopoyético de mamíferos produce un aporte continuo de células sanguíneas diferenciadas cuyas funciones son esenciales para la vida. Estas células funcionales tienen periodos de vida limitados y son incapaces de autorenovarse; el reemplazo de estas células depende de la actividad de células hemopoyéticas.

Las células madre hemopoyéticas se definen como "células no especializadas, progenitoras ancestrales de las células especializadas de la sangre con la capacidad de proliferación extensiva, y de autorenovación" (7). Por ello, se ha dividido al tejido formador de sangre en tres compartimientos principales. El primero o de las células madre, contiene células con capaci

dad de autorenovarse y de generar células más diferenciadas. El segundo compartimiento, de células poco diferenciadas, contiene células de capacidad proliferativa limitada, que originarán el tercer compartimiento de células especializadas adaptadas a papeles fisiológicos específicos (8).

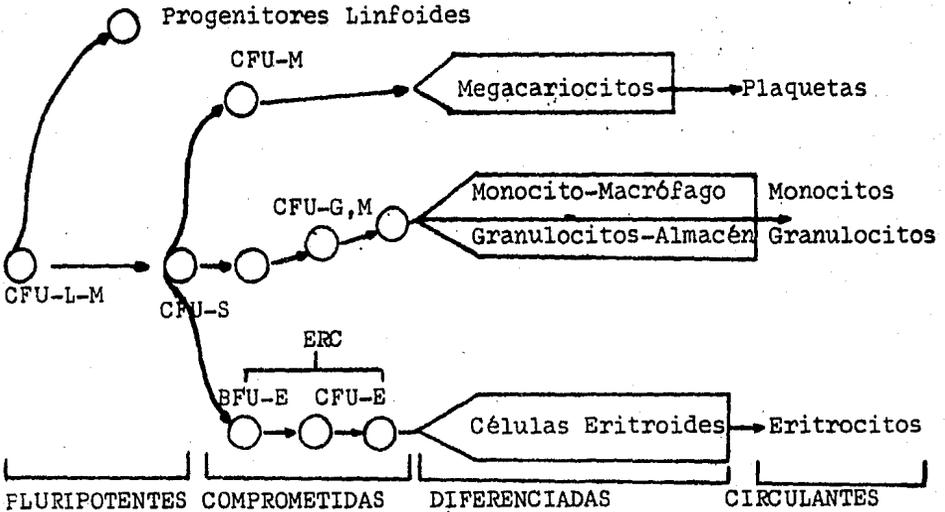
Aun cuando no existe la caracterización morfológica de las células madre, se ha desarrollado una técnica que permite su cuantificación. Este método se basa en la capacidad de una clase de células del tejido hematopoyético de ratones, capaz de originar colonias macroscópicas al ser transplantadas al bazo de ratones irradiados. Estas células reciben el nombre de Unidades Formadoras de Colonias en el Bazo o CFU-S (9,10), y son capaces de diferenciarse en células mieloides, es decir, eritrocitos, granulocitos y megacariocitos. Utilizando marcadores cromosómicos inducidos por radiación, Wu y colaboradores (11) demostraron no sólo que cada una de las colonias esplénicas se originan de una célula madre pluripotente, sino que además, encontraron que esa clona puede contener células formadoras de colonias nuevas, lo cual apoya la existencia de un proceso de autorenovación en las células madre hemopoyéticas.

Estos estudios demostraron que una célula madre de la médula ósea puede formar una colonia que contiene los tres tipos de células mieloides, que esta unidad celular puede proliferar y diferenciarse así como autorenovarse, utilizándose estas características para definir la célula madre hematopoyética pluripotente. Sin embargo en esta conceptualización no se incluía a las células linfoides, a pesar de que numerosos estudios indirectos habían demostrado la relación entre CFU-S y el sistema linfoide. Abramson (1977) demostró por vez primera, que la médula ósea de

ratones adultos contiene una población de células madre pluripotentes, capaz de originar progenie tanto mieloide como linfoide, incluyendo linfocitos T y B (12).

MODELO DE LA HEMATOPOYESIS

Basándose en las evidencias presentadas en los diferentes estudios respecto al origen de las células hematopoyéticas, Que senberry (13) propone el siguiente modelo de la hematopoyesis:



Abreviaturas:

- CFU-L-M Unidad Formadora de Colonias Linfoides y Mieloides
- CFU-S Unidad Formadora de Colonias en el Bazo
- CFU-G,M Unidad Formadora de Colonias Granulocíticas y Macrófagos
- CFU-M Unidad Formadora de Colonias Megacariocíticas
- ERC Compartimiento Celular Sensible a Eritropoyetina
- BFU-E Unidad Expansiva de Colonias Eritroides
- CFU-E Unidad Formadora de Colonias Eritroides

De acuerdo a este modelo, CFU-L-M, la célula madre más primitiva de la cual se derivan todas las células sanguíneas, parece ser una célula con ciclo de vida muy lento, con gran capacidad de autorenovación y diferenciación. CFU-S es una población celular heterogénea cuya vía de diferenciación es influenciada en gran medida por el ambiente local, que se ha denominado microambiente inductivo hematopoyético (HIM) (14). La mayoría de estas células se localizan en la médula ósea, algunas residen en el bazo, y puede encontrárseles en la sangre. El resultado de experimentos de suicidio con timidina tritiada o con hidroxiu-rea, ha mostrado que CFU-S tiene un tiempo de generación relativamente largo o bien permanece en la fase G_0 (15). Sin embargo, puede inducirse a proliferar rápidamente a este tipo celular al disminuir la población de la médula; cuando es moderado el decremento, CFU-S responde proliferando y aumentando la diferenciación, mientras que si se disminuye el compartimiento de estas células por debajo del 10%, no se detecta diferenciación hasta que se ha restituido parcialmente la población por auto-replicación (16). CFU-S es capaz de generar células comprometidas y unipotentes hacia una de las tres vías de diferenciación mieloi- de, originando finalmente megacariocitos, monocitos y granulocitos, y eritrocitos.

Así como se ha utilizado la técnica de formación de colonias para tratar de identificar los diferentes precursores existentes en el compartimiento hematopoyético, Fitchen ha intentado la caracterización de las células madre con base en sus antígenos. Demostró que existen diferencias antigénicas entre los precursores hematopoyéticos y las células que originan, y que las células madre expresan varias clases de antígenos de histocompa

tibilidad (17). Asimismo, se ha mostrado que los progenitores eritroides primitivos expresan antígenos tipo Ia que se pierden al diferenciarse de BFU-E a CFU-E. Utilizando este mismo tipo de antígenos, se propuso una población diferente de precursores para la población de eosinófilos y la que origina granulocitos y monocitos (18).

REGULACION DE LA HEMATOPOYESIS

No se conocen bien los mecanismos por medio de los cuales las células progenitoras hematopoyéticas son inducidas a proliferar y diferenciarse. Menos del 10% de las células CFU-S mantienen su ciclo celular en condiciones normales, mientras que cuando menos 20% de BFU-E y 70% de CFU-E se mantienen en un estado activo de proliferación; la proporción que se ha calculado para la población de CFU-G,M es de 35% (19). Sin embargo, las células se "comprometen" hacia una u otro línea de diferenciación. Si definimos el estado de compromiso como la adquisición de la capacidad para responder a una hematopoyetina específica, puede suponerse que en condiciones fisiológicas, la mayor parte de la regulación hemopoyética ocurre a nivel de células madre ya comprometidas (20).

En diferentes tipos de estudios se ha encontrado que la regulación de la proliferación de CFU-S debe estar mediada por el balance de factores estimuladores e inhibidores. Estos efectos deben ser reversibles, y aun cuando la concentración relativa de inhibidor y estimulador difieren respecto al estado proliferativo de CFU-S, ambos factores se encuentran presentes (21). Actualmente se conoce la necesidad de una ATPasa Na^+K^+ unida a membrana para que tanto CFU-S, como CFU-G,M, BFU-E y CFU-E puedan pro

liferar (19). Asimismo, se postula que la regulación es ejercida a nivel local, y está mediada por interacciones celulares así como por la producción de moléculas reguladoras. Para medir la proliferación y definir los factores reguladores se introdujo dos tipos de sistemas de cultivo. Cuando las células hemopoyéticas se suspenden en un medio semisólido que permite la formación de colonias discretas, todo factor que estimule su proliferación recibe el nombre de Factor Estimulador de Colonias ó CSF. Cuando el medio es líquido, los niveles de células se determinan en función del tiempo, y los factores que estimulan su proliferación se denominan Factores Estimuladores del Crecimiento o GSF.

La producción de granulocitos neutrofílicos y de fagocitos mononucleares (monocitos-macrófagos) parece estar controlada por la Actividad Estimuladora de Colonias o CSA, y la diferenciación hacia uno u otro tipo celular, se determina por el tipo de CSA o su concentración ya que se ha identificado una familia de glicoproteínas con esta actividad (20,22). Los monocitos sanguíneos, linfocitos T, y los macrófagos alveolares, hepáticos y peritoneales son fuentes importantes de este factor. Este mecanismo ha llevado al concepto de regulación positiva, ya que es un producto de las mismas células el que controla la proliferación de CFU-G,M. También se ha demostrado la existencia de un factor que promueve la liberación de los neutrófilos de la médula ósea que recibe el nombre de Factor Inductor de Neutrofilia (NIA) (23) o Factor Liberador de Neutrófilos (NRA) (13). Sin embargo, varios investigadores postulan la necesidad de un control negativo y apoyan la idea con la existencia de calonas. Las calonas se definen como productos de células diferenciadas, tejido-específicas,

no especie-específicas, que inhiben selectivamente células tempranas de la misma clase. Aun cuando la existencia de las colonias es todavía muy controvertida, se han encontrado factores inhibidores de la granulopoyesis y monocitopoyesis. Así, la Actividad Inhibidora de Colonias, CIA, producida por los granulocitos maduros, bloquea la producción y/o liberación de CSA por los monocitos (24). Otros estudios han detectado la asociación de la lactoferrina contenida en gránulos específicos de los neutrófilos, con una inhibición en la producción de CSA (25). Posteriormente se confirmó la identidad de la lactoferrina como CIA, implicándosele como uno de los principales reguladores fisiológicos de la granulopoyesis (26,27). Otro nivel de modulación de este sistema está provisto por la generación de prostaglandina E (PGE_1 y PGE_2), derivada de macrófagos, que funciona como un inhibidor directo de la proliferación clonal de CFU-G,M, y que parece producirse en respuesta a niveles elevados de CSA (28).

Los megacariocitos se derivan de CFU-S y su diferenciación parece estar determinada por factores microambientales. Muchos estudios han indicado que la regulación de la producción de plaquetas depende de una sustancia humoral llamada trombopoyetina, sin embargo, es poco lo que se conoce acerca de este compartimiento (24).

Se ha postulado que el control primario de la producción de eritrocitos está determinado por el balance entre las necesidades tisulares de oxígeno y la capacidad del sistema de aporte de éste, implicándose a la eritropoyetina como uno de los principales factores humorales en esta regulación (20). In vitro, se han identificado dos tipos de precursores eritroides a partir de CFU-S. El primero, conocido como BFU-E, forma colonias con el

número y tamaño de subcolonias dependientes de la concentración de eritropoyetina presente en el medio. CFU-E parece derivarse de las subcolonias y es el precursor de las células eritroides reconocibles morfológicamente en médula ósea. Los estudios realizados por Nathan (29) demostraron que BFU-E se encuentra predominantemente en el tejido mielóide y que puede circular en la sangre, encontrándose en la fracción de células null de los leucocitos mononucleares. Sin embargo, otras investigaciones demostraron que ni un estado de anemia o de hipoxia, condiciones que llevan a la elevación de los niveles de eritropoyetina, provocan cambio en el número o estado proliferativo de BFU-E. Así, se ha propuesto en base a los datos obtenidos, que es necesario el efecto auxiliador derivado de células T y de medios condicionados por linfocitos T, que contienen un componente activo, denominado Actividad Promovedora de células BFU-E (BPA) que actúa como el primer factor regulador de la vía. La eritropoyetina es la molécula necesaria para la proliferación final y la maduración de las poblaciones eritroides (29,30).

Existen otras evidencias, esencialmente morfológicas, que implican a los macrófagos en el control de la eritropoyesis, tanto a nivel de producción de prostaglandinas, como en una interacción célula-célula, si consideramos que existen uno o más macrófagos en el centro de la isla sanguínea o eritrón. Aun cuando se desconoce el papel que juegan estos macrófagos, se les ha implicado en la regulación de la eritropoyesis por su capacidad de estimular la producción de eritropoyetina renal y hepática a través de la elaboración de prostaglandina E_1 (20,31).

Han surgido una gran cantidad de estudios respecto al problema de la regulación, en los cuales se detectan diferentes mo

duladores para cada una de las poblaciones de células sanguíneas por ejemplo, Factor Estimulador de las colonias de Eosinófilos y Factor Estimulador del Crecimiento de Eosinófilos (32). Puede decirse, sin embargo, que el problema de la regulación y diferenciación de las células hematopoyéticas es muy complejo y aun no se resuelve. Se conoce una gran variedad de interacciones celulares, interacciones humorales e interacciones microambientales que se suceden en la hematopoyesis, y es esta rica diversidad la que puede servir como modelo de las relaciones en otros tejidos y órganos formados por una multitud de tipos celulares.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LAS CELULAS NUCLEADAS

La producción de cada tipo celular se inicia con la división mitótica de las células hematopoyéticas ya comprometidas; con la consiguiente reducción de tamaño y la especialización funcional necesaria, que les permite ser reconocibles morfológicamente. Este proceso tiene lugar en la médula ósea, y su resultado es la formación y liberación de células maduras con un alto grado de diferenciación, promedio de vida relativamente corto (horas a semanas) y con excepción de los linfocitos, incapaces de proliferar.

Para su estudio se ha dividido a los precursores en: Serie Mieloide que da origen a los Mieloblastos, Pronormoblastos y Megacariocitos; Serie Linfocítica y Serie Monocítica.

En la tabla 1 se presentan las características morfológicas de los leucocitos; en ella se han incluido tanto lo precursores presentes en el tejido mieloide, como las células circulantes.

En la tabla 2 se presentan las características de la célu-

Tabla 1: Características Morfológicas de los Leucocitos (Tinción de Wright) (4,33)

	C i t o p l a s m a									
	Tamaño	Posición	Forma	Color	Cromatina	M.Nuclear	Nucleolo	Cantidad	Color	Gránulos
Granulocitos										
Mieloblasto	10 - 20 μ	Excéntrico o Central	Esférico u Oval	Morado pálido	Red muy fina	Muy fina	2 - 5	Escasa	Azul	Pocos amorfos filiformes
Mielocito	12 - 18 μ	Excéntrico	Oval	Morado	Fina a gruesa	Indistinta	Pequeños y menos	Moderada	Azul-rosa	Finos a gruesos, redondos e azules
Metamielocito (juvenil)	10 - 18 μ	Central o Excéntrico	Herradura	Violeta pálido	Basi y oxicromatina	Presente	Ninguno	Abundante	Rosa	Centríficos eosinofílicos basófilos
Segmentado (Eosinófilo)	10 - 15 μ	Central o Excéntrico	2-5 lóbulos o más	Azul violáceo oscuro	Muy gruesa	Presente	Ninguno	Abundante	Rosa pálido	Rosa claro rosa violáceo
Eosinófilo	10 - 15 μ	Central o Excéntrico	2-3 lóbulos	Azul violáceo claro	Gruesa	Presente	Ninguno	Abundante	Rosa azul	Abundantes, homogéneos, filiformes
Basófilo	10 - 15 μ	Central	2 lóbulos	Azul violáceo pálido	Gruesa	Presente	Ninguno	Abundante	Rosa pálido	Muy gruesos homogéneos y filiformes
Linfocitos										
Linfoblasto	10 - 18 μ	Central o Excéntrico	Esférico u oval	Morado pálido	Partículas punteadas poco finas	Moderadamente densa	1 - 2	Escasa	Azul-pálido	Ninguno
Linfocito	7 - 18 μ	Excéntrico	Esférico, dentado ligero	Violeta oscuro	Masas moderadas a grandes	Densa	Ninguno	Escasa	Azul-cielo rosa claro	Ninguno o pocos amorfos filiformes
Monocitos										
Monoblasto	14 μ o más	Central	Esférico u oval	Morado pálido	Fina y fibrosa	Presente	1 - 2	Escasa	Azul cielo o grisáceo	Ninguno o pocos
Promonocito	12 - 20 μ	Central	Identado	Azul pálido	Fina	Presente	0 - 1	Moderada	Grisáceo o azul acero	Algunos violáceos.
Monocito	12 - 20 μ	Central o Excéntrico	Esférico, herradura u oval	Azul violáceo pálido	Fina, reticulada o en madeja	Presente	Ninguno	Abundante	Grisáceo o azul-acero	Abundantes, violáceos o azul-acero

Tabla 2: Características de las Células Eritroides (Tinción de Wright) (4,5)

	CELULA	N U C L E O						C I T O P L A S M A		
	Tamaño	Posición	Forma	Color	Cromatina	M. Nuclear	Nucleolo	Cantidad	Color	Gránulos
Prorormoblasto	20 - 25 μ	Central	Esférico	Morado	Fina, en gránulos pequeños	Muy fina	Uno o más	Moderada	Azul	Ninguno
Normoblasto Basofílico	16 - 18 μ	Excéntrico	Esférico	Violeta rosáceo	Gránulos gruesos	Indistinta	Ninguno	Escasa	Azul oscuro	Pequeños perinucleares
Normoblasto Policromatófilo	12 - 15 μ	Excéntrico	Esférico	Violeta oscuro	Gránulos muy gruesos	Indistinta	Ninguno	Moderada	Verde grisáceo	Ninguno
Normoblasto Ortocromático	10 - 15 μ	Excéntrico	Irregular	Morado oscuro	Grandes masas	Indistinta	Ninguno	Abundante	Rosa grisáceo	Ninguno
Reticulocito	10 μ	EXPULSION DEL NUCLEO							Azul grisáceo	Ninguno

las eritroides en su proceso de maduración en la médula ósea has ta convertirse en eritrocitos circulantes.

HIERRO Y TRANSFERRINA: SU PAPEL EN LA HEMATOPOYESIS

El hierro, en cualquiera de sus dos estados de oxidación (FeII ó FeIII), participa en una amplia gama de reacciones bioquímicas que incluyen aquellas que controlan el flujo de electrones a través de las vías bioenergéticas; la activación de oxígeno molecular, nitrógeno e hidrógeno; la descomposición de derivados nocivos del oxígeno tales como peróxido y superóxido; la síntesis de DNA; y la unión de oxígeno a moléculas como la hemoglobina, mioglobina y hemoeritrinas (34). En estos procesos participan enzimas que contienen hierro o son influenciadas por cofactores que poseen hierro, como ejemplos pueden mencionarse: citocromo c, catalasa, citocromo oxidasa, xantina oxidasa, deshidrogenasa succínica, aconitasa, peroxidasa y triptofano pirrolasa (35). La variedad de funciones implicadas, da cierta veracidad al comentario de Neilands quien hipotetizó que, "la vida en cualquiera de sus formas, sin hierro, es prácticamente imposible" (34). A lo largo del universo biológico los organismos han desarrollado moléculas específicas para el secuestro del hierro, lo cual mantiene al elemento en forma soluble y disponible, para su transporte y la biosíntesis de proteínas y enzimas. La existencia de múltiples sistemas de unión a membrana y transporte, y el control de su expresión y función por el hierro, está ampliamente documentada en Escherichia coli, Salmonella typhimurium y Ustilago sphaerogena (36). En los vertebrados, la función de captación de hierro es desempeñada por dos proteínas: la transferrina, que se encarga de transportarlo y, la ferritina, de almace-

narlo.

En el sistema hematopoyético se involucra tradicionalmente al hierro únicamente en el importante papel de componente primordial en la síntesis de hemoglobina. Sin embargo, son cada vez más los estudios que relacionan a este metal con los leucocitos. Así se ha demostrado que una función importante del hierro y las proteínas que lo acarrearán, es el control de la circulación de linfocitos; la unión del hierro con la lactoferrina confiere a esta proteína la capacidad de regular la producción de granulocitos y macrófagos (26,36). También se ha implicado al hierro en la regulación de la expresión de un marcador de superficie en linfocitos de mamíferos (36), y en caso de existir una deficiencia de hierro, se encuentran cambios patológicos tanto en los leucocitos polimorfonucleares como en los linfocitos afectando incluso la respuesta inmune (35,37,38).

Las transferrinas comprenden una clase de proteínas formadas por una cadena polipeptídica única, con dos sitios para unir al metal y que requieren la participación de un anión en este proceso. Las tres moléculas transportadoras de hierro son: transferrina sérica o siderofilina que es la molécula conocida con el nombre genérico de transferrina; lactoferrina, que se presenta en la leche, lágrimas y leucocitos; y, ovotransferrina o conalbumina que se encuentra en la clara del huevo de las aves.

La transferrina es una glucoproteína, de cadena polipeptídica única, de peso molecular cercano a los 77,000 daltones. Sintetizada principalmente por el hígado, contiene aproximadamente 680 residuos de aminoácidos y un 6% de carbohidratos unido a la proteína en una o dos cadenas de heterosacáridos ramificados que terminan en residuos de ácido siálico. Los estudios hechos

con transferrina diférrica de conejo en cristalografía de rayos X con una resolución de 6 \AA , muestran que la molécula consiste de dos lóbulos de aproximadamente el mismo tamaño y con los ejes principales inclinados cerca de 30° hacia cada lóbulo. Las dimensiones máximas de la molécula son de $100 \times 50 \times 40 \text{ \AA}$, y, cada lóbulo contiene un sitio de unión al metal que al unirse provoca un cambio conformacional en la molécula (34,39).

La apotransferrina, forma sin hierro, reacciona con el hierro y un anión (generalmente bicarbonato), para formar un complejo ternario en el cual el hierro se encuentra en su estado férrico. Circula en la sangre y líquido intersticial del cuerpo aceptando hierro de los sitios de absorción, almacenamiento y liberación de sustancias degradadas que contienen hierro. Dona el hierro a células en procesos de división y crecimiento, particularmente a células eritroides inmaduras, y a las células almacenadoras de hierro. Así, la transferrina actúa como un verdadero acarreador del hierro tomándolo en un sitio, depositándolo en otro y quedando disponible para realizar nuevamente el ciclo.

Probablemente el papel más importante y ciertamente, el más estudiado de la transferrina, es el transporte de hierro a los sitios de eritropoyesis, en donde la velocidad de captación de hierro es lo suficientemente grande como para explicar las necesidades de hierro in vivo. El hierro es captado por todos los precursores eritrocíticos nucleados en la médula ósea, siendo máximo este proceso en los estadios tempranos de diferenciación (pronormoblasto) (40). Aún después de la pérdida del núcleo (reticulocito) existe la capacidad de captación de hierro para la síntesis de hemoglobina. La interacción entre las células eritroides y la transferrina está mediada por un receptor específico,

reversible y saturable. Los estudios realizados muestran que el mayor número de receptores para transferrina se encuentra en los pronormoblastos y que este número declina progresivamente conforme avanza la maduración. Así, durante la diferenciación eritroide, la síntesis de hemo se presenta en el estadio de pronormoblasto y precede a la síntesis de globina (40). Una vez unida la transferrina a su receptor, libera su hierro. Algunos investigadores apoyan la idea de la internalización de la molécula de transferrina (39), mientras que algunos otros proponen que el hierro es liberado en la membrana plasmática existiendo factores citoplásmicos que movilicen el hierro para transportarlo a la mitocondria en donde es incorporado al hemo (41). Asimismo, existe controversia en cuanto a la disponibilidad del hierro de los dos sitios de la transferrina. Fletcher y Huehns (1967) proponen que existe una diferencia funcional entre ambos sitios ya que el sitio A libera su hierro preferencialmente al eritrón y a la placenta, y el sitio B al hígado y otros tejidos. Estas diferencias serían importantes en la regulación de la distribución y recambio del hierro en el organismo (42). Sin embargo, otros estudios han demostrado que los reticulocitos de rata toman el hierro de ambos sitios de la transferrina en cantidades iguales (43).

Debe mencionarse que la transferrina está involucrada con otros tipos celulares sanguíneos. Se ha demostrado que los monocitos, linfocitos y células polimorfonucleares pueden aceptar hierro de la transferrina, siendo mayor la captación en los monocitos y menor en los linfocitos (39).

La posibilidad de que la captación de hierro en células linfoides esté mediada por un receptor ha sido investigada por Galbraith. Demostró que menos del 5% de los linfocitos son capaces

de unir transferrina (44); pero, cuando estas células son activadas con fitohemaglutinina o concanavalina, del 40-95% de las células unen transferrina (45).

Se ha encontrado que la captación de hierro por células linfoblastoides es similar a la de los reticulocitos; sin embargo, y a diferencia de éstos, únicamente el 10% del hierro incorporado forma parte del hemo (46). Otros experimentos muestran la presencia de receptores específicos para transferrina en líneas linfoblastoides. Las células T contienen alrededor de 60,000 sitios de unión por célula, mientras que las células B poseen cerca de 30,000 sitios, sin encontrarse diferencias para la constante de asociación de la reacción de unión que es de $1 \times 10^{12} \text{ mol}^{-1}$ (47).

O B J E T I V O

En condiciones normales, la producción de células sanguíneas se encuentra balanceada con su destrucción por mecanismos reguladores complejos; sin embargo, cuando la pérdida de células se incrementa por sangrado crónico, deben ser varios los procesos que se activan, ya que el sistema hematopoyético es capaz de incrementar el aporte de células fisiológicamente activas.

Al inducir un estado de anemia por sangrado diario, los mecanismos productores de células sanguíneas se ven amplificados lo cual nos permite estudiar la cinética de aparición de las células, así como ayudarnos a entender los mecanismos generales reguladores de la hematopoyesis. Los parámetros hematológicos que tienen un significado clínico en el diagnóstico de un proceso anémico, son el número de células rojas y la cantidad de hemoglobina. Al inducir la anemia se estimula por tanto la eritropoyesis, y si tomamos en cuenta los estudios que demuestran que tanto las células rojas como los leucocitos provienen de un precursor común, cabe hacerse la pregunta, en esta situación qué sucede con las células blancas?

Asimismo, la producción acelerada de eritrocitos requiere de hierro para la síntesis de hemoglobina, ya que al remover las células se impide la reutilización del hierro contenido en ellas resulta lógico suplementar con hierro a los conejos para evitar que la carencia de este metal sea un factor limitante en la eritropoyesis. Como ya se ha mencionado, el hierro juega un papel importante en su relación con las células blancas, y puede uno preguntarse si existirán diferencias en el número y tipo de cé-

lulas nucleadas circulantes, cuando comparamos a un grupo de conejos hechos anémicos a los que se ha suplementado diariamente con hierro, con un grupo de conejos anémicos que no reciben hierro exógeno.

En el organismo, la molécula encargada del transporte de hierro hacia los sitios de su utilización y almacenaje, es la transferrina. Puede suponerse que en condiciones en las que la incorporación de hierro a hemoglobina se acelera, aumente la proporción de moléculas de transferrina que transportan dos átomos de hierro a la médula ósea. Durante el proceso de anemia se llega a una fase en la que la cantidad de eritrocitos removidos por la sangría es igual a la que sale de la médula ósea, por lo que se le ha denominado fase de equilibrio. Es en esta fase de equilibrio en que se inyecta transferrina purificada de conejos a un grupo experimental de animales, ya que puede suponerse a priori, que existirá alguna reacción al aumentar la cantidad de moléculas de transferrina capaces de transportar hierro a los sitios de producción de hemoglobina. Las investigaciones han sugerido que la transferrina es capaz de interactuar no solamente con los precursores eritrocíticos, sino también con los leucocitos, y la pregunta que surge inmediatamente es, si habrá algún cambio en las células nucleadas circulantes al adicionar transferrina a los conejos. Y, si existen diferencias cuando inyectamos esta molécula a conejos que reciben hierro diariamente en comparación con aquellos organismos que no son suplementados con hierro.

Cada día son más los factores que in vitro parecen tener un papel en la hematopoyesis, sin embargo, la formación de células sanguíneas y su regulación son fenómenos que actualmente parecen eludir toda explicación. Los estudios que aquí se presentan, en

los que el modelo experimental es el organismo íntegro, tienen como objetivo el ayudarnos a entender lo que sucede in vivo en la producción de células sanguíneas nucleadas y el control de los mecanismos de regulación de la hematopoyesis.

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

Inducción de la Anemia

Se utilizaron conejos Nueva Zelanda de dos a tres kg de peso que se sangraron diariamente por punción cardiaca durante 22 días. El volumen de sangre a extraer se determinó de acuerdo al peso corporal de cada uno de los animales, removiéndose en todos los experimentos 10 ml diarios/kg de peso. En los experimentos en los que suplementó con hierro a los conejos, se repuso el hierro perdido por el sangrado, administrando diariamente por vía intraperitoneal hierro dextrán (IMFERON, Laboratorios Lakeside). La cantidad de hierro suministrada se calculó en función de la cantidad de hemoglobina por mililitro de sangre removida en la fase de equilibrio, asumiendo que, en un gramo de hemoglobina hay aproximadamente 3.35 mg de hierro (4).

Obtención de la Sangre

La sangre se colectó en jeringas de vidrio de 30 y 50 ml previamente enjuagadas con ácido etilendinitrilo tetracético, sal disódica (Titriplex III, Merck) al 20% p/v en 0.15 M NaCl pH 7.3 como anticoagulante. La sangre extraída se transfirió a probetas de vidrio que se mantuvieron en hielo y se verificó el volumen colectado. De cada muestra se determinó hematocrito, hemoglobina, número de células rojas, número de células nucleadas y se hicieron frotis para el conteo diferencial.

Hematocrito

El volúmen ocupado por las células empacadas después de centrifugar la sangre, expresado como porcentaje del volúmen total, se conoce como hematocrito. El hematocrito se determinó diariamente y por duplicado, centrifugando la sangre en tubos capilares sellados por uno de sus extremos, durante 30 minutos a 2,600 rpm en una centrifuga clínica Adams-Dynac con cabezal de columpio CT-1350.

Hemoglobina

La concentración de hemoglobina fue determinada por el método de la cianometahemoglobina (4). Se utilizó una dilución 1:200 de la sangre en la solución diluyente de Drabkin que consiste de NaHCO_3 1.0 gr/l, KCN 50 mg/l y $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 200 mg/l. Las lecturas se efectuaron en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II a 540 nm. Los valores fueron calculados asumiendo un coeficiente de extinción milimolar de la cianometahemoglobina de 44 y un peso molecular de la hemoglobina de 66,000 (48,49).

Número de Células Nucleadas y Células Rojas

La cantidad de células en las muestras se determinó en un contador electrónico Haema Count MK-2S y cada una de las mediciones se hizo por duplicado. Se tomaron 20 μl de sangre y se diluyeron en 16 ml de ISOTON (NaCl 7.93 gr/l, EDTA 0.38 gr/l, KCl 0.40 gr/l, NaH_2PO_4 0.19 gr/l y Na_2HPO_4 1.95 gr/l). De esta primera dilución 1:800 se tomaron 100 μl y se llevaron a un volúmen de 10 ml de ISOTON. Esta última muestra con una dilución 1:80,000 sirvió para determinar el número de células rojas que se expresó

por el contador como número $\times 10^6/\text{mm}^3$. A la primera dilución se añadieron 8 gotas de solución hemolizante de Sigma para romper los eritrocitos y se determinó el número de células que se expresó como número $\times 10^3/\text{mm}^3$.

Asimismo, en un afán de constatar la exactitud de las determinaciones de células nucleadas en el contador, se utilizó otro método. Se preparó una dilución 1:10 de la sangre colectada en una solución al 2% de ácido acético glacial (Baker) a la cual se agregaron unos cristales de azul de metileno (Merck). Las células se contaron en un hemocitómetro Spencer Bright-Line en el microscopio de contraste de fases. Los resultados obtenidos por este método fueron indistinguibles de los determinados por el contador electrónico.

Preparación de los Frotis

Se realizó en cubreobjetos de 22 X 22 mm de tamaño; se mantuvo un cubreobjetos en la mano izquierda de tal forma que sólo los bordes quedaran en contacto con los dedos y se depositó en él una gota de sangre con una pipeta Pasteur. El otro cubreobjetos, sujeto con la mano derecha por sus bordes, se colocó sobre el primero de tal manera que quedaron cruzados y con las esquinas libres, así, la sangre se distribuyó rápidamente entre los dos cubreobjetos. Antes de que se completara la dispersión de la sangre, se separaron los cubreobjetos con un movimiento de deslizamiento horizontal manteniendo las esquinas de los cubreobjetos en cada mano (4,5). Los frotis se dejaron secar a temperatura ambiente.

Tinción de los Frotis

Una vez secos, los frotis se tiñeron usando colorante de Wright (Merck) que se preparó disolviendo 0.24 gr de colorante en 100 ml de alcohol metílico (Merck). La solución se dejó reposar durante 5 días y después de filtrarla quedó lista para su uso. La tinción de Wright es una de las muchas técnicas policromáticas que permite la identificación de los varios tipos de células nucleadas en sangre periférica y médula ósea. El colorante es una mezcla de azul de metileno que se calienta en una solución de bicarbonato de sodio, y eosina. El azul tiñe los componentes celulares acídicos, tales como núcleo y RNA citoplásmico; mientras que la eosina es roja y tiñe componentes más básicos de la célula. Algunas estructuras se tiñen con ambos componentes, lo que les da su color característico rojo violeta. Debido a que el colorante se preparó con metanol, la solución no solamente tiñó la preparación sino también la fijó.

El frotis se cubrió completamente con el colorante durante 1.5 minutos y al cabo de este tiempo se diluyó con agua destilada que se agregó sin tirar el colorante y en cantidades aproximadamente iguales a las que se emplearon de tinción. Con ello, apareció en el frotis un brillo metálico de color verdoso en el centro de la preparación, mientras que las márgenes mostraron un tinte rojizo. Transcurridos 3 minutos, se lavó el colorante con abundante agua de la llave, hasta que el frotis apareció rosado-amarillento. Se dejaron secar a temperatura ambiente y se montaron sobre una gota de aceite de inmersión (Merck) en un portaobjetos.

Conteo Diferencial

Los frotis fueron observados en un microscopio de contraste de fases Spencer (American Optical Corporation), usando siempre el objetivo de inmersión (100 X). El conteo diferencial se realizó con teclados Clay-Adams de 2 y 8 teclas y se contaron 500 células por conejo por día.

Inyección de Transferrina

En los experimentos en los que se inyectó transferrina al grupo experimental, se siguió el procedimiento que a continuación se describe. Se purificó transferrina de suero de conejos anémicos utilizando una modificación del método descrito por Martínez Medellín (81). Brevemente, se precipitó el suero con sulfato de amonio hasta 55% de saturación. El sobrenadante se pasó por columnas de DEAE-Sephadex y SP-Sephadex obteniéndose apotransferrina que se tituló con sulfato de amonio ferroso para determinar la concentración de proteína. Su grado de pureza se determinó en geles de acrilamida y por inmunodifusión radial, y se obtuvo una banda en ambos casos (82). La proteína se preparó en solución salina estéril (0.9% NaCl) en una concentración de 17.25 mg/ml con una saturación de 80% de hierro.

El día 11 de sangrado se extrajeron 2 ml de sangre menos del volumen correspondiente a cada conejo. Una hora después se inyectó a dos conejos con transferrina (276 mg de proteína en 16 ml a cada individuo), y a 5 conejos con el mismo volumen de solución salina fisiológica estéril (Abbot) a través de una vena de la oreja. Una hora después de este procedimiento se colectaron los 2 ml de sangre que se utilizaron para la determinación

de todos los parámetros hematológicos. Debe mencionarse que en este caso los conejos no estaban recibiendo el suplemento diario de hierro dextrán.

La inyección de transferrina se realizó también en conejos que recibieron diariamente suplemento de hierro. El proceso de purificación de la transferrina fue el mismo que en el caso anterior. La inyección de la proteína se realizó asimismo en el día 11 de sangrado. La concentración utilizada fue de 425 mg de apotransferrina en un volumen de 11.5 ml de solución salina estéril a cada uno de los dos conejos experimentales. Este mismo volumen de solución salina se inyectó a los tres conejos del grupo control.

Aislamiento de Microlinfocitos

Para el aislamiento y purificación de los microlinfocitos se utilizó la sangre de conejos anémicos entre los días 5 y 10 de sangrado debido al aumento que presenta esta población en ese periodo. La sangre se obtuvo por punción cardiaca y se colectó en jeringas enjuagadas con Titriplex III.

La sangre se diluyó volumen a volumen en PBS (solución salina en amortiguador de fosfatos) 0.15 M NaCl 0.025 M de fosfatos pH 7.4, y todo el procedimiento se realizó manteniendo el material en hielo. Se pipetearon 3.5 ml de Ficoll-Paque (Pharmacia) en tubos de vidrio Pyrex de 13 X 120 mm, y se depositaron sobre el Ficoll 4 ml de la sangre diluida. Se centrifugó a 400 g durante 30 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga clínica Adams-Dynac con cabezal de columpio CT-1350. La capa superior que consiste de plasma esencialmente libre de células, se

colectó con una pipeta Pasteur guardándose para su uso posterior. Usando otra pipeta Pasteur se transfirió la interfase que contenía a los linfocitos y microlinfocitos contaminados con eritrocitos y plaquetas, a otro tubo de vidrio de las mismas dimensiones. Se añadieron 8 ml de PBS, resuspendiendo suavemente las células en este medio, y se centrifugó a $100 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente. Con ésto se logró sedimentar la mayor parte de los eritrocitos contaminantes, el sobrenadante que contenía a las células blancas se transfirió a tubos limpios agregando 2 ml más de PBS. Se resuspendieron las células con una pipeta Pasteur y se centrifugaron a $1,000 \times g$ 5 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 8 ml de PBS centrifugando nuevamente en las mismas condiciones. El botón celular que se obtuvo después de este paso quedó libre de Ficoll-Paque, y se resuspendió en un volúmen pequeño (1.5 ml) del plasma colectado en el primer paso de la purificación.

Las células se transfirieron a gradientes preformados de Percoll que se prepararon de la siguiente manera. Para cada tubo de gradiente se mezclaron 4.5 ml de PBS 0.30 M NaCl 0.025 M de fosfatos pH 7.4, con 5.25 ml de Percoll (Pharmacia) dando una solución con una densidad inicial de 1.0765 gr/cm^3 . A su vez este volúmen se transfirió a tubos de policarbonato de 10 X 100 mm y se centrifugaron en una centrífuga refrigerada IEC B-20 A (DAMON/IEC Division) a $21,000 \times g$ durante 40 minutos en un cabezal de ángulo fijo (33°) a 4°C . De esta manera se formó un gradiente lineal como pudo comprobarse utilizando Perlas Marcadoras de Densidad (Pharmacia), que se agregaron a uno de los tubos en un rango de densidades de 1.033 a 1.121 gr/cm^3 . A estos tubos de gradiente se agregó 1.5 ml de las células colectadas en el plasma. Se

centrifugaron en la centrifuga clínica a 1,000 x g 20 minutos a temperatura ambiente. Al observar los tubos pudo verse una banda opaca de células que se colectó en tubos de vidrio con una pipeta Pasteur. Se añadieron 8 ml de solución salina balanceada de Hank (BSS) y se resuspendieron suavemente las células con la pipeta Pasteur. Se centrifugaron a 1,000 x g 5 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se repitió el proceso de resuspensión y centrifugación otras dos veces. Este último botón celular se colectó en 1 ml del plasma obtenido al inicio del procedimiento de aislamiento de los microlinfocitos.

Determinación de Hierro Sérico

La concentración de hierro sérico se determinó espectrofotométricamente haciendo uso del ácido batofenantrolín disulfónico, que reacciona con el hierro libre dando un compuesto colorado con un máximo de absorción a 535 nm.

El principio en el que se basa la determinación, consiste en remover el hierro unido a proteínas siderófilas, principalmente el ligado a la transferrina, a través de un cambio brusco en el pH del suero.

Para cada determinación se pipetearon 2 ml de plasma a los cuales se agregó 1 ml de HCl 1N agitando en un Vortex. Se dejaron a temperatura ambiente 45 minutos; a continuación se les agregó 1 ml de ácido tricloroacético al 40% y se centrifugó la mezcla a 10,000 rpm durante 30 minutos a 4°C. A dos mililitros del sobrenadante se les agregó 1 ml de acetato de sodio al 30% y aproximadamente 5 mg de ascorbato de sodio. Una vez disuelto el ascorbato, se agregó 1 ml de una solución de batofenantroli-

na al 0.1% p/v en amortiguador de fosfatos pH 5.5, con lo cual se obtuvo una solución de color rosado. Para leer esta última solución en el espectrofotómetro a 535 nm se prepararon un patrón y un blanco para los cuales se siguió el mismo procedimiento antes descrito, sustituyendo el suero por la solución patrón de hierro (1 µg/ml) y por agua desionizada respectivamente.

La concentración de hierro se expresó como µg de Fe por 100 ml de plasma, y se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$\text{Hierro en plasma} \left(\frac{\mu\text{g}}{100 \text{ ml}} \right) = \frac{\text{Absorbancia en el plasma} \times 100}{\text{Absorbancia patrón} (\mu\text{g/ml})}$$

Este es el dato que se utilizó en el reporte del experimento (48).

Concentración de Transferrina

Este parámetro fue calculado usando la técnica de inmunodifusión radial descrita por Mancini (83). Se utilizó un anticuerpo específico contra transferrina, obtenido a partir de transferrina purificada de conejo de acuerdo a la técnica descrita por Martínez Medellín (81).

El procedimiento de inmunodifusión radial consiste esencialmente, en incluir una concentración constante de anticuerpo en una matriz de agar, en la cual se coloca el antígeno correspondiente. Al medir el área de los halos formados después de llevada a cabo la reacción antígeno-anticuerpo puede cuantificarse la concentración del antígeno.

La cuantificación de transferrina en el plasma de los conejos experimentales se hizo colocando 4 µl de plasma en cada po-

zo por duplicado. Una vez colocado el antígeno en cada placa, se incubaron a temperatura ambiente en una cámara húmeda por 24 horas, tiempo requerido para que se establezca la reacción antígeno-anticuerpo y, por tanto, el área final del precipitado. Después de este periodo de incubación se efectuaron las mediciones correspondientes (48).

R E S U L T A D O S

En los diferentes experimentos cuyos resultados se describen a continuación, se utilizó como animal experimental al conejo Nueva Zelanda blanco, al que se indujo un estado de anemia al remover diariamente 10 ml/kg de peso. Sin embargo, aun cuando la inducción de la anemia es factor común en el diseño empleado, se introdujeron diferentes variantes al modelo básico, por lo que resulta conveniente separar la presentación de los datos obtenidos en cada uno de los experimentos. Asimismo cabe mencionar, que en estudios anteriores (49) se ha observado una disminución continua del hematocrito, el número de eritrocitos por mm^3 y la concentración de hemoglobina por 100 ml de sangre hasta el día 5, considerando como día 0 el primer día de sangrado, y a los valores hematológicos de este día, como los parámetros normales de la población. Es a partir del día 6 que se inicia la recuperación que establece un nuevo equilibrio a partir del día 11, ya que la disminución está compensada por un incremento en la producción de células rojas, que se refleja en un aumento en el número de reticulocitos circulantes. Este aumento no es indefinido, sino que después de incrementarse alrededor de 3 veces respecto a los valores normales, se mantiene constante. Así, se logra la fase de equilibrio, en la cual el número de células rojas removidas es igual a la cantidad producida, aun cuando los valores alcanzados se encuentran por debajo de los valores iniciales. La nueva población de eritrocitos circulantes tiene un mayor volumen en comparación con los eritrocitos normales, pero con una concentración menor de hemoglobina, por lo que puede in

cluirse a la anemia producida dentro de las anemias macrocíticas (4,5).

1er Experimento:

Características generales de las células nucleadas de la sangre al inducirse la anemia. Efecto del suministro exógeno de hierro.

Estábamos interesados en conocer si el hierro era factor limitante en la eritropoyesis. Por lo tanto, se diseñó un experimento en donde se hicieron anémicos a dos grupos de conejos, a uno sólo de los cuáles ~~se~~ le inyectó hierro intraperitonealmente. El objetivo de esta primera fase consistió en definir las características cinéticas de las células nucleadas circulantes de los conejos en estas condiciones.

Se sangraron diariamente durante 22 días dos grupos de conejos. El primero, constituido por un lote de tres conejos recibió diariamente hierro por vía intraperitoneal, mientras que el otro grupo de cuatro individuos no fue suplementado con hierro, y su principal fuente de este metal fue el alimento (Conejina de Purina que contiene 125 mg de hierro por gramo de purina). Se determinaron los diferentes parámetros hematológicos y los resultados fueron claros.

Los datos hematológicos que se utilizan en este trabajo como indicadores del nivel de eritropoyesis son hematocrito, cantidad de hemoglobina y número de células rojas. En las figuras 1, 2 y 3 se presenta el cambio en estos parámetros para los dos grupos de conejos a lo largo del periodo de sangrado. Puede obser-

vase que estas tres gráficas son similares, ya que se presenta una disminución continua de los valores respectivos hasta alcanzar un mínimo al día 5 de sangrado, y se recuperan a partir de este momento hasta alcanzar el nuevo equilibrio a partir del día 11 debido al incremento en la eritropoyesis. Al comparar para cada uno de estos parámetros a los conejos que reciben hierro con los que no lo reciben, se ve que no existen diferencias significativas entre ambos grupos a lo largo de todo el período de sangrado debidas al suplemento de hierro.

La figura 4 y la Tabla 3 muestran las fluctuaciones en el número de células nucleadas circulantes a lo largo del período de sangrado en ambos grupos de conejos. El empleo del término células nucleadas en lugar de leucocitos, se debe a que estudios previos han mostrado la aparición de precursores eritrocíticos nucleados, así como de una población que se ha denominado micro linfocítica en la circulación (50). Puede observarse en la figura, que existe la tendencia a incrementar el número de células siendo mayor y más pronunciado este cambio en el período inicial, entre los días 5 y 8 de sangrado. Después se presenta una disminución gradual hasta alcanzar valores similares a los iniciales a partir del día 14.

Existen dos maneras de comparar estos resultados. La primera consiste en comparar el número de células nucleadas circulantes en condiciones de anemia, con el valor obtenido para el día cero en cada grupo de conejos. Para detectar diferencias debidas al suplemento de hierro, se establece la comparación entre ambos grupos. Así, si comparamos los valores que alcanzan las células nucleadas entre los días 4 y 10 con los valores normales para cada uno de los grupos, puede decirse que en este período de la a

nemia son significativamente diferentes (para los conejos con hierro $0.01 < p < 0.001$ y para los conejos sin suplemento de hierro $0.02 < p < 0.01$). Al observar la gráfica se detecta la presencia de incrementos periódicos muy marcados en el número de células en los conejos sin suministro de hierro; estas ondas se presentan en los días 5, 9, 13 y 17. Por otra parte, el período de máximo aumento en el número de células para los conejos con suplemento de hierro comprende los días 5 a 8. Es en estos días únicamente, en que los dos grupos de conejos son significativamente diferentes ($0.01 < p < 0.001$). En conclusión, existe un aumento en el número de células nucleadas independientemente del suministro de hierro, número que es mayor entre los días 5 y 8 en los conejos que reciben hierro y pequeñas diferencias en la cinética en este período en el grupo sin suplemento de hierro.

Para saber qué tipo o tipos celulares ocasionan el incremento en células observado se realizó el conteo diferencial. Al conocer el porcentaje de cada una de las poblaciones y conociendo el número total de células para cada día, puede calcularse el número de cada uno de los tipos celulares. Estos datos se presentan en las Tablas 4 y 5 para el grupo de conejos con y sin suplemento de hierro respectivamente. Puede observarse que los basófilos, eosinófilos y monocitos se mantienen prácticamente constantes a lo largo del período de sangrado y que aparecen células inmaduras en forma muy irregular.

Por otra parte, la población de segmentados cuya cinética se muestra en la figura 5, aumenta entre los días 3 y 11 en ambos grupos de conejos tendiendo a recuperar los niveles iniciales rápidamente. Sin embargo, el incremento aun cuando transitorio, eleva el número de segmentados en este período a niveles

significativamente diferentes ($0.05 < p < 0.02$) cuando se les compara con el número normal de esta población en los conejos que reciben hierro diariamente. Este aumento no se presenta en los conejos sin suplemento de hierro. Así, al comparar las poblaciones de conejos entre sí, se ve que durante los días 3 a 11 de sangrado son significativamente diferentes ($p = 0.05$) y que estas diferencias desaparecen al continuar el sangrado de los conejos.

En lo que respecta a la población de linfocitos, cuyas variaciones se muestran en la figura 6 para ambos grupos de conejos, se observa también un incremento en el número de estas células entre los días 3 y 13. Este aumento presenta diferencias significativas ($0.05 < p < 0.02$) respecto a los valores iniciales en los conejos con hierro, pero no en los conejos sin suplemento de hierro encontrándose sin embargo, que el número de linfocitos circulantes en este periodo no es diferente en ambos grupos de conejos.

Sin duda, las poblaciones más interesantes que se encuentran en circulación al inducir la anemia crónica son los normoblastos y los microlinfocitos. La primera por su papel precursor de eritrocitos, confinada a médula ósea normalmente, y la segunda por constituir una población completamente nueva, casi inexistente en conejos normales y cuya función y/o capacidades desconocemos. En el microscopio de contraste de fases se les observa como células muy pequeñas, que guardan gran semejanza con los linfocitos pequeños por su apariencia morfológica, y que por ello se han denominado microlinfocitos. Estas células se ven como entidades con un tamaño que varía entre 5 y 7 μ , con núcleo sumamente compacto, y un halo pequeñísimo en ocasiones indistinguible

ble de citoplasma.

La figura 7 presenta las variaciones en el número de normoblastos en circulación a lo largo del periodo de sangrado para ambos grupos de conejos. Debe mencionarse que, a pesar de haberse agrupado a este tipo celular bajo un sólo nombre genérico, existen en la circulación dos tipos de normoblastos, los ortocromáticos y los policromatofílicos, con una marcada predominancia de las formas más maduras, es decir, los normoblastos ortocromáticos. En la figura se observa un incremento muy marcado con un máximo entre los días 3 y 9 de sangrado en los conejos que reciben hierro, y que es más cíclico y de menor magnitud en los conejos que no son suplementados con hierro. Si comparamos el número de normoblastos presente por mm^3 de sangre en conejos con y sin suplemento de hierro, se observa que existen diferencias significativas ($0.02 < p < 0.01$) en ambos grupos entre los días 1 y 15, y que el aumento en estos días comparado con los valores iniciales es significativo para ambos grupos ($p = 0.02$). Utilizando los datos obtenidos por Pulido (48) de la concentración de hierro sérico en estos mismos organismos, resulta importante observar que los conejos a los cuales se suministra hierro dextrán presentan un aumento notable en el contenido de hierro sérico en los días 1 a 6 de sangrado a diferencia de los conejos no suplementados con hierro como se muestra en la figura 8. Este incremento, que va más allá de la cantidad necesaria para saturar a la transferrina circulante en un 100%, coincide con el incremento más notorio de normoblastos en circulación como se observa en la figura 9. Esta relación se considera muy importante ya que los normoblastos, precursores eritrocíticos inmaduros, incorporan activamente hierro para la síntesis de hemoglobina.

La segunda población modificada por la inducción de la anemia es la de microlinfocitos cuya cinética se presenta en la figura 10 para ambos grupos de conejos. Estas células incrementan su número en forma periódica a lo largo de los días de sangrado sin presentarse diferencias significativas entre ambos grupos de conejos. Cuando se compara el número de microlinfocitos entre los días 1 y 15 de sangrado, con los valores iniciales en cada grupo se obtienen valores de $0.02 < p < 0.01$ para los conejos con hierro, y $0.01 < p < 0.001$ para los conejos sin suplemento de hierro, lo cual implica un aumento real de esta población por efecto de la anemia.

Como se conocen las poblaciones que se incrementan durante la anemia, puede calcularse el porcentaje que representan las diferentes poblaciones del incremento en células nucleadas en el período que comprende los días 3 a 11.

	Conejos con suplemento de hierro	Conejos sin suplemento de hierro
Normoblastos + Microlinfocitos	65.43 ± 13.13 %	69.79 ± 19.08 %
Normoblastos	36.44 ± 7.82 %	31.45 ± 8.10 %
Microlinfocitos	29.07 ± 8.76 %	38.33 ± 11.06 %
Segmentados	17.52 ± 2.70 %	22.91 ± 3.82 %
Linfocitos	30.07 ± 2.09 %	25.08 ± 4.06 %

Efectivamente, las poblaciones de normoblastos y microlinfocitos las más afectadas por la inducción de la anemia, y que a priori parecen ser las que modifican en mayor escala el número de células nucleadas circulantes representan más del 60% del aumento en células totales. Los porcentajes calculados para cada una de las poblaciones son estadísticamente iguales, sin embargo,

cuando se compara el número de células en este período se encuentra que la suma de normoblastos más microlinfocitos es diferente para los dos grupos de conejos ($0.05 < p < 0.02$). Las otras dos poblaciones que modifican el número total de células nucleadas son los segmentados y los linfocitos representando un porcentaje menor del incremento en células en el período estudiado.

En suma, al inducir la anemia se presenta un incremento en el número de células nucleadas. Este aumento corresponde en el mayor porcentaje (65%) a dos poblaciones: los normoblastos y los microlinfocitos, que se encuentran en cantidades pequeñas en la circulación en condiciones normales, y que se incrementan a valores muy elevados. Los segmentados y los linfocitos también aumentan aun cuando en una proporción mucho menor, mientras que los basófilos, eosinófilos y monocitos permanecen casi constantes. Asimismo, se encuentra que el aumento en el número de normoblastos es de mayor magnitud en condiciones de suplemento con hierro y que este aumento parece relacionarse con la presencia de un alto contenido de hierro sérico.

Figura 1:

Variación en el hematocrito de conejos hechos anémicos con (—) $n=3$ y sin (---) $n=4$ suplemento de hierro a lo largo del periodo de sangrado. Se presenta la media \pm E.S.

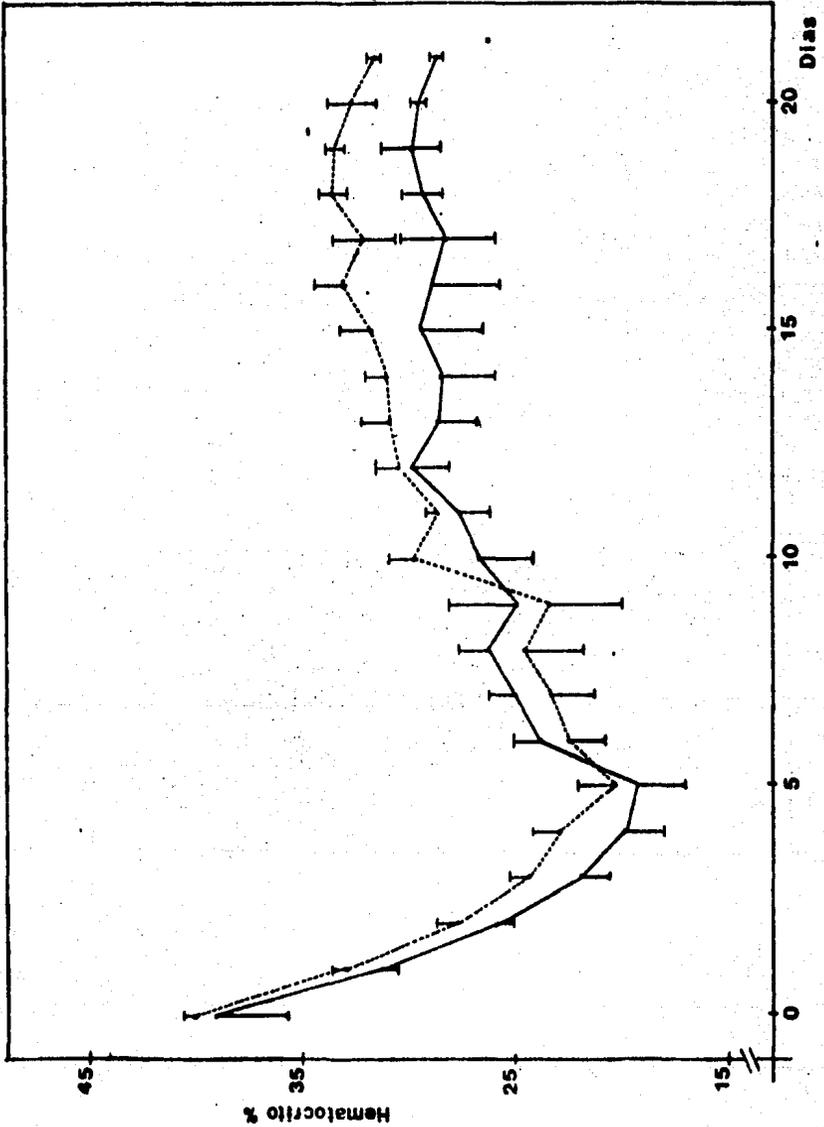


Figura 2:

Efecto del sangrado sobre la cantidad de hemoglobina en conejos con (—) $n=3$ y sin (---) $n=4$ suplemento de hierro. Se presenta la media \pm E.S.

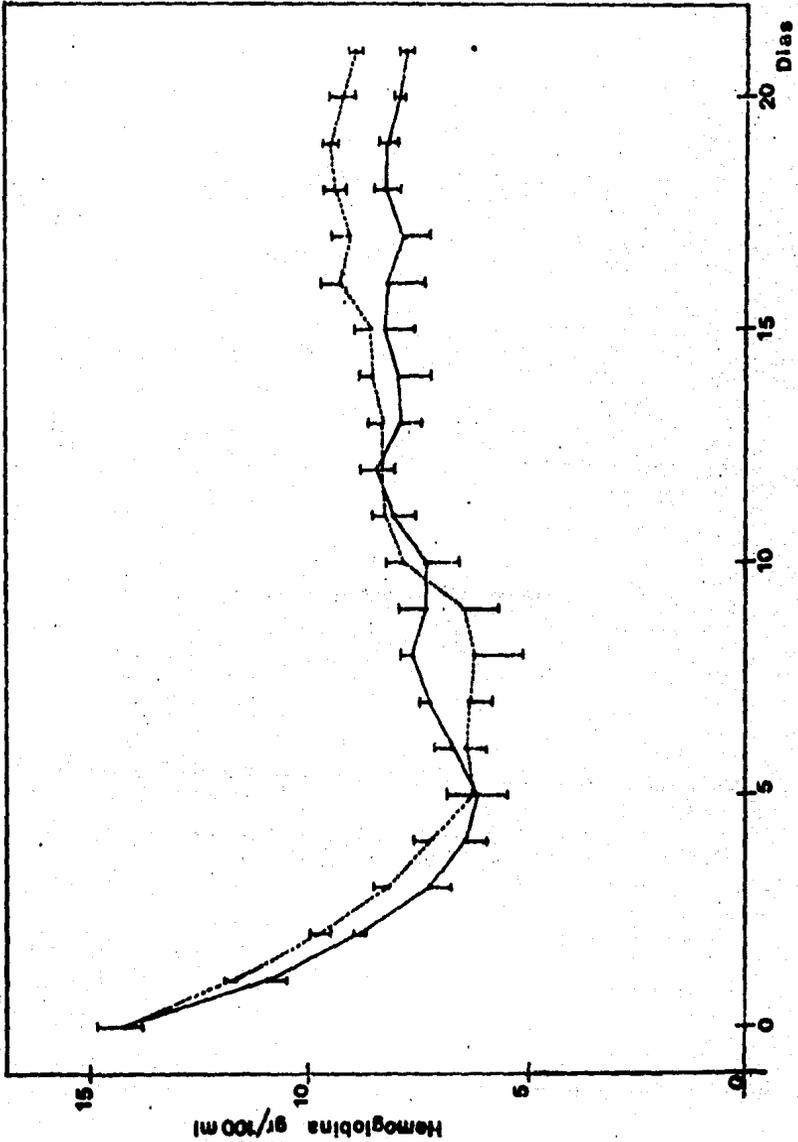


Figura 3:

Variación en el número de eritrocitos por efecto del sangrado en conejos con (—) $n=3$ y sin (---) $n=4$ suplemento de hierro. Se presenta la media \pm E.S.

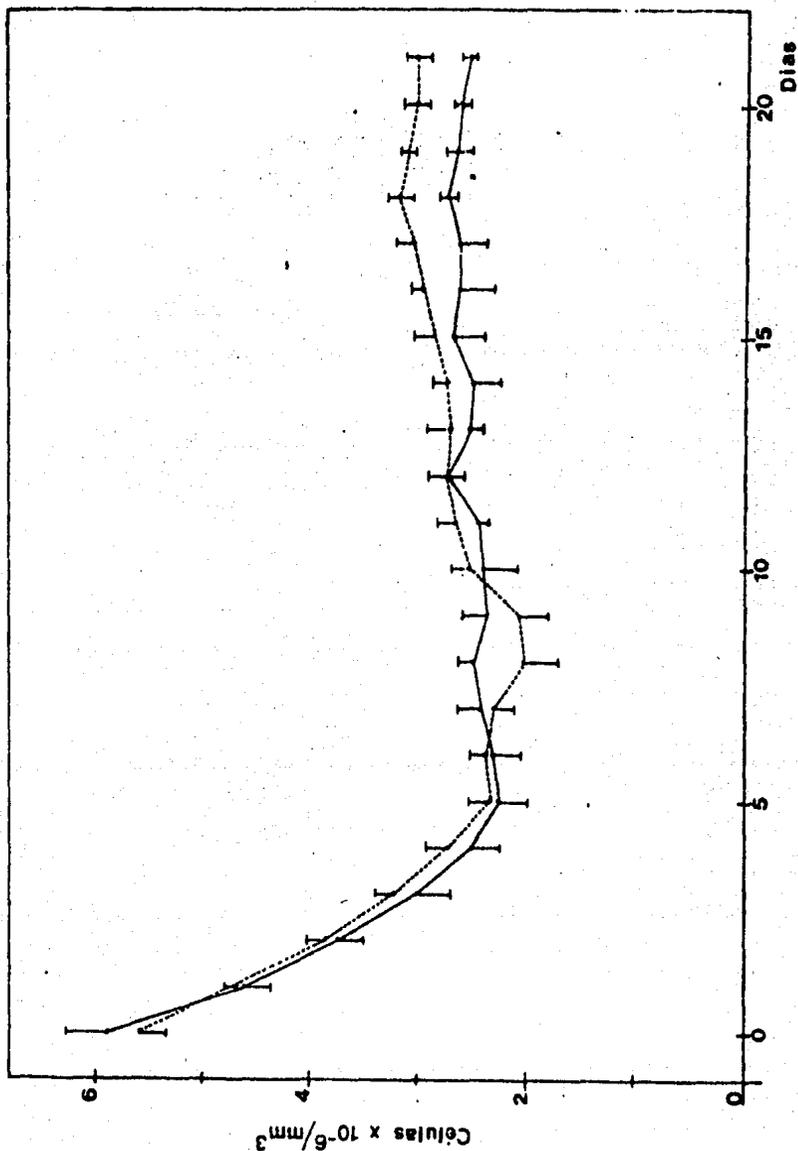


Figura 4:

Efecto del sangrado sobre el número de células nucleadas circulantes en conejos con (—) $n=3$ y sin (---) $n=4$ suplemento de hierro. Se presenta la media \pm E.S.

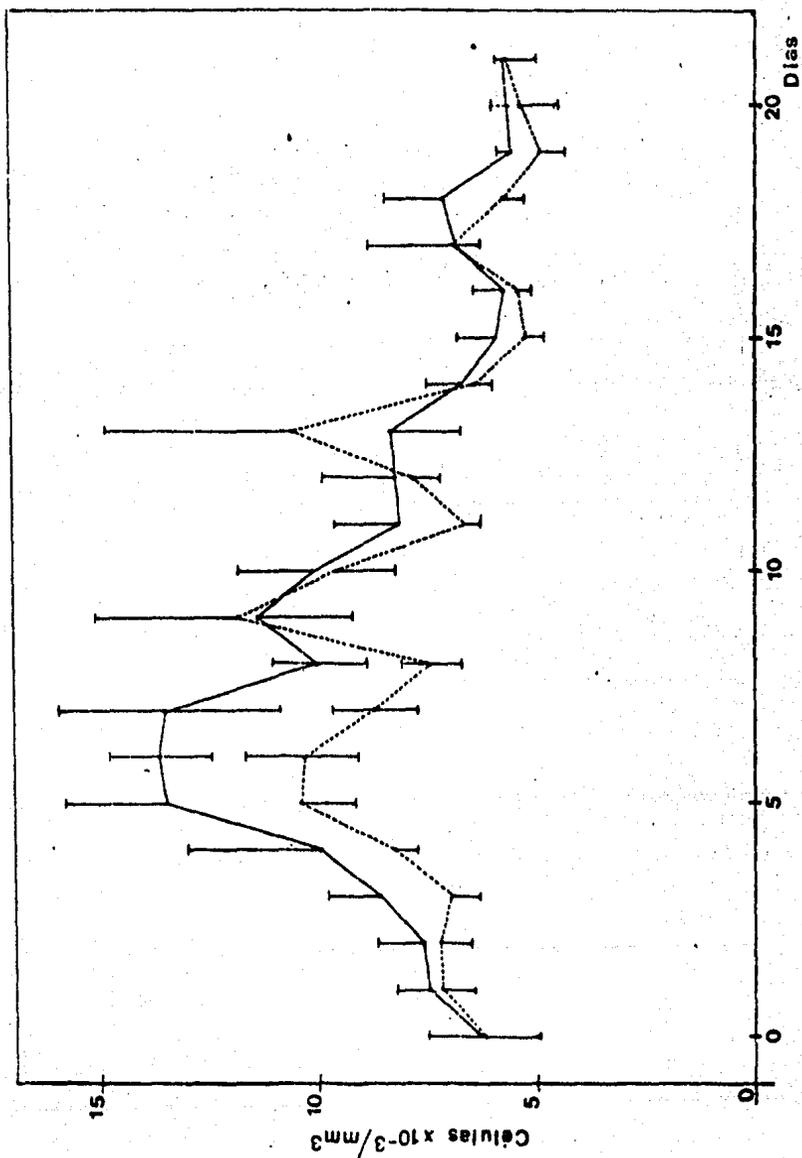


Tabla 3:

Variación en el número de células nucleadas circulantes a lo largo del periodo de sangrado en conejos con (n=3) y sin (n=4) suplemento de hierro. Se presenta la media \pm E.S.

Día	Conejos con Hierro	Conejos sin Hierro
	(No. $\times 10^3/\text{mm}^3$)	(No. $\times 10^3/\text{mm}^3$)
0	6.27 \pm 1.20	6.14 \pm 1.19
1	7.42 \pm 0.808	7.15 \pm 0.735
2	7.59 \pm 1.06	7.19 \pm 0.695
3	8.57 \pm 1.24	6.91 \pm 0.605
4	9.99 \pm 3.05	8.27 \pm 0.505
5	13.49 \pm 2.36	10.41 \pm 1.26
6	13.63 \pm 1.15	10.38 \pm 1.30
7	13.50 \pm 2.53	8.72 \pm 0.985
8	10.02 \pm 1.06	7.43 \pm 0.690
9	11.43 \pm 2.18	11.90 \pm 3.34
10	10.17 \pm 1.71	9.56 \pm 1.34
11	8.15 \pm 1.52	6.65 \pm 0.310
12	8.22 \pm 1.77	7.82 \pm 0.595
13	8.37 \pm 1.59	10.67 \pm 4.27
14	6.71 \pm 0.883	6.44 \pm 0.395
15	5.91 \pm 0.918	5.28 \pm 0.385
16	5.72 \pm 0.768	5.41 \pm 0.210
17	6.88 \pm 0.560	6.92 \pm 1.96
18	7.11 \pm 1.43	5.73 \pm 0.421
19	5.59 \pm 0.358	4.96 \pm 0.571
20	5.63 \pm 0.404	5.37 \pm 0.849
21	5.79 \pm 0.156	5.71 \pm 0.710

Día	Basófilos	Eosinófilos	Mielocitos	Juveniles	Banclas	Segmentados	Infectos	Monocitos	Plasmocitos	Microinfectos	Blastos
0	0.300±0.156	0.076±0.017			0.018±0.013	1.26±0.404	3.75±0.493	0.132±0.020	0.004±0.004	0.021±0.016	
1	0.220±0.040	0.106±0.009		0.010±0.005	0.027±0.008	2.04±0.219	4.41±0.537	0.194±0.019	0.213±0.009	0.193±0.114	
2	0.322±0.156	0.127±0.039			0.046±0.005	2.37±0.292	3.88±0.537	0.229±0.019	0.419±0.127	0.198±0.031	
3	0.304±0.156	0.120±0.008		0.005±0.005	0.051±0.020	2.68±0.317	4.36±0.727	0.248±0.050	0.421±0.167	0.377±0.052	
4	0.374±0.127	0.171±0.056			0.031±0.013	2.98±0.802	4.70±1.190	0.330±0.153	0.741±0.520	0.462±0.218	
5	0.471±0.225	0.165±0.063	0.015±0.008	0.006±0.004	0.051±0.018	3.48±0.508	6.11±0.912	0.326±0.058	1.960±0.820	0.889±0.156	
6	0.406±0.115	0.205±0.010		0.015±0.007	0.056±0.007	3.41±0.277	6.32±0.554	0.273±0.030	1.270±0.421	1.660±0.303	
7	0.386±0.121	0.118±0.027		0.010±0.006	0.025±0.005	3.19±0.508	6.18±0.739	0.321±0.083	1.240±0.860	1.020±0.294	0.005±0.005
8	0.362±0.094	0.122±0.020	0.009±0.004	0.015±0.008	0.032±0.007	2.42±0.150	5.07±0.340	0.224±0.057	0.843±0.357	1.918±0.217	0.005±0.004
9	0.370±0.117	0.109±0.027	0.061±0.051	0.046±0.040	0.050±0.024	2.55±0.520	5.39±0.947	0.300±0.033	1.520±0.503	1.965±0.375	0.057±0.035
10	0.279±0.133	0.109±0.029	0.008±0.004	0.019±0.011	0.041±0.007	2.31±0.297	4.63±0.660	0.379±0.063	1.060±0.470	1.320±0.396	0.003±0.003
11	0.279±0.151	0.070±0.019		0.003±0.003	0.027±0.008	2.12±0.431	4.41±0.490	0.181±0.030	0.550±0.210	0.649±0.133	
12	0.265±0.095	0.105±0.041	0.035±0.034	0.014±0.009	0.023±0.007	1.96±0.371	4.04±0.631	0.228±0.041	1.911±0.427	1.627±0.254	0.003±0.003
13	0.328±0.156	0.069±0.009	0.004±0.004		0.018±0.007	1.76±0.173	4.55±0.619	0.190±0.047	1.707±0.317	1.754±0.312	
14	0.333±0.030	0.098±0.022		0.004±0.003		1.61±0.206	3.65±0.364	0.178±0.019	0.486±0.197	1.343±0.051	
15	0.288±0.098	0.065±0.009			0.007±0.007	1.47±0.150	3.46±0.491	0.160±0.023	1.866±0.098	0.275±0.098	
16	0.275±0.053	0.072±0.024		0.005±0.007	0.010±0.007	1.42±0.144	3.48±0.531	0.160±0.028	1.125±0.050	0.172±0.017	0.005±0.005
17	0.337±0.054	0.091±0.022			0.021±0.007	1.68±0.134	4.09±0.420	0.197±0.040	0.207±0.067	0.258±0.093	
18	0.302±0.109	0.085±0.011		0.004±0.004	0.045±0.011	1.57±0.024	3.87±0.664	0.200±0.020	0.531±0.220	0.498±0.155	
19	0.202±0.030	0.067±0.009			0.021±0.003	1.22±0.024	3.51±0.408	0.153±0.004	0.176±0.023	0.232±0.032	
20	0.169±0.031	0.055±0.009			0.015±0.011	1.35±0.015	3.25±0.069	0.150±0.018	0.317±0.180	0.312±0.166	
21	0.184±0.030	0.070±0.009			0.027±0.013	1.31±0.024	3.71±0.083	0.119±0.010	0.139±0.093	0.219±0.134	

Tabla 4:

Variación en el número de las diferentes poblaciones de células nucleadas de conejos suplementados con hierro a lo largo del periodo de sangrado. Se presenta el promedio (No. de células x 10³ / mm³) ± E.S. n = 3

Día	Eosinófilos	Linfocitos	Neutrófilos	Juveniles	Pandas	Segmentados	Leucocitos	Monocitos	Normoblastos	Microlinfocitos	Riostes
0	0.148±0.010	0.072±0.007	0.003±0.003	0.012±0.007	1.57±0.40	4.11±0.79	0.17±0.03	0.031±0.017	0.013±0.009		
1	0.258±0.031	0.143±0.035	0.006±0.003	0.016±0.009	1.81±0.40	4.50±0.54	0.162±0.024	0.130±0.031	0.125±0.026		
2	0.229±0.014	0.133±0.047	0.003±0.014	0.019±0.009	1.70±0.39	4.48±0.43	0.158±0.031	0.224±0.071	0.214±0.039	0.004±0.003	
3	0.282±0.051	0.089±0.015	0.007±0.004	0.017±0.007	1.62±0.29	4.37±0.49	0.153±0.026	0.096±0.018	0.297±0.084		
4	0.299±0.033	0.109±0.017	0.008±0.012	0.016±0.007	1.96±0.37	4.78±0.42	0.251±0.051	0.253±0.107	0.563±0.131	0.010±0.004	
5	0.250±0.060	0.131±0.027	0.004±0.004	0.023±0.009	3.02±0.97	5.44±0.64	0.223±0.021	0.590±0.218	0.723±0.203	0.003±0.003	
6	0.339±0.060	0.113±0.019	0.004±0.004	0.005±0.005	0.030±0.005	2.45±0.42	5.46±0.56	0.220±0.046	0.711±0.306	1.03±0.297	0.004±0.004
7	0.252±0.076	0.147±0.015	0.004±0.004	0.019±0.007	0.019±0.007	2.46±0.18	4.63±0.68	0.184±0.027	0.382±0.23	0.626±0.199	
8	0.209±0.049	0.075±0.010	0.016±0.009	0.017±0.013	0.040±0.017	2.08±0.18	3.96±0.50	0.287±0.057	0.390±0.23	0.352±0.104	0.001±0.001
9	0.130±0.027	0.148±0.057	0.004±0.004	0.019±0.011	0.028±0.015	3.12±1.06	5.86±1.43	0.352±0.096	0.977±0.436	1.06±0.345	
10	0.314±0.081	0.074±0.013	0.012±0.004	0.011±0.005	0.011±0.005	2.08±0.28	5.15±0.57	0.184±0.021	0.906±0.295	0.818±0.222	
11	0.242±0.049	0.050±0.003	0.003±0.003	0.017±0.011	0.017±0.011	1.62±0.09	3.78±0.24	0.153±0.017	1.345±0.117	1.423±0.102	
12	0.246±0.033	0.108±0.015	0.009±0.006	0.009±0.006	0.009±0.006	2.05±0.18	4.53±0.35	0.191±0.009	1.391±0.127	1.291±0.131	
13	0.182±0.013	0.111±0.048	0.034±0.023	0.014±0.002	0.014±0.002	1.76±0.27	6.01±1.99	0.200±0.052	1.20±0.101	1.18±0.129	
14	0.212±0.050	0.057±0.009	0.005±0.004	0.014±0.002	0.014±0.002	1.44±0.11	3.87±0.25	0.146±0.023	1.242±0.105	0.400±0.139	
15	0.167±0.047	0.062±0.008	0.013±0.007	0.013±0.007	0.013±0.007	1.35±0.09	3.28±0.33	0.113±0.007	1.128±0.071	0.155±0.045	
16	0.174±0.033	0.053±0.003	0.002±0.002	0.012±0.006	0.012±0.006	1.36±0.17	3.32±0.23	0.126±0.003	0.113±0.048	0.241±0.062	
17	0.281±0.047	0.095±0.019	0.013±0.006	0.013±0.006	0.013±0.006	1.62±0.09	3.86±1.02	0.178±0.036	0.317±0.24	0.468±0.281	
18	0.175±0.021	0.057±0.003	0.003±0.002	0.003±0.002	0.003±0.002	1.34±0.09	3.59±0.22	0.112±0.016	0.157±0.092	0.201±0.111	
19	0.135±0.024	0.073±0.006	0.003±0.002	0.003±0.002	0.003±0.002	1.32±0.06	3.08±0.46	0.152±0.013	0.067±0.023	0.091±0.030	
20	0.143±0.025	0.058±0.001	0.013±0.001	0.013±0.001	0.013±0.001	1.36±0.05	3.27±0.50	0.139±0.013	0.154±0.100	0.225±0.143	
21	0.154±0.009	0.075±0.003	0.007±0.005	0.027±0.007	0.027±0.007	1.30±0.14	3.43±0.46	0.154±0.019	0.186±0.103	0.372±0.199	0.007±0.005

Tabla 5:

Efecto de la remoción de un volumen constante de sangre sobre el número de las diferentes poblaciones de células nucleadas circulantes en conejos que no fueron suplementados con hierro. Se presenta el promedio (No. X 10³/mm³) ± E.S. n = 4

Figura 5:

Efecto del sangrado diario sobre el número de segmentados en conejos con (—) $n = 3$ y sin (---) $n = 4$ suplemento de hierro. Se presenta la media \pm E.S.

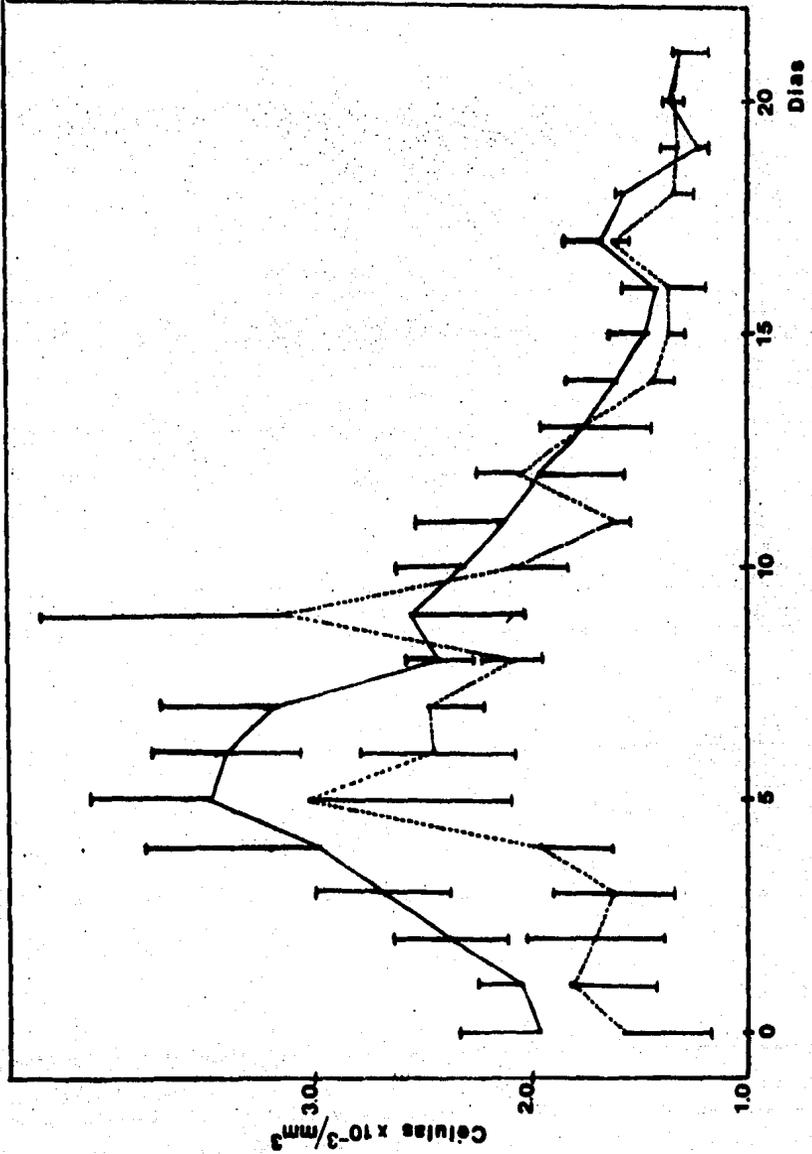


Figura 6:

Variación en el número de linfocitos en conejos anémicos con (—) $n = 3$ y sin (---) $n = 4$ suplemento de hierro. Se presenta la media \pm E.S.

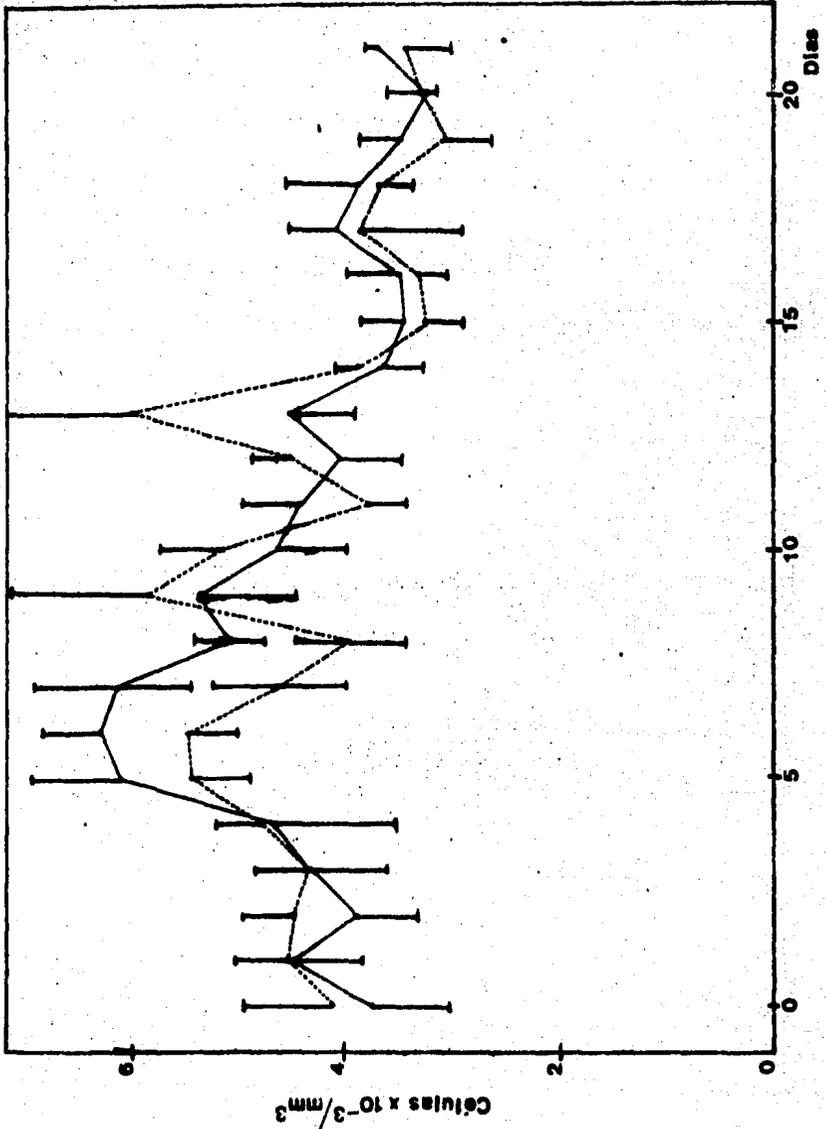


Figura 7:

Efecto de la inducción de anemia crónica sobre el número de normoblastos en conejos con (—) $n = 3$ y sin (---) $n = 4$ suministro de hierro. Se muestra la media \pm E.S.

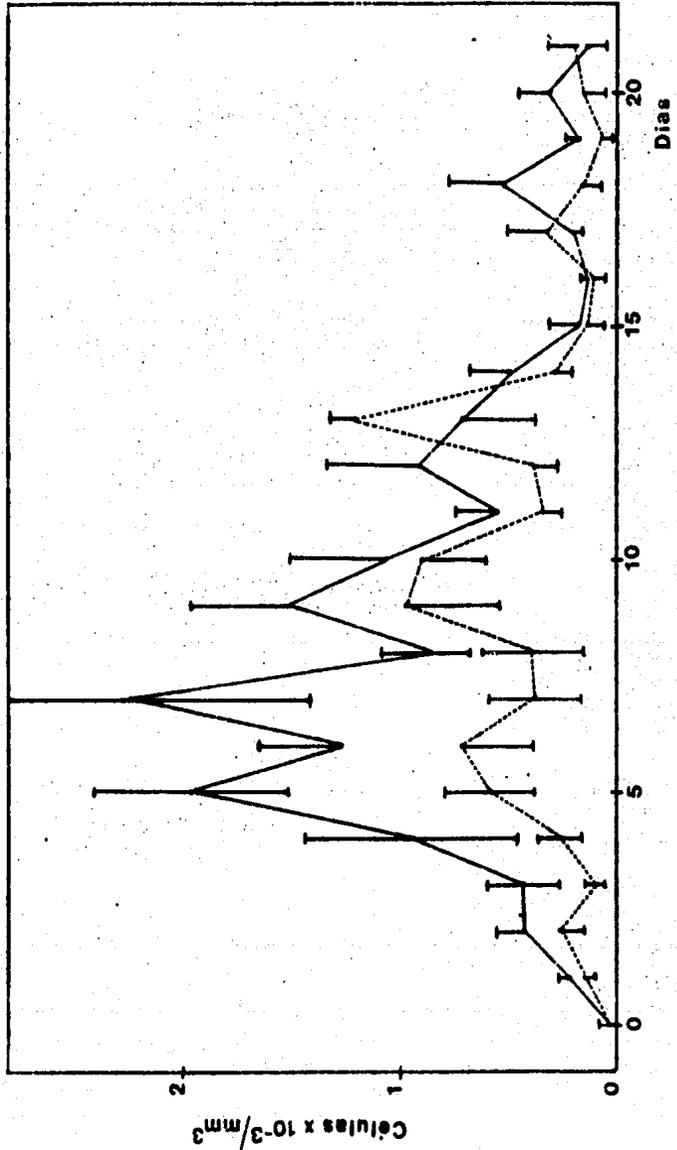


Figura 8:

Efecto de la administración de hierro dextrán durante el sangrado en el contenido de hierro sérico. Conejos con (—) $n = 3$ y sin (---) $n = 4$ suplemento de hierro. Tomada de Pulido, G. (48).

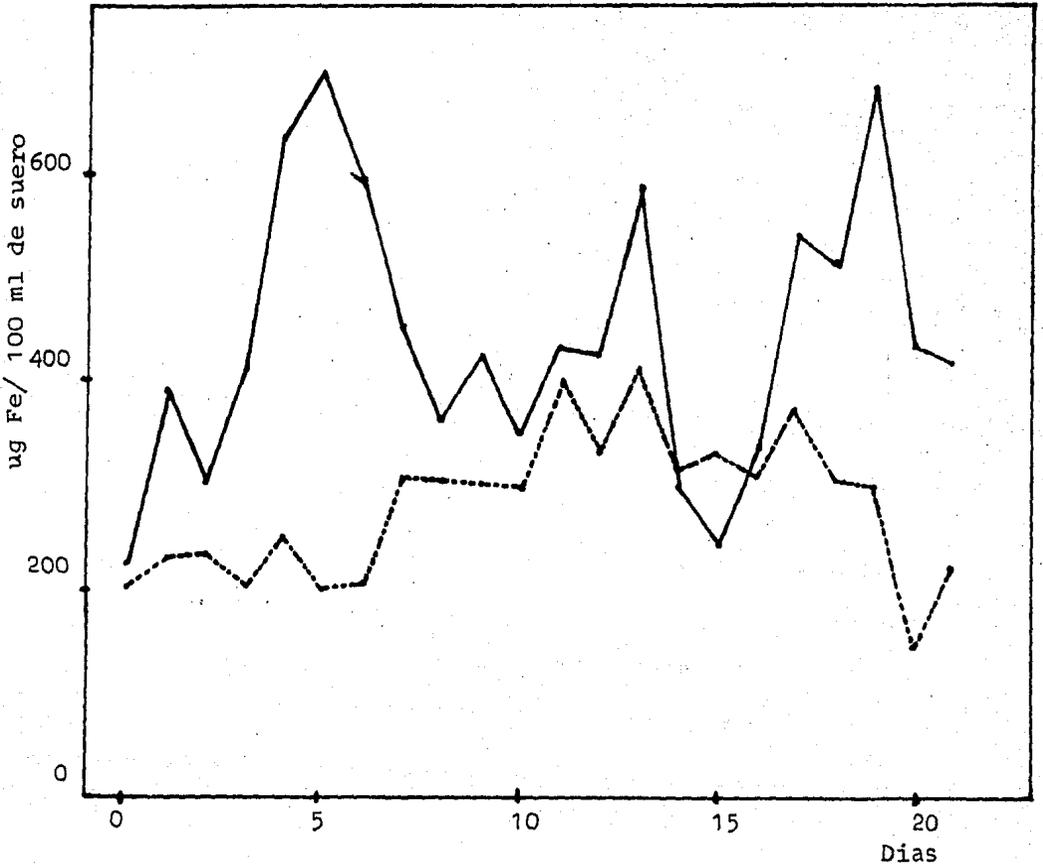


Figura 9:

Relación entre el contenido de hierro sérico (—) y el número de normoblastos (---) a lo largo del sangrado en conejos anémicos suplementados con hierro.

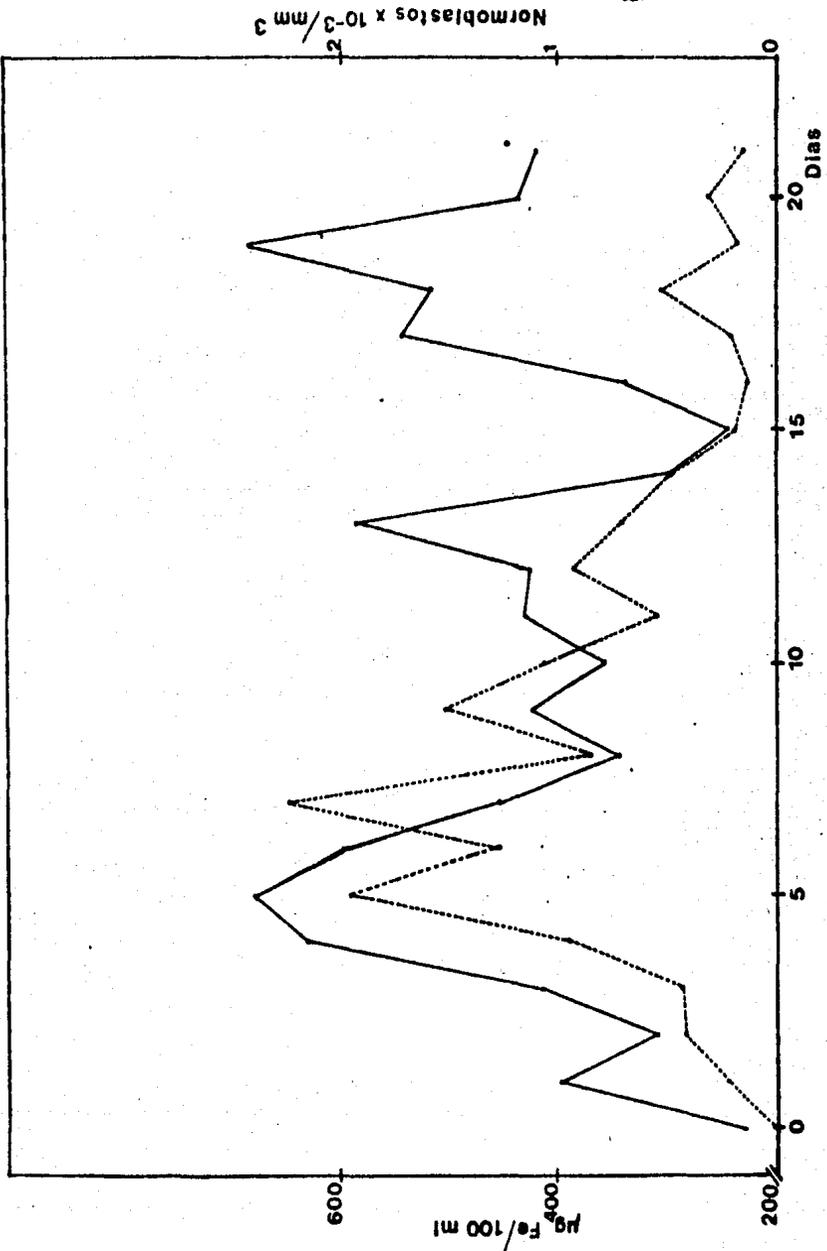
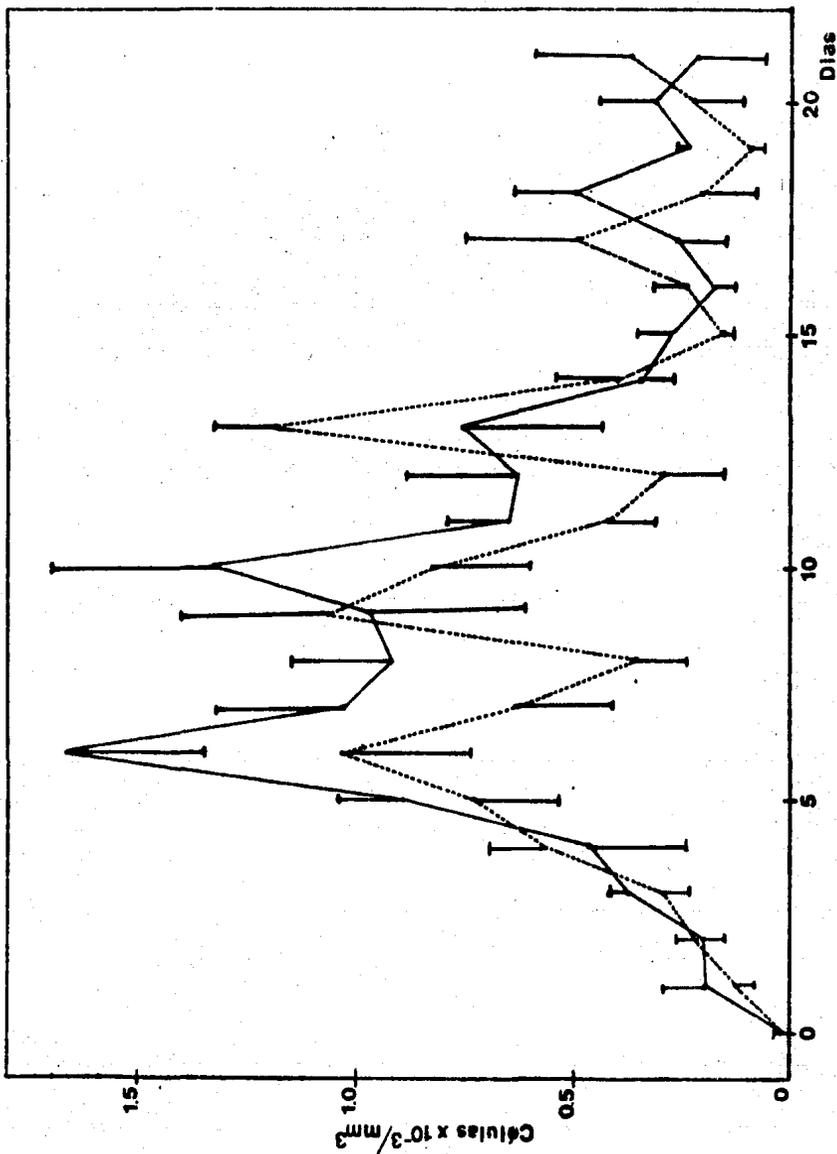


Figura 10:

Efecto de la remoción de un volúmen constante de sangre en el número de microlinfocitos en conejos con (—) $n = 3$ y sin (---) $n = 4$ suplemento de hierro. Se presenta la media \pm E.S.



2° Experimento:

Efecto del suministro de transferrina sobre la ci
nética de las células nucleadas circulantes de co
nejos anémicos no suplementados con hierro.

Los resultados obtenidos en el 1er experimento nos permiten establecer que el hierro no es el factor limitante para la producción de células rojas, ya que no se encontraron diferencias en el número de eritrocitos o en la cantidad de hemoglobina en los dos grupos. Se pensó que la cantidad de transferrina circulante podría ser el factor limitante y por tanto se decidió investigar el papel que juega esta proteína en la eritropoyesis y, específicamente en la producción de células nucleadas. Se traba
jó con organismos no suplementados con hierro ya que las características cinéticas de las células blancas, y en particular de los normoblastos y microlinfocitos en respuesta a la inducción de la anemia en presencia y ausencia de un suministro de hierro, permitió inferir una modificación en el sistema transportador de hierro en los conejos.

Se indujo la anemia a dos grupos de conejos, el experimental solamente con dos individuos (debido a la cantidad de transferrina disponible) y el control con 5 individuos. En el día 11 de sangrado se inyectó transferrina purificada a los conejos ex
perimentales (ver Materiales y Métodos). La cantidad de transfe
rrina a inyectar se calculó con base en el trabajo de Pulido (48) quien mostró que en condiciones normales existen 2 mg de transfe
rrina/ml de suero, y que al inducir la anemia se incrementa su concentración a aproximadamente 3 mg/ml de suero. Si consideramos que el volúmen sanguíneo total del conejo es cercano a 80 ml

la inyección de 276 mg de transferrina saturada en un 80% con hierro, es suficiente para duplicar la concentración de transferrina circulante.

Cuando se determina la concentración de transferrina una hora después de la inyección se aprecia un incremento de aproximadamente el doble en relación a los valores obtenidos al examinarse la muestra del día 11. Por el contrario, en los conejos inyectados con solución salina, los niveles de transferrina disminuyen de una a dos veces aproximadamente. Veinticuatro horas después se restablece la concentración de transferrina en ambos grupos (48).

En la tabla 6 y en la figura 11 se presentan los cambios en el número de células nucleadas totales a lo largo de los días de sangrado en el grupo control y en el grupo experimental. Durante los primeros días se observa la tendencia a aumentar el número de células en ambos grupos, sin embargo, después de haber inyectado la transferrina se observa un incremento notable en el número de células en los conejos experimentales con máximo en el día 14. Estos valores disminuyen posteriormente y se presenta una segunda elevación de menor magnitud, en los días 17 y 18. El grupo control no presenta cambios significativos en el número de células nucleadas en el periodo de los días 12 a 21. Si se compara el número de células nucleadas totales entre los días 12 y 21 de ambos grupos de conejos se obtienen valores para los conejos control de $5.439 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 0.105$, y para el grupo experimental $10.739 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 0.863$, valores significativamente diferentes ($p < 0.001$).

Cabe recordar que una hora después de haber inyectado a los conejos con solución salina o transferrina, se obtuvo una alicuo

ta de sangre para determinar nuevamente los parámetros hematológicos. Cuando se comparan las células nucleadas circulantes se obtienen los siguientes datos:

Día 11	1 Hora después	Día 12
Conejos Control:		
$5.02 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 0.285$	$5.03 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 0.207$	$5.44 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 0.421$
Conejos Experimentales:		
$5.55 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 0.750$	$2.19 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 0.362$	$10.44 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 5.14$

Cuando se comparan los valores obtenidos 1 hora después de inyectar solución salina a los conejos control con sus valores del día 11, se observa que se han recuperado completamente (105.47%), y que se encuentran 2.57% por debajo de los valores que presentan 24 horas después. Sin embargo, en los conejos experimentales, la transferrina modifica de tal manera la homeostasis sanguínea, que una hora después de elevar su concentración en la circulación los conejos presentan un déficit de 60.54% en el número de células nucleadas sanguíneas. Estos datos sugieren que en las condiciones "normales" del proceso de inducción de la anemia, las células nucleadas restablecen rápidamente su número en la circulación, ya que en el lapso de 2 horas se encuentran prácticamente en los valores que presentarán al día siguiente. Por tanto, resultará importante establecer el patrón de liberación de las células en ese periodo.

Las variaciones en el número de cada uno de los tipos celulares circulantes se presentan en la Tabla 7 para el grupo control y, en la Tabla 8 para la población experimental. Aunado al conteo global que se hizo una hora después de haber inyectado a los conejos, se hizo el conteo diferencial cuyos resultados se

presentan en las Tablas 7 y 8 como día 11'. Estos datos permitieron detectar variaciones muy importantes en el grupo control y en el experimental. Al comparar cada una de las poblaciones en los conejos que recibieron solución salina, se ve que no existen diferencias significativas entre los valores una hora después de la inyección con el día 11 o con el día 12. Pero en el caso de los conejos experimentales, se observa que una hora después de inyectar la transferrina, las poblaciones de basófilos, segmentados y monocitos disminuyen mucho; los eosinófilos y las células inmaduras desaparecen de la circulación; los normoblastos no presentan modificaciones notables y, en cambio, los linfocitos y microlinfocitos constituyen casi la totalidad de las células circulantes en este tiempo. Comparando el patrón de incremento de las diversas poblaciones en el día 12 de sangrado, puede dividírseles en dos categorías de células independientemente de si los conejos son o no suplementados con hierro. Aquellas poblaciones que responden a la transferrina incrementando rápidamente su número, es decir al día 12, y por otro lado las células que presentan un retraso en este fenómeno de aumento. Así, tenemos que:

en el día 12 se incrementan
eosinófilos, segmentados, normoblastos y microlinfocitos;
y en el día 13 se incrementan
linfocitos y monocitos.

Los basófilos son la única población que presenta modificaciones en su comportamiento dependiendo del suministro o no de hierro. Adelantando en lo que se refiere a su comportamiento en el 3er experimento, vemos que en el caso de conejos suplementados con hierro los basófilos aumentan en el día 13, y en este sese

gundo experimento en que los conejos no reciben hierro, lo presentan en el día 12.

La cinética de los basófilos se muestra en la figura 12 para ambos grupos de conejos. Hasta el momento de inyectarse la transferrina, no existen diferencias en los dos grupos, pero después del día 11, se presentan cambios que modifican significativamente ($p < 0.001$) el número de basófilos en los conejos experimentales. El aumento de estas células se presenta en dos fases, la primera comprende los días 12 a 14 en los que constituyen el $2.17 \pm 0.414\%$ del aumento en células nucleadas totales y la segunda, de menor magnitud, va del día 17 al 19 en que representan $1.67 \pm 0.277\%$ del aumento en células nucleadas.

El número de eosinófilos de los dos grupos a lo largo del sangrado se presenta en la figura 13. Encontramos que no existen diferencias entre el día 0 y el 11 entre ambos grupos, y sí a partir del día 12, en que adquieren un alto nivel de significancia ($p < 0.001$). Esta población presenta una onda de aumento muy marcada entre los días 12 y 15 constituyendo el $1.97 \pm 0.36\%$ del aumento en células nucleadas en este período.

El comportamiento de la población de segmentados durante el periodo de sangrado se muestra en la figura 14 para los dos grupos de conejos. Como resulta evidente en la gráfica, los segmentados tienen una cinética igual en la primera fase de la anemia, pero al inyectar la transferrina, se inducen modificaciones en el número de células de esta población que hacen que los dos grupos de conejos sean significativamente diferentes ($p < 0.001$) a partir del día 12. El aumento de estas células en los días 12 a 14 constituye el $64.33 \pm 14.47\%$ del incremento en las células nucleadas totales. A partir del día 15 esta población representa

el $42.97 \pm 4.58\%$ convirtiéndose en la población más abundante de las células nucleadas circulantes.

Una población que resulta muy peculiar en este grupo ya que es la única en él que se incrementa al determinarse su número una hora después de haber inyectado a los conejos transferrina, es la de los microlinfocitos. Su cinética se muestra en la figura 15. Puede observarse que en los primeros días de sangrado no existen diferencias entre ambos grupos de conejos y, que las diferencias adquieren nivel de significancia estadística a partir del día 12 ($0.01 < p < 0.001$). El incremento en el número de microlinfocitos después del tratamiento (transferrina), se presenta en etapas. La primera, de mayor magnitud comprende el día 12, la segunda entre los días 13 y 15 y la tercera del día 17 al 21. En cada una de estas etapas se calculó el porcentaje representado por los microlinfocitos del aumento en células nucleadas circulantes obteniéndose los valores de 24.91% para el día 12, para los días 13 a 15 $4.67 \pm 1.76\%$, y $10.33 \pm 0.249\%$ para el periodo final de incremento.

La última población perteneciente al primer grupo de células por su respuesta a la inyección de transferrina es la de normoblastos. La cinética seguida por este tipo celular a lo largo de los días de sangrado se presenta en la figura 16 para los dos grupos de conejos. Nuevamente se encuentra que los conejos control son iguales a los experimentales entre los días 0 y 11, pero son significativamente diferentes después de inyectar la transferrina ($0.01 < p < 0.001$). El incremento que tienen los normoblastos se presenta al igual que en el caso de los microlinfocitos en fases. La primera comprende los días 12 a 14 y en ella estas células constituyen el $3.93 \pm 0.991\%$ del aumento en el nú

mero de células nucleadas totales. La segunda etapa es de mayor magnitud y se presenta a partir del día 17 formando en este periodo el $4.47 \pm 1.24\%$ del aumento en células totales.

Resulta importante observar que el segundo grupo de células por su respuesta a la inyección de transferrina está constituido por los leucocitos mononucleares. De ellos los monocitos, cuya cinética se presenta en la figura 17 a lo largo del periodo de sangrado, son iguales en número en ambos grupos entre los días 0 y 11. Y, al igual que las otras poblaciones hasta aquí presentadas son significativamente diferentes ($0.01 < p < 0.001$) una vez administrada la transferrina. El incremento en el número de monocitos se inicia el día 13 y se presenta en dos fases que en conjunto representan el $6.1 \pm 0.9\%$ del aumento en el número de células nucleadas circulantes en este periodo.

Finalmente los linfocitos, que se presentan en la figura 18, constituyen una población muy abundante y que muestra diferencias ligeras con los otros tipos celulares en su comportamiento en respuesta a la inyección de transferrina. Primero hay que mencionar que efectivamente, al comparar al grupo control con el experimental existen diferencias significativas ($0.01 < p < 0.001$) después de inyectada la transferrina. Segundo, el día 12 el número de linfocitos decrece bastante, fenómeno que no presentan los monocitos. Tercero, el incremento que tienen a partir del día 13 no muestra fases tan claramente definidas como en el caso de otras células. Sin embargo, es a partir de este día que los linfocitos constituyen el $32.41 \pm 6.71\%$ del aumento en células nucleadas totales, convirtiéndose en la segunda población en función de su abundancia.

En conclusión, puede decirse que la administración intravenosa de transferrina en el día 11 de sangrado a conejos no suplementados con hierro, induce profundas modificaciones en la cinética de las células nucleadas. El primer efecto observable es la disminución en el número de células en la circulación una hora después de haberse inyectado la proteína. Posteriormente, se induce un aumento muy marcado en el número de células en la circulación. Este aumento está determinado principalmente por la liberación y diferenciación hacia tres poblaciones: segmentados, microlinfocitos y linfocitos.

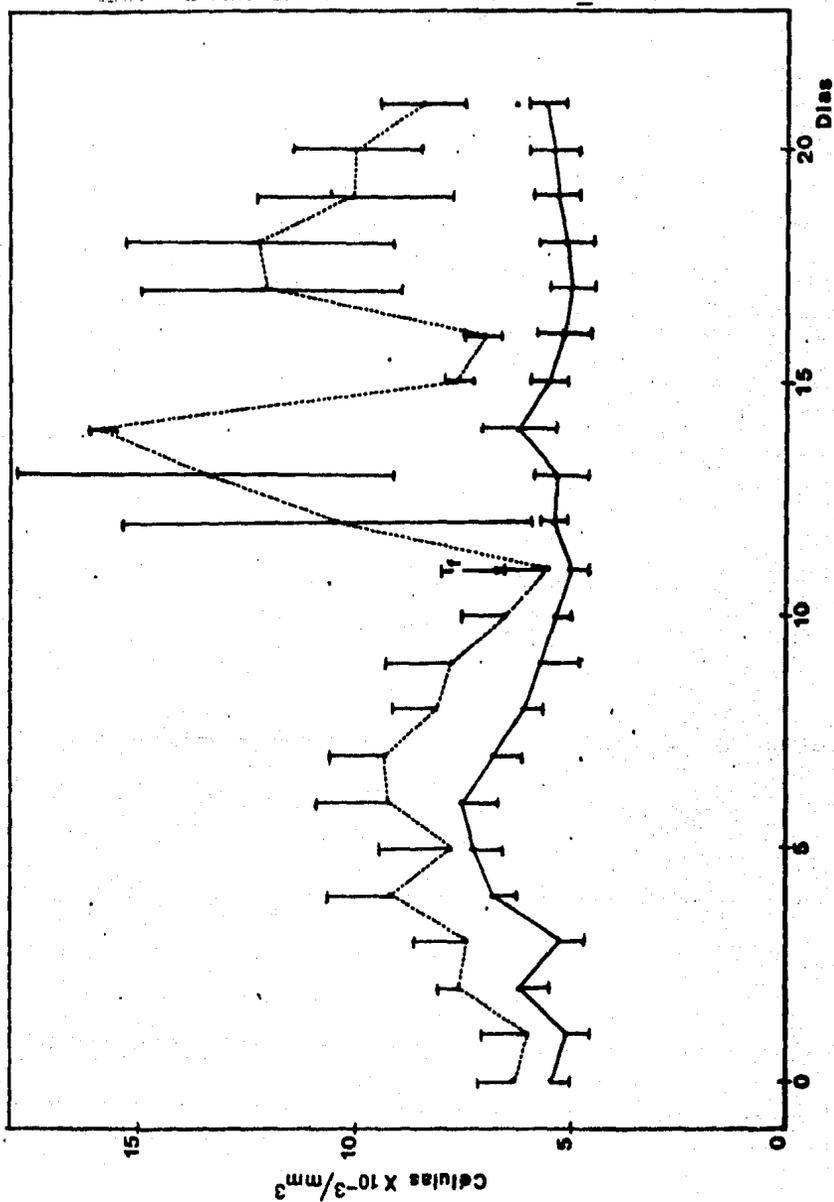
Tabla 6:

Variación en el número de células nucleadas circulantes a lo largo del periodo de sangrado en el grupo experimental ($n = 2$) que recibió transferrina y el grupo control ($n = 5$). Se presenta la media \pm E.S.

Día	Grupo Control (No. $\times 10^3/\text{mm}^3$)	Grupo Experimental (No. $\times 10^3/\text{mm}^3$)
0	5.48 \pm 0.456	6.35 \pm 0.050
1	5.11 \pm 0.377	6.05 \pm 0.872
2	6.24 \pm 0.690	7.65 \pm 0.250
3	5.28 \pm 0.488	7.44 \pm 1.14
4	6.85 \pm 0.640	9.22 \pm 1.30
5	7.30 \pm 0.866	7.81 \pm 1.51
6	7.56 \pm 0.907	9.26 \pm 1.69
7	6.82 \pm 0.743	9.32 \pm 1.25
8	6.15 \pm 0.526	8.16 \pm 0.962
9	5.74 \pm 0.850	7.83 \pm 1.53
10	5.40 \pm 0.411	6.57 \pm 0.725
11	5.01 \pm 0.285	5.55 \pm 0.750
12	5.44 \pm 0.421	10.44 \pm 5.14
13	5.36 \pm 0.677	13.40 \pm 4.90
14	6.25 \pm 0.907	15.95 \pm 0.025
15	5.54 \pm 0.489	7.70 \pm 0.225
16	5.20 \pm 0.613	7.07 \pm 0.375
17	5.05 \pm 0.572	12.05 \pm 2.95
18	5.16 \pm 0.619	12.25 \pm 3.15
19	5.36 \pm 0.445	10.07 \pm 2.20
20	5.43 \pm 0.483	10.05 \pm 1.52
21	5.60 \pm 0.479	8.41 \pm 1.01

Figura 11:

Efecto de la inyección de transferrina (Tf) sobre el número de células nucleadas circulantes en el grupo experimental (---) $n=2$ comparados con el grupo control (—) $n=5$. Se presenta la media \pm E.S.



Día	Basófilos	Eosinófilos	Mielocitos	Juveniles	Bandas	Segmentados	Linfocitos	Monocitos	Plasmoblastos	Micrelinfocitos	Plastos
0	0.155±0.030	0.000±0.000	0.002±0.000		0.019±0.000	1.81±0.230	1.28±0.230	0.131±0.010	0.016±0.010	0.009±0.000	
1	0.170±0.020	0.053±0.000	0.002±0.000	0.003±0.000	0.043±0.000	1.75±0.300	2.87±0.140	0.119±0.020	0.065±0.000	0.020±0.015	
3	0.153±0.055	0.050±0.010		0.006±0.000	0.033±0.010	1.42±0.270	3.21±0.180	0.133±0.000	0.146±0.000	0.123±0.016	
5	0.264±0.050	0.088±0.010		0.002±0.000	0.040±0.000	2.24±0.480	3.91±0.460	0.193±0.030	0.275±0.160	0.281±0.090	
7	0.243±0.030	0.094±0.030		0.005±0.000	0.033±0.010	2.41±0.560	3.55±0.250	0.133±0.010	0.178±0.080	0.168±0.040	
9	0.113±0.020	0.084±0.020			0.043±0.000	2.21±0.720	2.89±0.270	0.178±0.050	0.095±0.020	0.129±0.030	
11	0.156±0.040	0.078±0.010	0.004±0.000	0.006±0.000	0.026±0.000	1.80±0.240	2.62±0.140	0.131±0.010	0.066±0.020	0.136±0.040	
11*	0.082±0.020	0.093±0.000		0.004±0.000	0.033±0.000	1.89±0.220	2.64±0.140	0.109±0.010	0.060±0.030	0.209±0.050	
12*	0.136±0.020	0.064±0.000		0.005±0.000	0.020±0.000	2.06±0.230	2.76±0.270	0.131±0.010	0.081±0.030	0.186±0.000	
12	0.116±0.020	0.071±0.000	0.001±0.000	0.002±0.000	0.042±0.000	2.03±0.350	2.76±0.380	0.179±0.030	0.051±0.020	0.104±0.030	
14	0.121±0.010	0.075±0.010		0.003±0.000	0.037±0.000	1.96±0.340	3.55±0.560	0.186±0.020	0.126±0.060	0.202±0.030	
15	0.117±0.010	0.090±0.000			0.042±0.010	1.66±0.230	3.13±0.310	0.165±0.010	0.110±0.050	0.223±0.030	
16	0.121±0.010	0.074±0.020			0.021±0.000	1.79±0.390	2.86±0.210	0.204±0.020	0.040±0.020	0.085±0.030	
17	0.119±0.010	0.053±0.010		0.007±0.000	0.013±0.000	1.59±0.300	2.99±0.370	0.154±0.020	0.039±0.010	0.058±0.016	0.010±0.000
18	0.115±0.000	0.050±0.000		0.007±0.000	0.028±0.000	1.57±0.250	2.99±0.470	0.221±0.020	0.07±0.010	0.112±0.030	
19	0.145±0.010	0.062±0.010		0.002±0.000	0.029±0.010	1.74±0.370	2.99±0.240	0.254±0.020	0.062±0.010	0.058±0.015	0.011±0.010
20	0.191±0.030	0.087±0.020			0.021±0.000	1.72±0.350	3.09±0.380	0.187±0.020	0.053±0.010	0.076±0.020	
21	0.261±0.030	0.076±0.000			0.026±0.000	1.78±0.210	2.98±0.290	0.229±0.020	0.086±0.010	0.162±0.030	

Tabla 7:

Variación en el número de las diferentes poblaciones de células nucleadas de conejos por efecto del sangrado diario en conejos no suplementados con hierro. Se presentan los promedios del grupo control n = 5 (No. X 10³/mm³ ± E.S.).

Día	Basófilos	Eosinófilos	Mielocitos	Juveniles	Bandas	Segmentados	Linfocitos	Monocitos	Formohlas- tas	Microlinfocitos	Plastos
0	0.158±0.019	0.070±0.006		0.006±0.006	0.031±0.006	1.93±0.098	4.00±0.086	0.146±0.007		0.012±0.013	
1	0.115±0.003	0.064±0.003			0.027±0.013	1.60±0.276	3.93±0.559	0.170±0.048	0.088±0.008	0.022±0.008	
3	0.212±0.099	0.081±0	0.008±0.008		0.019±0.003	2.03±0.247	4.44±0.806	0.167±0.028	0.272±0.028	0.204±0.025	
5	0.273±0.085	0.098±0.013			0.056±0.011	1.88±0.580	4.62±0.742	0.112±0.023	0.411±0.035	0.350±0.127	
7	0.268±0.014	0.216±0.035		0.009±0.009	0.042±0.002	2.41±0.247	5.40±0.792	0.265±0.086	0.376±0.093	0.330±0.091	
9	0.093±0.021	0.097±0		0.006±0.006	0.034±0.002	1.97±0.099	4.66±0.855	0.221±0.085	0.170±0.071	0.573±0.403	
11	0.183±0.006	0.073±0.008		0.009±0.009	0.020±0.007	1.53±0.005	3.31±0.615	0.145±0.003	0.154±0.070	0.112±0.064	
11*	0.006±0.006					0.076±0.056	1.57±0.325	0.003±0.003	0.093±0.047	0.427±0.042	0.012±0.006
12	0.274±0.120	0.220±0.120	0.012±0.012		0.195±0.098	5.76±2.92	1.98±0.396	0.122±0.025	0.375±0.238	1.33±1.04	
13	0.418±0.092	0.203±0.106	0.017±0.017		0.337±0.177	7.01±3.59	3.88±0.262	0.749±0.281	0.311±0.099	0.406±0.212	
14	0.156±0.003	0.214±0.020			0.245±0.078	5.39±1.23	7.58±0.905	0.499±0.001	0.703±0.318	0.953±0.071	
15	0.211±0.078	0.113±0.025		0.007±0.008	0.075±0.031	2.51±0.177	4.34±0.184	0.225±0.035	0.051±0.021	0.159±0.086	
16	0.192±0.039	0.063±0.011			0.062±0.003	1.98±0.023	4.35±0.375	0.325±0.103	0.013±0.013	0.093±0.049	
17	0.263±0.021	0.112±0.060			0.181±0.077	3.73±1.03	6.52±1.440	0.674±0.240	0.281±0.005	0.275±0.069	
18	0.329±0.068	0.160±0.078			0.104±0.055	3.92±0.721	5.64±1.480	0.548±0.141	0.751±0.226	0.784±0.375	
19	0.255±0.027	0.163±0.011			0.066±0.021	3.55±0.050	4.85±1.51	0.364±0.029	0.263±0.170	0.560±0.377	
20	0.179±0.095	0.151±0.035		0.010±0.010	0.046±0.013	3.63±0.134	4.75±0.742	0.338±0.036	0.331±0.207	0.608±0.488	
21	0.190±0.006	0.138±0.012			0.044±0.011	3.43±0.042	3.61±0.650	0.287±0.047	0.301±0.134	0.409±0.226	

Tabla 8:

Variación en el número de las diferentes poblaciones de células nucleadas en conejos anémicos no suplementados con hierro a los cuales se administra transferrina en el día 11. Se presentan los promedios del grupo experimental n = 2 (No. X 10³/mm³ ± E.S.).

Figura 12:

Variaciones en el número de basófilos en conejos que reciben transferrina (Tf) (---) $n = 2$ comparados con el grupo control (—) $n = 5$. Se presenta la media \pm E.S.

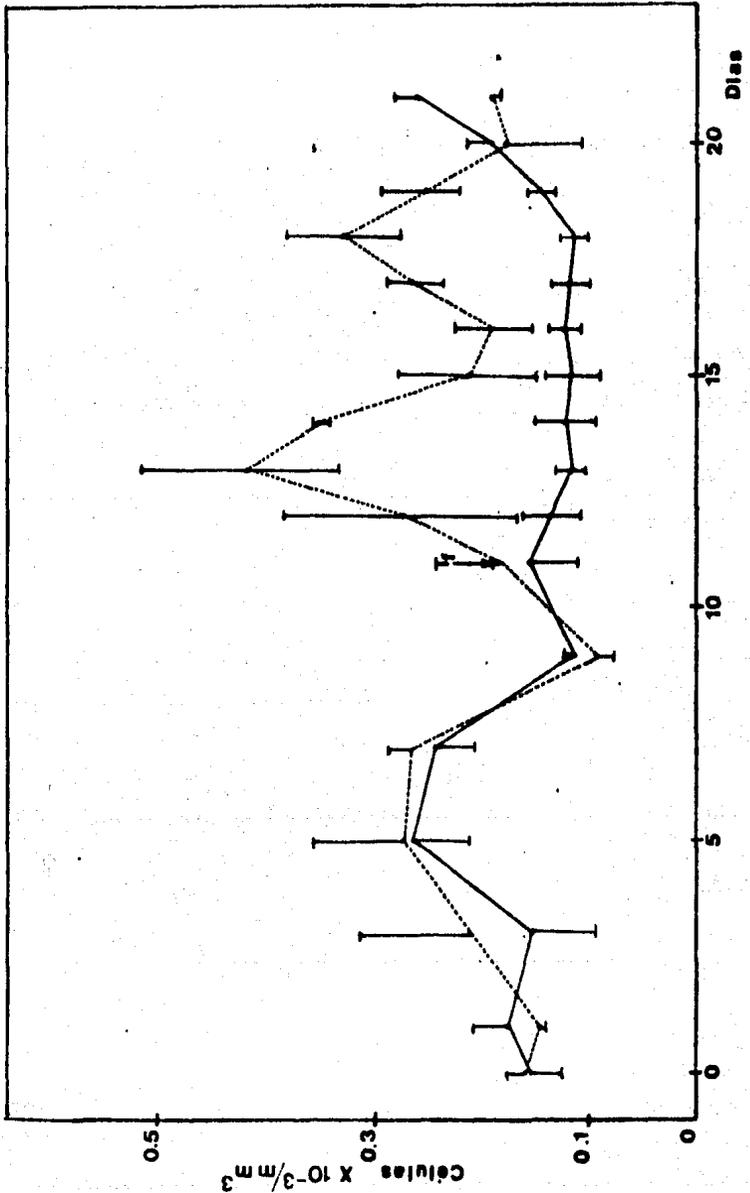


Figura 13:

Variaciones en el número de eosinófilos de conejos anémicos. Se presenta el grupo control (—) $n = 5$ y el grupo experimental (---) $n = 2$ que recibe transferrina. Media \pm E.S.

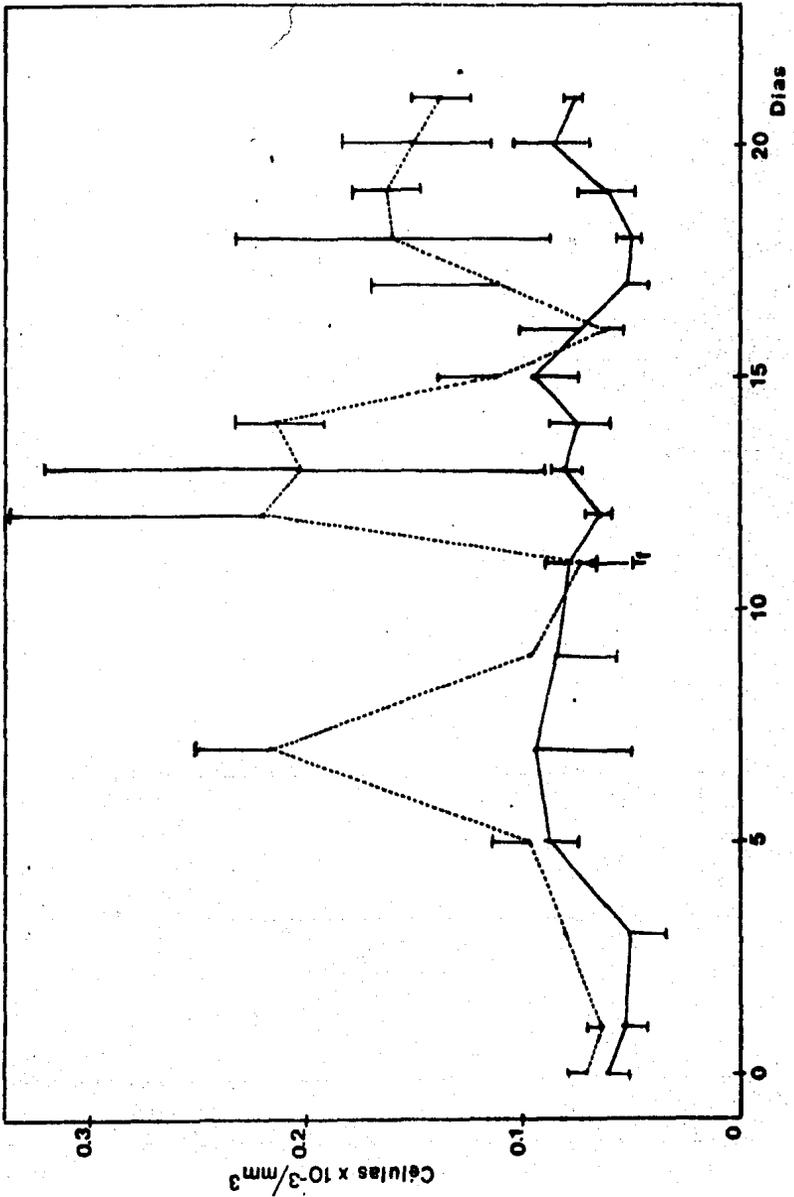


Figura 14:

Variación en el número de segmentados de conejos hechos anémicos en el grupo control (—) $n=5$ y el grupo experimental (---) $n=2$ que recibe transferrina. Se presenta la media \pm E.S.

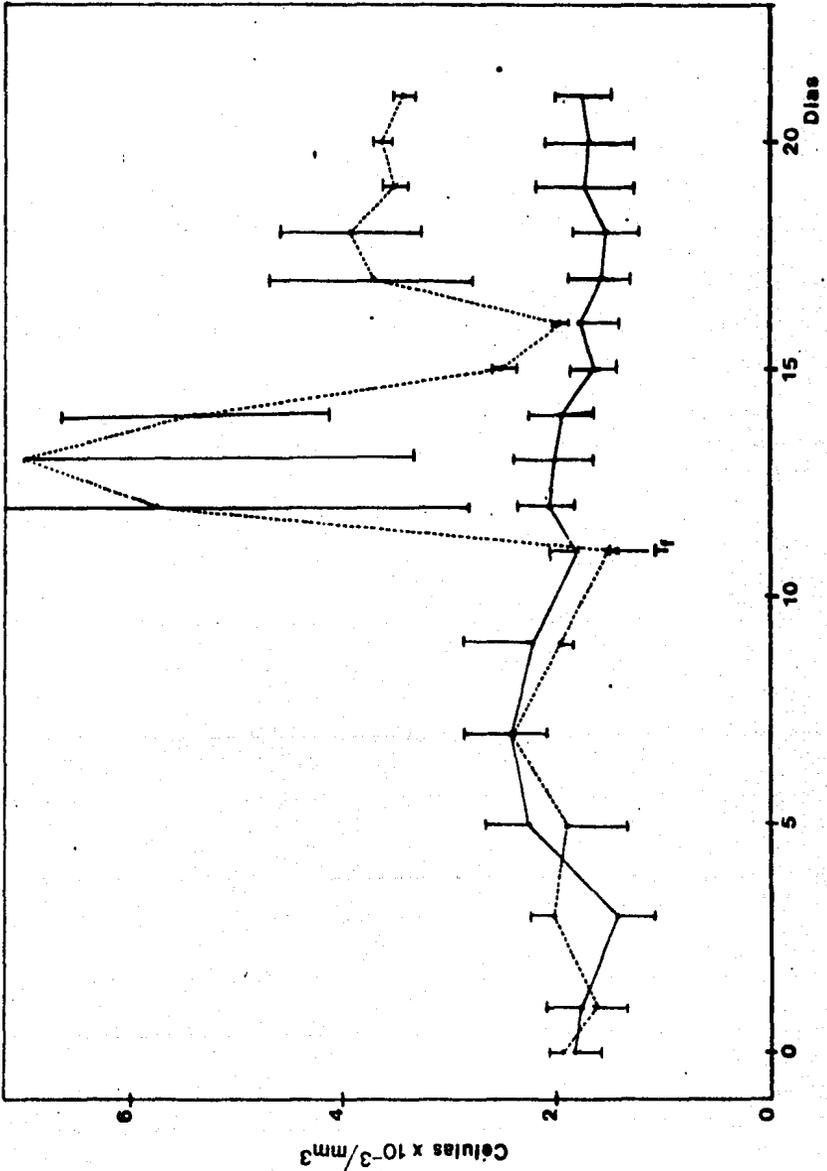


Figura 15:

Efecto de la inyección de transferrina en el grupo experimental de conejos (---) $n = 2$ y el grupo control (—) $n = 5$ en el número de microlinfocitos. Se presenta la media \pm E.S.

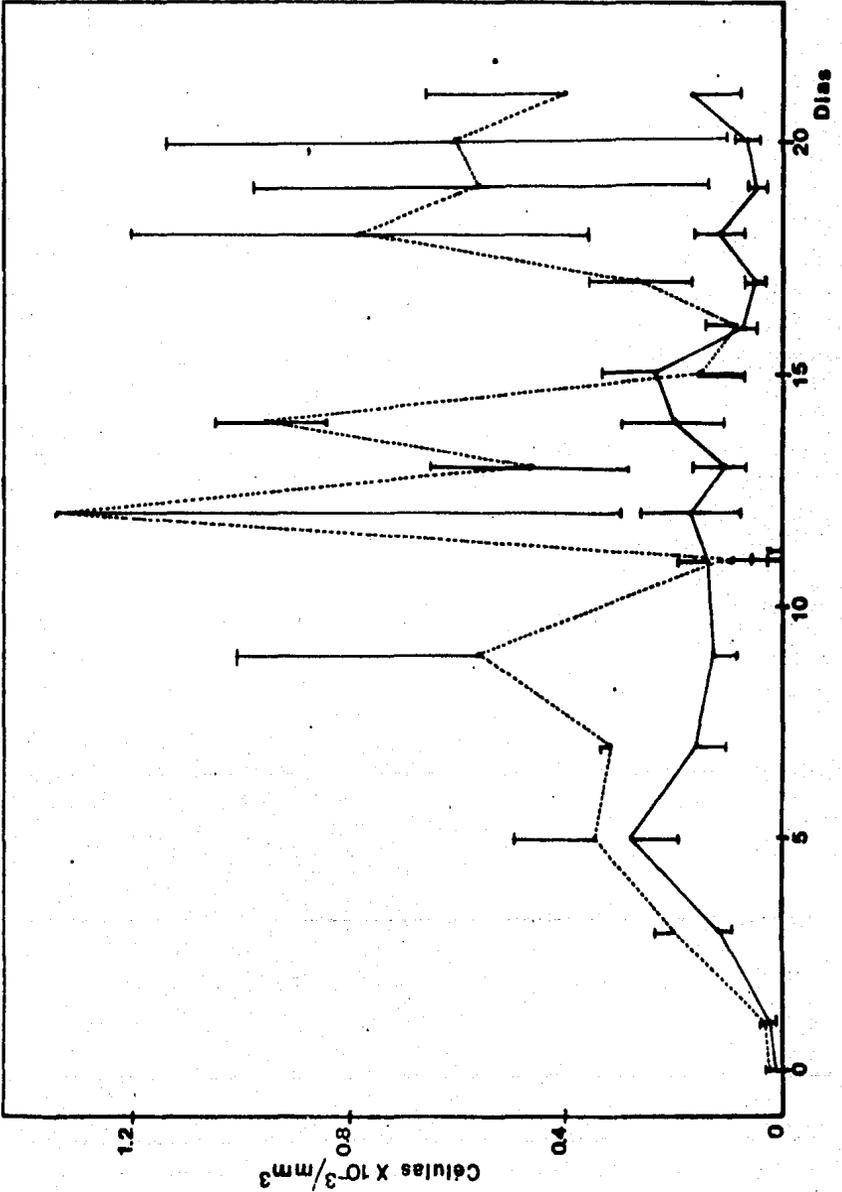


Figura 16:

Efecto de la administración de transferrina (TF) a conejos anémicos (---) $n=2$ comparados con el grupo control (—) $n=5$ sobre el número de normoblastos. Se presenta la media \pm E.S.

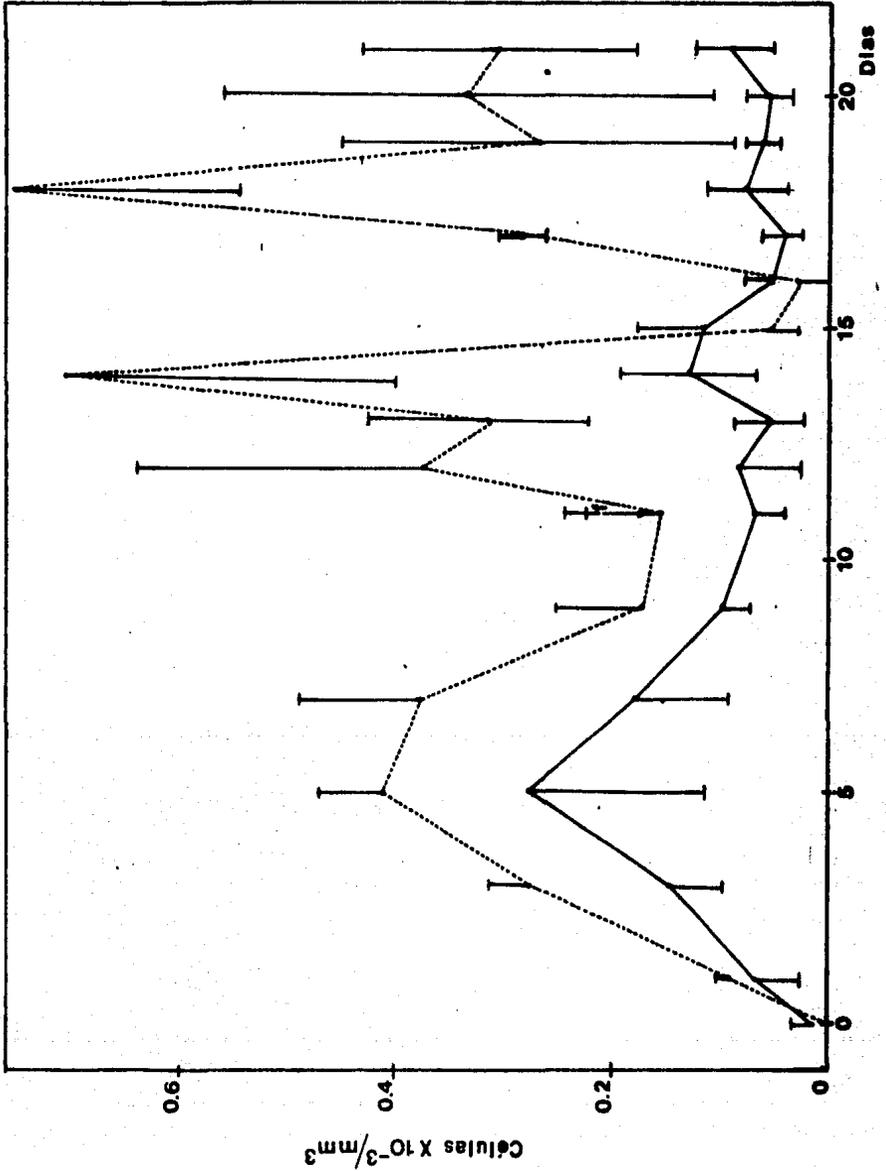


Figura 17:

Variación en el número de monocitos en el grupo control de conejos hechos anémicos (—) $n = 5$ comparados con el grupo experimental (---) $n = 2$ que recibe transferrina. Se presenta la media \pm E.S.

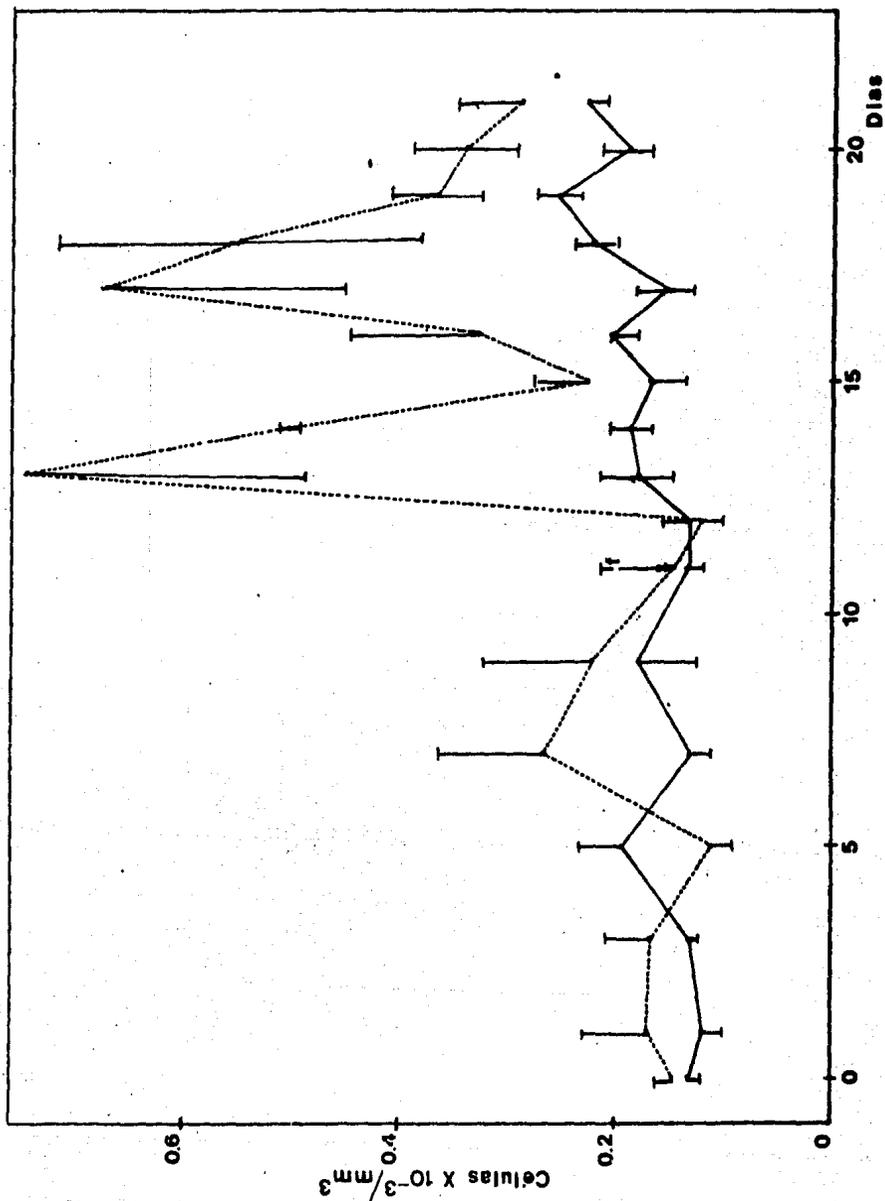
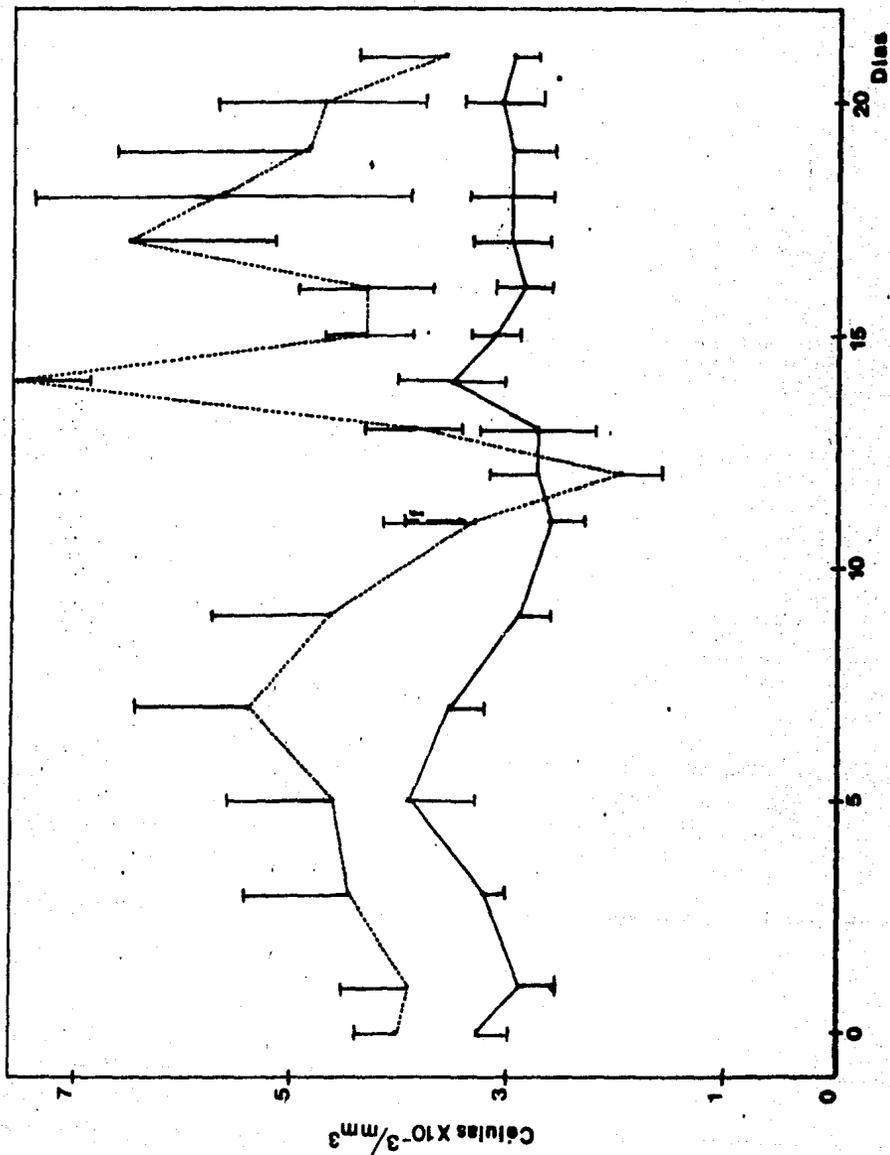


Figura 18:

Variación en el número de linfocitos en el grupo control de los conejos anémicos (—) $n = 5$ y el grupo experimental (---) $n = 2$ al inyectarse transferrina. Se presenta la media \pm E.S.



3er Experimento:

Efecto del suministro de apotransferrina sobre las células nucleadas circulantes de conejos anémicos suplementados con hierro.

Ya que hemos detectado y cuantificado diferencias entre los conejos que reciben hierro diariamente y los que no son suplementados con hierro, y que la inyección de transferrina induce modificaciones importantes en la mayoría de las células sanguíneas circulantes cuando se administra a conejos no suplementados con hierro, se decidió inyectar con apotransferrina a dos conejos que reciben diariamente hierro dextrán. Se inyectaron 425 mg de apotransferrina a cada individuo. El grupo control estuvo formado por tres conejos que recibieron el mismo volumen de solución salina. Se sangraron diariamente 10 ml/kg de peso y en el día 11 se les inyectó transferrina o salina, determinándose todos los parámetros hematológicos básicos a lo largo del periodo de sangrado.

Debido a que no se contaba con el conteo diferencial de los conejos entre los días 0 y 11, y sí con el número total de células, así como el número de cada una de las poblaciones sanguíneas a partir del día 12, se comparó el número total de células nucleadas circulantes de los conejos, con el de los conejos con suplemento de hierro del primer experimento. La comparación se hizo entre el día 0 y el 11, del 12 al 18, y el periodo total de sangrado, y se obtuvo a través del empleo de la prueba de t para muestras pequeñas, que los dos grupos son estadísticamente iguales. Posteriormente se hizo la prueba de t para cada una de las poblaciones de células nucleadas entre el día 12 y el 18 utili-

zando el número en cada día, así como su porcentaje. Por ello, una vez comprobado que ambos grupos de conejos tuvieron un comportamiento similar, se decidió utilizar el porcentaje de cada uno de los tipos celulares de los conejos suplementados con hierro del primer experimento para calcular ahora, el número de cada población entre los días 0 y 11 con el número de células totales de este tercer experimento.

En la tabla 9 y en la figura 19 se muestran los cambios en el número de células nucleadas circulantes a lo largo del período de sangrado para los grupos control y experimental. Al igual que en los experimentos anteriores se observa la tendencia a aumentar el número de células en los primeros días, sin que existan diferencias entre ambos grupos en este período. Sin embargo, una vez que se inyecta la transferrina en el día 11, se presenta un incremento muy marcado con un máximo en el día 14. Los conejos control mantienen constante su número de células nucleadas. El número promedio de células nucleadas totales entre el día 12 y el 18 para los conejos control es de $7.105 \times 10^3 / \text{mm}^3 \pm 0.250$, y $12.83 \times 10^3 / \text{mm}^3 \pm 1.39$ para el grupo experimental, con lo cual puede observarse que ambos grupos son diferentes devido a la transferrina inyectada, con una significancia de $0.01 < p < 0.001$. Por otra parte, al comparar a los conejos que reciben transferrina en este experimento con los del 2° experimento, se observa que entre los días 12 y 18 no existen diferencias significativas, y que ambos grupos presentan el máximo aumento en el número de células nucleadas en el día 14.

En lo que se refiere al número presente en la sangre de cada una de las poblaciones nucleadas a lo largo del experimento, sus variaciones se presentan en la tabla 10 para los conejos con

trol y en la tabla 11 para los experimentales.

Al igual que para los conejos sin hierro que reciben transferrina, puede dividirse las células nucleadas de este experimento en dos categorías en función de su respuesta a la inyección de la transferrina: las poblaciones que responden elevando su número en circulación para el día 12, y aquellas que presentan un retraso en su respuesta (día 13). Al primer grupo pertenecen los eosinófilos, segmentados, normoblastos y microlinfocitos, mientras que la segunda categoría agrupa a los basófilos, linfocitos y monocitos.

La cinética seguida por los eosinófilos se presenta en la figura 20. En el periodo que va del día 0 al 11 el grupo control y el experimental son iguales, y es al inyectar la transferrina que se hacen diferentes ($p < 0.001$). En el lapso del día 12 al 18 de sangrado los eosinófilos constituyen un porcentaje muy pequeño ($0.91 \pm 0.338\%$) del total del aumento en células nucleadas totales.

Las variaciones en el número de segmentados en los dos grupos de conejos a lo largo del experimento se presentan en la figura 21. Como se observa en la gráfica, ambos grupos son iguales en el periodo inicial, y la diferencia se manifiesta a partir del día 12 ($p < 0.001$). El incremento en el número de segmentados presenta su máximo al día 12 y disminuye paulatinamente a través de los días, constituyendo sin duda la población que más contribuye al aumento en el número total de células nucleadas en el lapso de los días 12 a 18 con un $52.73 \pm 6.48\%$.

Los normoblastos cuya cinética se muestra en la figura 22, al igual que las otras poblaciones se encuentra en números igua

les entre los días 0 y 11 en ambos grupos de conejos, y en números diferentes ($0.05 < p < 0.02$) una vez que se administra la transferrina al grupo experimental. Encontramos que esta población se incrementa en forma bifásica, al igual que en los conejos sin suplemento de hierro que recibieron transferrina. Forman dos picos, uno en el día 12 y el otro en el día 14. Este último es de mayor magnitud que el primero, y el porcentaje constituido por los normoblastos en estos días del total del aumento en células nucleadas es de 12.81% y 12.61% porcentajes notablemente mayores que los representados por esta población en el 2° experimento.

Los microlinfocitos se muestran en la figura 23 para los dos grupos de conejos. Puede observarse que se presentan en igual número entre el día 0 y el 11, y a partir de la inyección de transferrina en números diferentes ($0.01 < p < 0.001$). Al igual que los normoblastos presentan un incremento bifásico en los días 12 y 14, constituyendo el $17.82 \pm 2.11\%$ del total del aumento en células nucleadas circulantes entre los días 12 y 16 de sangrado. Si se compara este comportamiento con el seguido por esta población en el 2° experimento se detectan dos diferencias: la primera es que el aumento inicial de microlinfocitos es mayor en el 2° experimento, fenómeno que encontramos invertido en este tercer ensayo; y por otro lado, el porcentaje constituido por esta población es mayor en este último caso.

Las poblaciones que constituyen el segundo grupo, es decir, basófilos, linfocitos y monocitos se muestran en las figuras 24, 25 y 26 respectivamente. Estas células al igual que las otras células nucleadas, son iguales entre los días 0 y 11 de sangrado para ambos grupos de conejos. Después de la inyección de transferrina encontramos diferencias significativas ($0.05 < p < 0.02$)

entre ambos grupos en los tres tipos celulares. Las tres poblaciones presentan picos marcados que comprenden los días 13 a 15, disminuyendo posteriormente, y formando un pico de mucha menor magnitud en el día 17. Esta cinética es diferente a la presentada por estas poblaciones en el 2° experimento, así como los porcentajes que constituyen del aumento en células nucleadas totales. En este último ensayo, los basófilos constituyen el $2.83 \pm 0.480\%$, los linfocitos $24.64 \pm 4.23\%$, y los monocitos $3.27 \pm 0.58\%$.

En resumen, se observa que la inyección de transferrina a los conejos suplementados con hierro presenta ciertas similitudes cuando se le compara con los conejos que no reciben hierro. Por una parte la elevación en el número de células circulantes es igual en ambos experimentos. Con excepción de los basófilos, las células que constituyen los grupos de respuesta rápida o lenta son los mismos. El incremento en el número total de células está determinado por el aumento de segmentados, linfocitos, microlinfocitos, y a diferencia del segundo experimento, por los normoblastos.

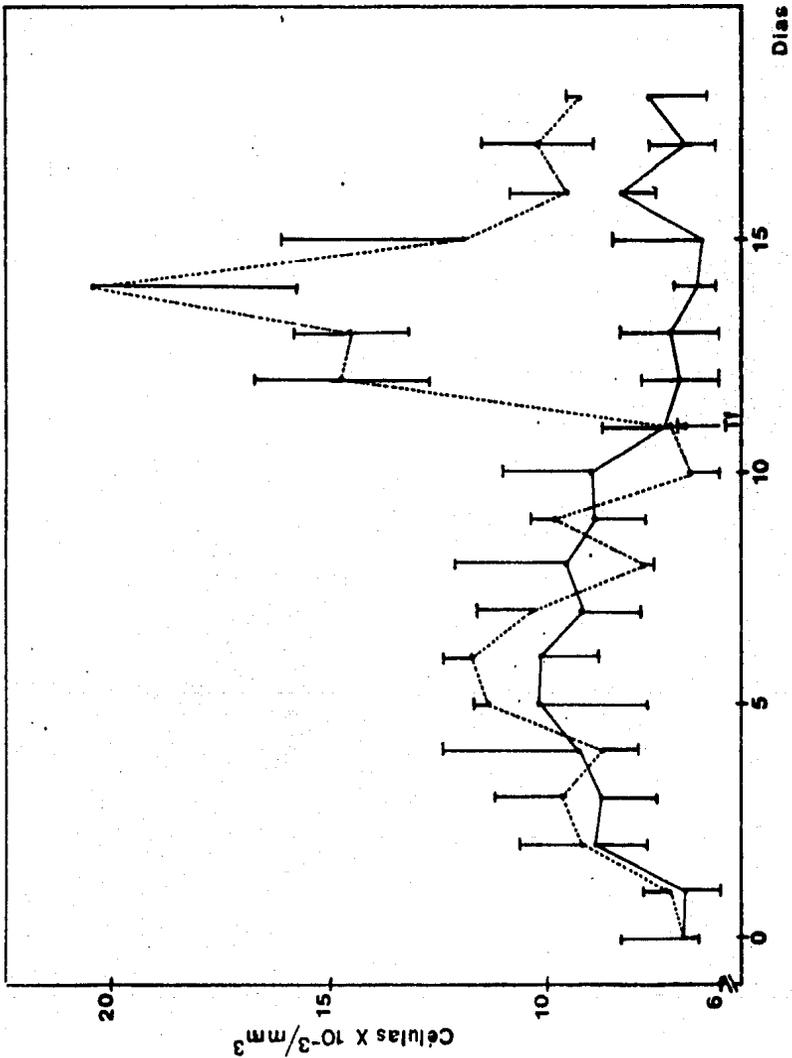
Tabla 9:

Variación en el número de células nucleadas circulantes a lo largo del periodo de sangrado en el grupo control ($n = 3$) y el grupo experimental ($n = 2$) al que se inyectó transferrina. Se presenta la media \pm E.S.

Día	Grupo Control (No. $\times 10^3/\text{mm}^3$)	Grupo Experimental (No. $\times 10^3/\text{mm}^3$)
0	6.86 \pm 1.30	6.80 \pm 0.380
1	6.81 \pm 1.35	7.12 \pm 0.500
2	8.91 \pm 1.35	9.26 \pm 1.31
3	8.75 \pm 1.56	9.64 \pm 1.46
4	9.28 \pm 2.98	8.69 \pm 0.912
5	10.23 \pm 2.81	11.37 \pm 0.100
6	10.19 \pm 1.32	11.73 \pm 0.380
7	9.14 \pm 1.49	10.34 \pm 1.19
8	9.52 \pm 2.51	7.78 \pm 0.293
9	8.90 \pm 2.37	9.85 \pm 0.604
10	8.97 \pm 2.04	6.70 \pm 0.877
11	7.26 \pm 1.54	7.10 \pm 0.199
12	6.93 \pm 0.956	14.77 \pm 1.70
13	7.11 \pm 1.66	14.59 \pm 1.09
14	6.53 \pm 0.525	19.41 \pm 3.91
15	6.40 \pm 2.04	11.94 \pm 4.00
16	8.31 \pm 1.20	9.57 \pm 1.27
17	6.84 \pm 0.991	10.22 \pm 1.27
18	7.61 \pm 1.50	9.29 \pm 0.080

Figura 19:

Número de células nucleadas circulantes en conejos anémicos suplementados con hierro en el grupo control (—) n =3 comparados con el grupo experimental (---), que recibe transferrina. Se presenta la media \pm E.S.



Día	Basófilos	Eosinófilos	Mielocitos	Juveniles	Bandas	Segmentados	Linfocitos	Monocitos	Normoblastos	Microlinfocitos	Plastos
0	0.296±0.100	0.082±0.007			0.027±0.002	2.14±0.230	4.13±0.200	0.145±0.004	0.004±0.000	0.032±0.011	
1	0.197±0.022	0.098±0.004		0.008±0.000	0.024±0.000	1.88±0.057	4.04±0.120	0.180±0.004	0.201±0.081	0.179±0.095	
2	0.347±0.124	0.090±0.024			0.057±0.013	2.79±0.040	4.56±0.120	0.250±0.040	0.503±0.162	0.250±0.064	
3	0.275±0.114	0.127±0.010		0.005±0.000	0.052±0.000	2.78±0.260	4.46±0.310	0.250±0.030	0.407±0.147	0.387±0.014	
4	0.340±0.033	0.158±0.000			0.027±0.000	2.84±0.117	4.54±0.280	0.286±0.030	0.712±0.263	0.373±0.094	
5	0.323±0.030	0.118±0.020	0.010±0.000	0.006±0.000	0.037±0.000	2.75±0.557	4.68±0.150	0.247±0.010	1.38±0.410	0.675±0.026	
6	0.293±0.067	0.157±0.021		0.010±0.000	0.043±0.000	2.62±0.440	4.73±0.030	0.203±0.000	0.911±0.260	1.22±0.129	
7	0.253±0.050	0.060±0.007		0.011±0.010	0.019±0.000	2.19±0.111	4.33±0.410	0.208±0.020	1.36±0.400	0.666±0.088	0.005±0.005
8	0.334±0.060	0.115±0.010	0.011±0.010	0.016±0.010	0.032±0.010	2.32±0.131	4.87±0.310	0.206±0.030	0.753±0.270	0.844±0.131	0.006±0.005
9	0.274±0.090	0.084±0.000	0.077±0.070	0.057±0.050	0.039±0.014	1.98±0.090	4.24±0.140	0.263±0.080	1.12±0.220	0.702±0.188	0.068±0.060
10	0.226±0.090	0.092±0.010	0.010±0.010	0.026±0.020	0.037±0.000	2.08±0.160	4.15±0.330	0.350±0.060	0.831±0.310	1.13±0.198	0.010±0.010
11	0.340±0.160	0.040±0.000	0.002±0.000	0.009±0.000	0.058±0.020	1.83±0.080	3.95±0.260	0.157±0.010	0.437±0.140	0.571±0.078	
12	0.171±0.000	0.050±0.000		0.009±0.000	0.042±0.010	2.14±0.150	3.66±0.260	0.189±0.000	0.305±0.200	0.227±0.047	0.002±0.002
13	0.153±0.030	0.048±0.000		0.004±0.000	0.048±0.010	1.96±0.090	3.84±0.240	0.151±0.020	0.161±0.100	0.159±0.039	
14	0.211±0.060	0.061±0.010		0.007±0.000	0.039±0.000	1.98±0.067	3.46±0.080	0.142±0.020	0.090±0.040	0.396±0.033	0.002±0.002
15	0.259±0.070	0.074±0.000		0.007±0.000	0.047±0.010	2.65±0.480	4.23±0.660	0.173±0.040	0.146±0.050	0.461±0.141	
16	0.150±0.080	0.056±0.010	0.004±0.000	0.008±0.000	0.070±0.010	2.29±0.360	3.63±0.460	0.185±0.000	0.148±0.080	0.287±0.070	
18	0.205±0.040	0.078±0.000	0.005±0.000	0.019±0.000	0.056±0.010	2.45±0.410	4.19±0.510	0.206±0.000	0.082±0.030	0.237±0.041	

Tabla 10:

Efecto de la remoción de un volumen constante de sangre en conejos suplementados con hierro sobre el número de las diferentes poblaciones de células nucleadas. Se presenta el grupo control n = 3 (No. X 10³/mm³ ± E.S.).

Día	Basófilos	Eosinófilos	Mielocitos	Juveniles	Bandas	Segmentados	Linfocitos	Monocitos	Formoblastos	Microlinfocitos	Plastos
0	0.293±0.122	0.081±0.009			0.027±0.025	2.12±0.279	4.09±0.243	0.144±0.005	0.003±0.005	0.031±0.014	
1	0.207±0.028	0.103±0.003		0.009±0.005	0.026±0.008	1.96±0.073	4.23±0.160	0.188±0.008	0.210±0.103	0.187±0.122	
2	0.361±0.158	0.149±0.030			0.059±0.016	2.90±0.058	4.74±0.158	0.266±0.058	0.523±0.206	0.260±0.082	
3	0.303±0.153	0.140±0.022		0.005±0.007	0.057±0.027	3.07±0.353	4.92±0.423	0.276±0.047	0.448±0.199	0.426±0.020	
4	0.327±0.042	0.148±0.007			0.025±0.005	2.66±0.134	4.25±0.327	0.267±0.040	0.666±0.307	0.349±0.108	
5	0.359±0.135	0.131±0.034	0.011±0.007	0.007±0.008	0.041±0.013	3.06±0.757	5.20±0.211	0.275±0.026	1.54±0.571	0.751±0.036	
6	0.337±0.095	0.181±0.030		0.012±0.007	0.050±0.008	3.02±0.623	5.44±0.050	0.234±0.007	1.05±0.369	1.41±0.182	
7	0.291±0.078	0.090±0.009		0.012±0.015	0.022±0.008	2.48±0.154	4.90±0.568	0.236±0.034	1.54±0.556	0.754±0.122	0.006±0.007
8	0.273±0.063	0.091±0.013	0.009±0.011	0.013±0.010	0.026±0.010	1.90±0.132	3.98±0.313	0.169±0.037	0.615±0.272	0.691±0.132	0.005±0.006
9	0.303±0.136	0.093±0.005	0.085±0.104	0.064±0.078	0.043±0.019	2.19±0.122	4.69±0.122	0.291±0.111	1.23±0.309	0.777±0.254	0.075±0.084
10	0.163±0.090	0.069±0.011	0.008±0.009	0.019±0.023	0.028±0.006	1.55±0.150	3.11±0.306	0.262±0.067	0.627±0.289	0.848±0.131	0.008±0.009
11	0.215±0.107	0.062±0.010		0.004±0.005	0.024±0.008	1.79±0.106	3.86±0.316	0.154±0.012	0.427±0.175	0.558±0.094	
12	0.130±0.035	0.095±0.013	0.005±0.005	0.005±0.005	0.165±0.061	5.35±0.546	4.05±1.32	0.199±0.059	1.41±0.487	2.49±0.312	
13	0.280±0.044	0.091±0.030	0.026±0.026		0.218±0.037	5.34±0.802	5.42±0.767	0.334±0.083	0.581±0.164	1.58±0.370	0.013±0.014
14	0.503±0.213	0.106±0.042		0.049±0.049	0.145±0.067	4.78±0.799	8.52±0.306	0.560±0.211	1.98±1.350	2.88±1.240	0.024±0.025
15	0.394±0.210	0.095±0.042		0.017±0.011	0.092±0.048	4.49±1.940	4.79±1.520	0.289±0.061	0.277±0.088	1.41±0.048	0.014±0.014
16	0.311±0.074	0.067±0.005	0.004±0.004	0.015±0.006	0.060±0.011	3.58±1.390	4.22±0.083	0.193±0.052	0.200±0.015	0.899±0.020	0.013±0.013
17	0.340±0.090	0.094±0.004	0.004±0.004	0.017±0.008	0.092±0.035	3.30±0.820	4.82±0.094	0.332±0.037	0.543±0.264	0.512±0.078	0.019±0.020
18	0.246±0.040	0.131±0.040		0.015±0.005	0.147±0.056	3.42±0.377	3.84±0.614	0.238±0.043	0.351±0.062	0.833±0.049	

Tabla 11:

Variación en las diferentes poblaciones de células sanguíneas nucleadas de conejos hechos anémicos suplementados con hierro a los que se administra transferrina en el día 11. Se presenta el grupo experimental n = 2 (Promedio de células X 10³/mm³ ± E.S.).

Figura 20:

Número de eosinófilos en conejos hechos anémicos en el grupo control (—) $n = 3$ y en el grupo que recibió la transferrina (---) $n = 2$. Se presenta la media \pm E.S.

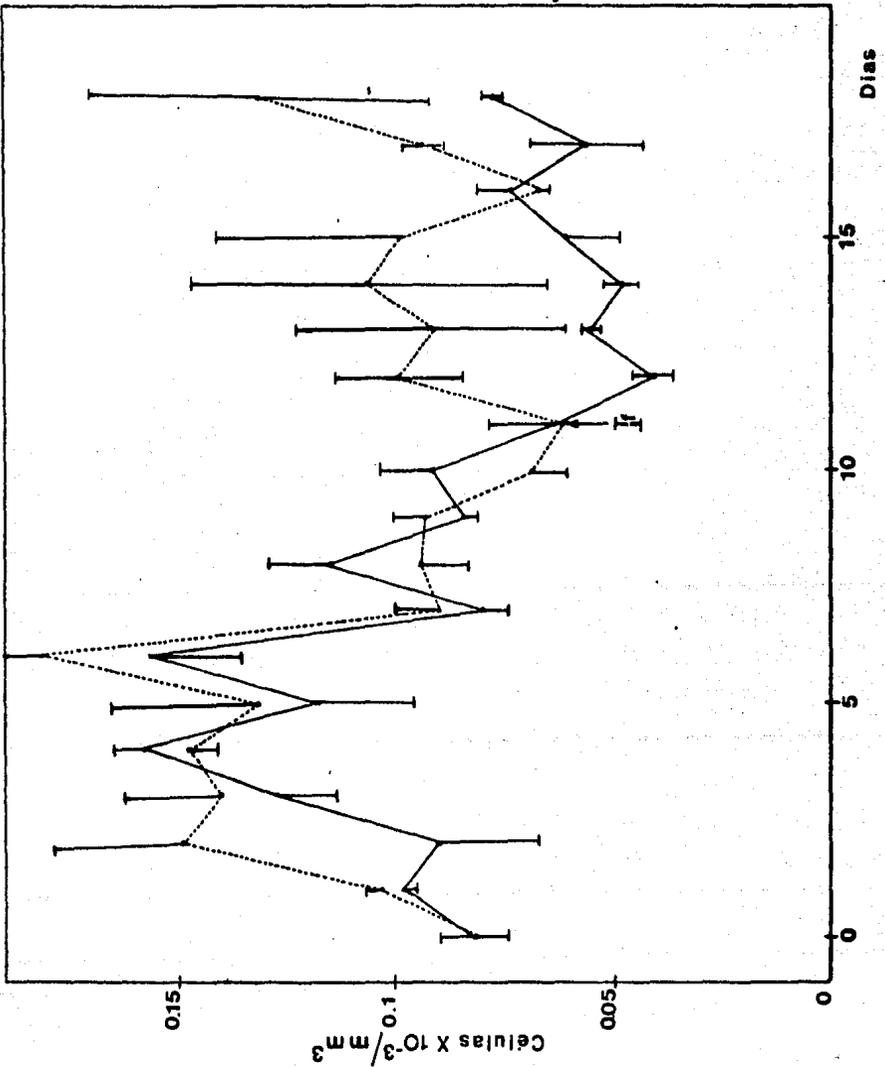


Figura 21:

Variación en el número de segmentados en conejos hechos anémicos en respuesta a la inyección de transferrina (---) $n=2$ y el grupo control (—) $n=3$. Se presenta la media \pm E.S.

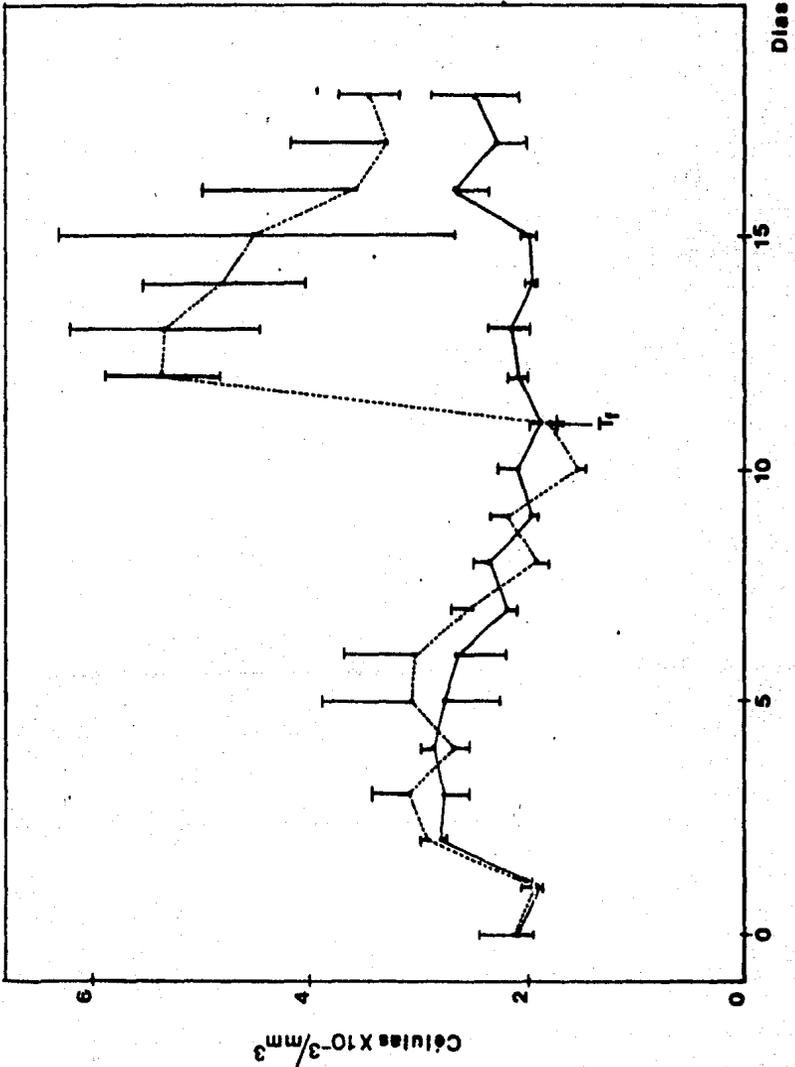


Figura 22:

Variaciones en el número de normoblastos a lo largo del periodo de sangrado en conejos hechos anémicos. Conejos control (—) n =3 y conejos que recibieron transferrina (---) n =2. Se presenta la media \pm E.S.

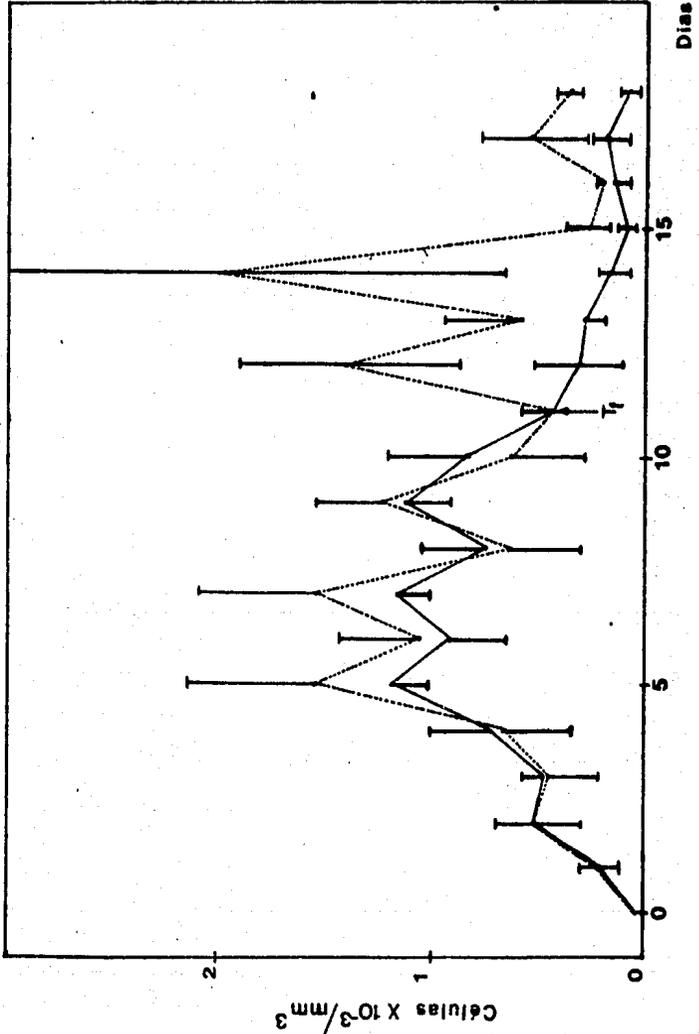


Figura 23:

Variación en el número de microlinfocitos en conejos hechos anémicos a los que se inyecta transferrina (---) $n=2$ o solución salina (—) $n=3$. Se presenta la media \pm E.S.

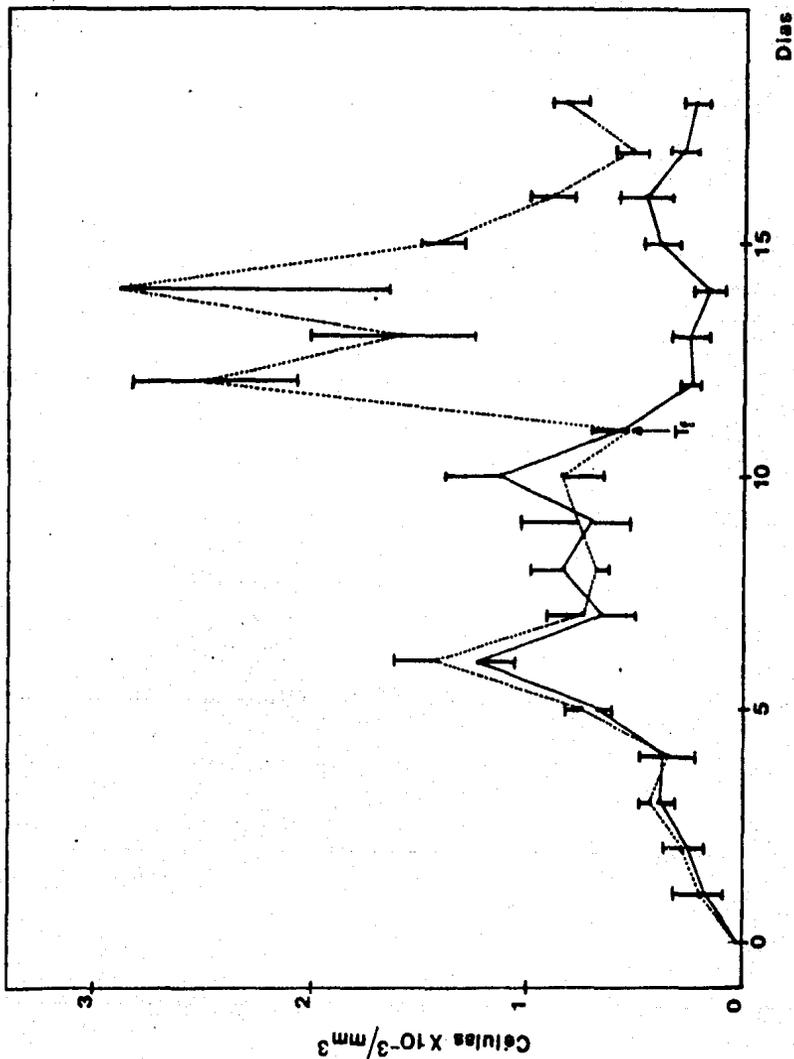


Figura 24:

Efecto de la inyección de transferrina a conejos hechos anémicos (---) $n = 2$ comparados con conejos anémicos del grupo control (—) $n = 3$, en el número de basófilos. Se presenta la media \pm E.S.

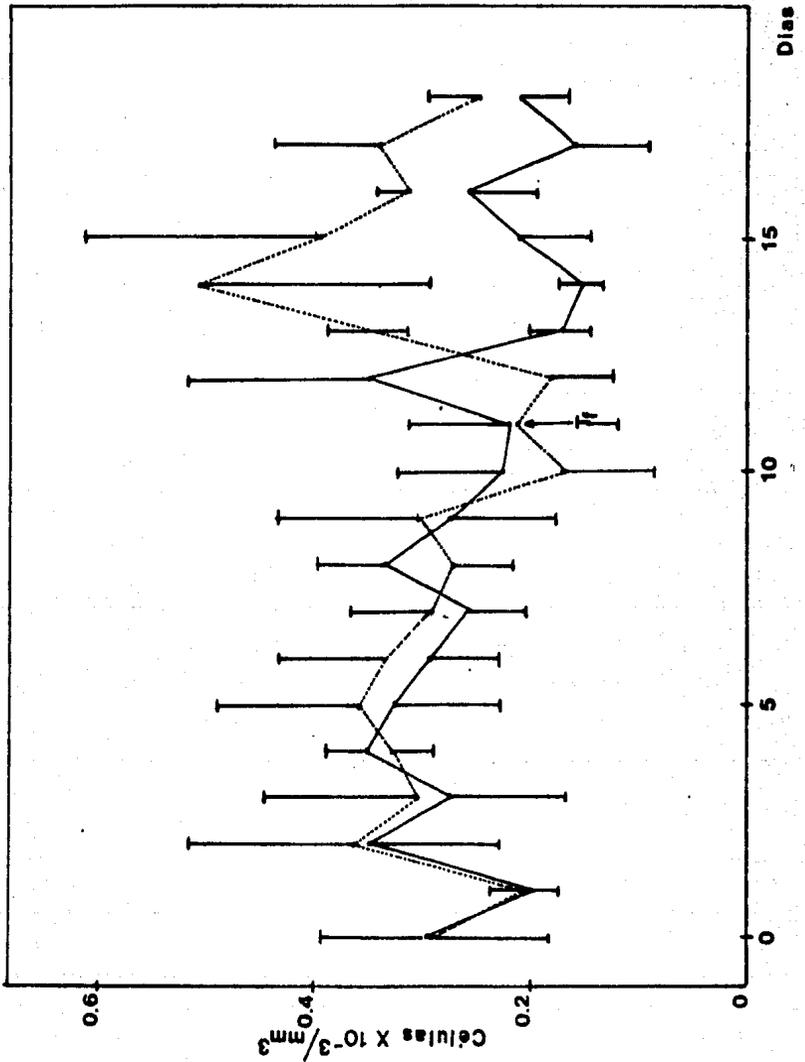


Figura 25:

Efecto de la inyección de transferrina al grupo experimental de conejos anémicos (---) $n = 2$ comparados con el grupo control (—) $n = 3$ en el número de linfocitos. Se presenta la media \pm E.S.

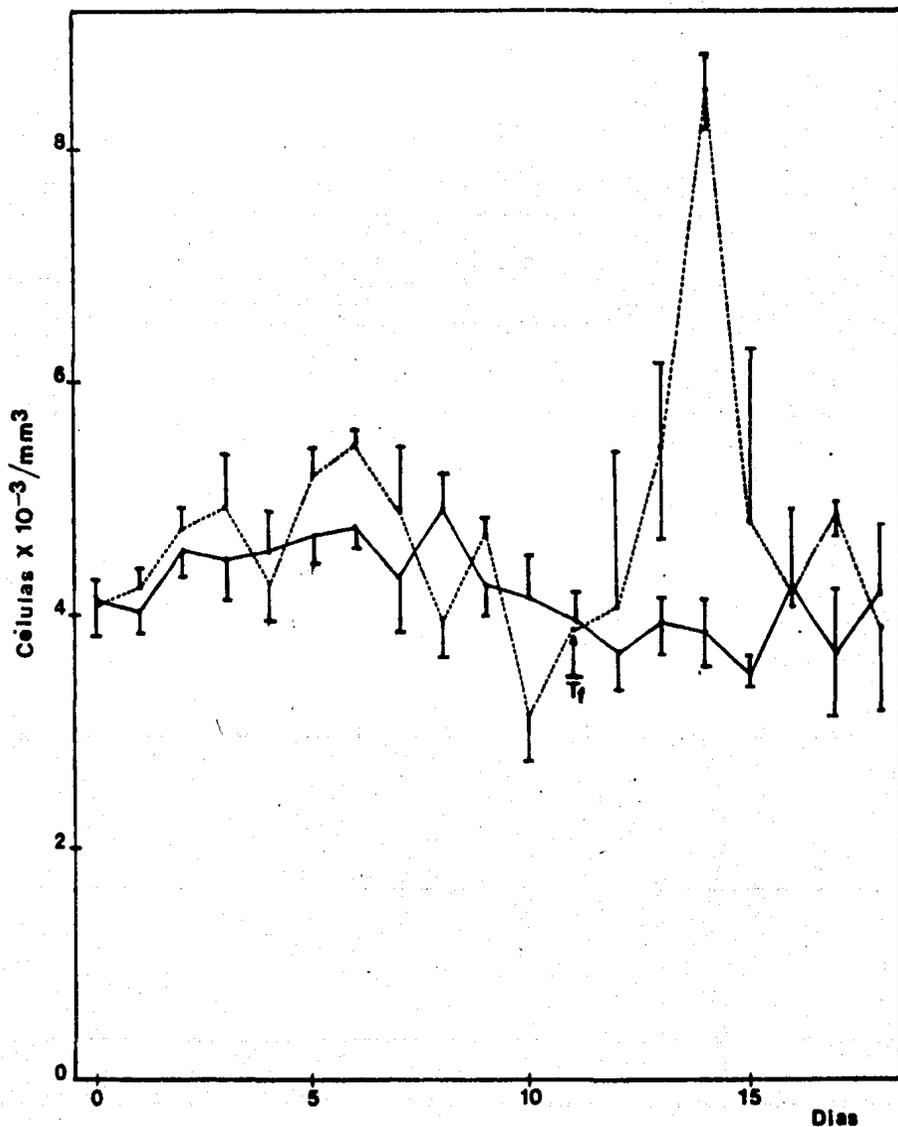
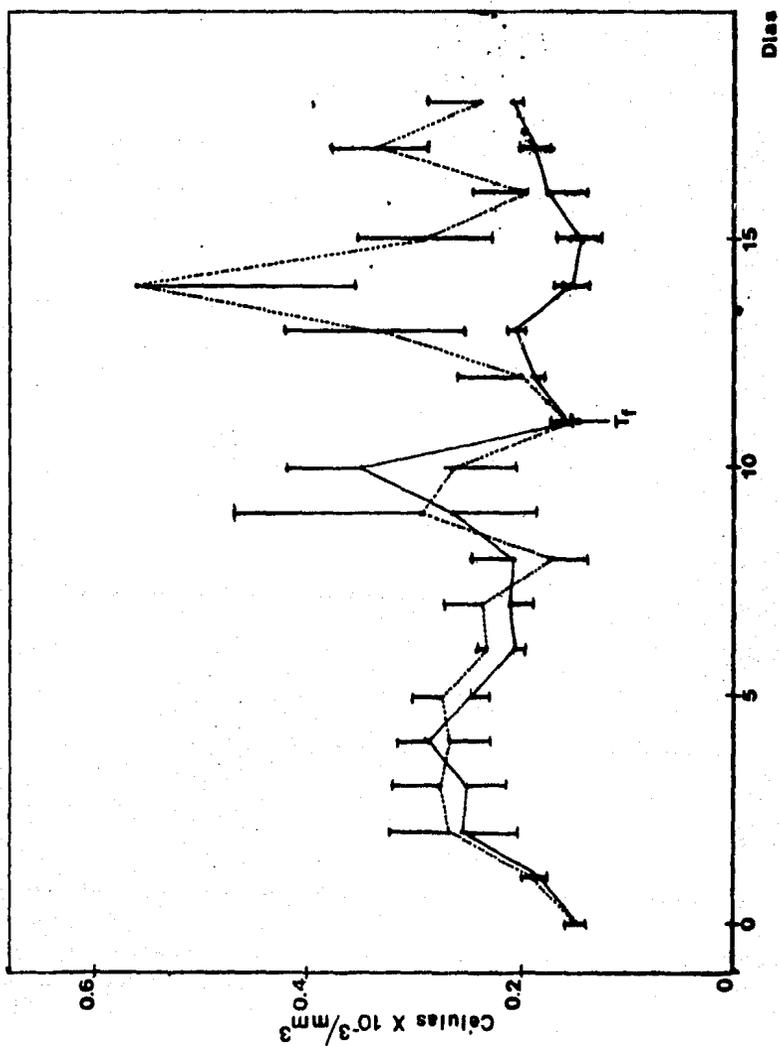


Figura 26:

Variación en el número de monocitos en conejos anémicos que reciben hierro. Se presenta la media \pm E.S. del grupo control (—) n = 3 y del grupo que recibió transferrina (---) n = 2.



4° Experimento:

Aislamiento y Purificación de los Microlinfocitos

Como se había mencionado, una de las características sobresalientes en la inducción de la anemia en conejos, es la aparición de los microlinfocitos. Por ello, se decidió establecer la metodología necesaria para lograr su aislamiento. Esta última fase del trabajo experimental constituye el inicio de nuevos estudios cuyo objetivo es determinar las capacidades y/o funciones de estas células.

Se utilizó primero la separación en Ficoll-Paque, método comúnmente empleado para aislar linfocitos de la sangre. Ya que esta población microlinfocítica aumenta notablemente en los días 5 a 10 de sangrado, se utilizó la sangre de conejos anémicos en este período. En estas condiciones la interfase no queda completamente separada de los eritrocitos, sino que se presenta un continuo de células rojas inmaduras, que por la anemia han aumentado su número en la sangre. Esto incrementa asimismo, la contaminación con eritrocitos en la interfase (78). Este fenómeno queda ilustrado en la figura 27. Debido a que el número de microlinfocitos por mililitro de sangre es muy pequeño, se partió de 32ml de sangre total para su separación en Ficoll-Paque colectándose las células obtenidas de las interfases en 4 tubos. Estos se utilizaron a su vez para la separación de los linfocitos y microlinfocitos en 4 tubos de gradiente lineal preformado de Percoll con una densidad inicial de 1.0765 gr/cm^3 . Al realizar la separación de las dos poblaciones en este tipo de gradiente se obtiene una banda de células con una densidad cercana a 1.062 gr/cm^3 lo que puede determinarse con el uso de perlas marcadoras de den

sidad en otro tubo de gradiente que es sometido a las mismas condiciones que aquellos que contienen las células que se desea separar; ésto se ilustra en la figura 28.

La banda colectada está formada en su mayor parte (95%) por microlinfocitos existiendo algunos linfocitos pequeños y gran cantidad de plaquetas que no pudieron ser eliminadas en el proceso de separación. En la figura 29 se muestran los microlinfocitos teñidos con colorante de Wright utilizando un objetivo seco de 40 X, y en la figura 30 con un objetivo de inmersión 100 X. Como puede observarse en microscopía de luz, el núcleo que tiene un gran tamaño ocupando prácticamente toda la célula, tiene una densidad tal que no permite detectar las características estructurales de la célula, y por ello surge la necesidad del estudio de los microlinfocitos con el microscopio electrónico.

Figura 27:

Gradiente de Ficoll-Paque. Se observa la interfase (I), los eritrocitos sedimentados (E) y células rojas inmaduras entre ambas bandas.

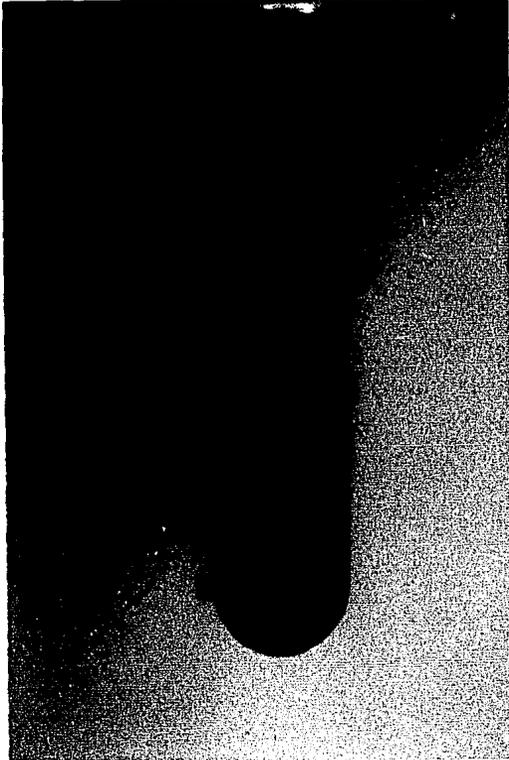


Figura 28:

Microlinfocitos (ML) separados en un gradiente preformado de Percoll. El otro tubo contiene perlas marcadas de densidad y se señala la banda correspondiente a 1.062 gr/cm^3 .

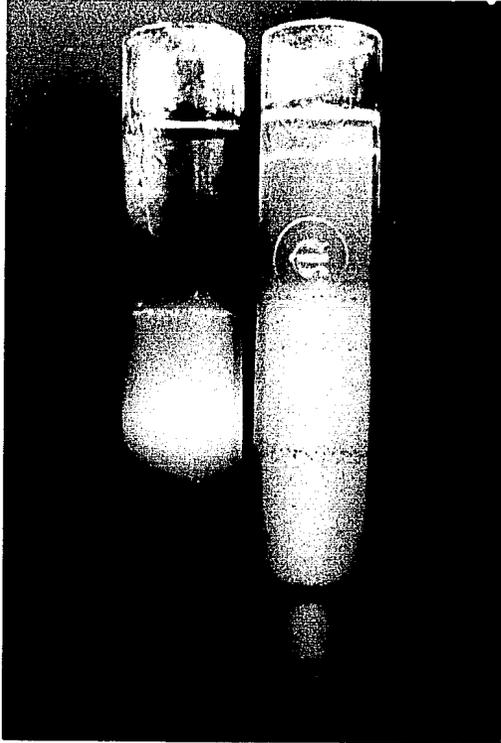


Figura 29:

Preparación teñida con el colorante de Wright de las células separadas en los dos tipos de gradiente. Se observan Microlinfocitos (ML) y un linfocito pequeño de la sangre (L).

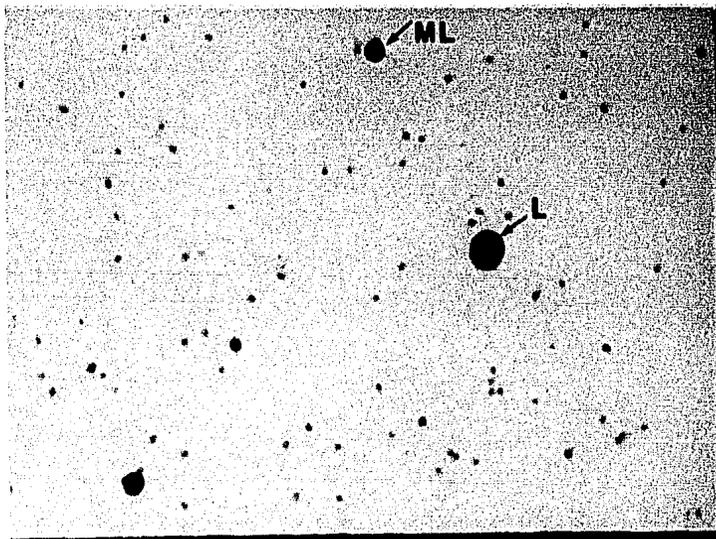
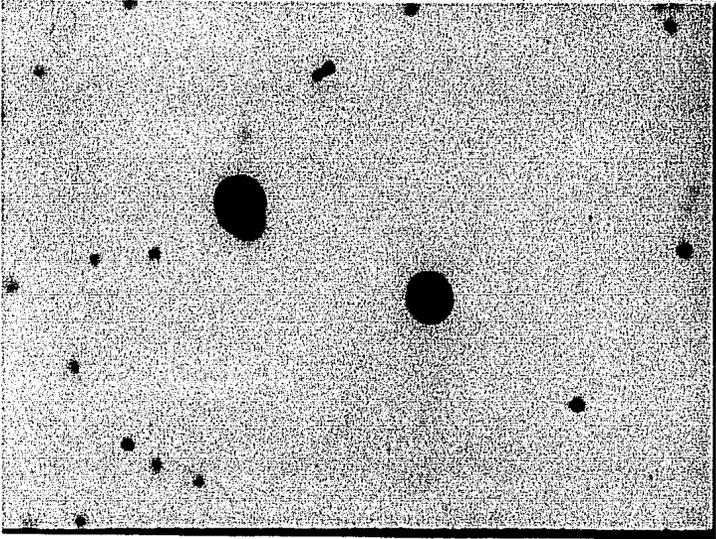


Figura 30:

Microlinfocitos vistos con un objetivo de inmersión de 100 X. Se observan las dos formas más comunes de estas células en conejos anémicos.



D I S C U S I O N

Antes de hablar de los resultados propiamente dichos es interesante mencionar algo acerca de la hematología del conejo, animal utilizado en el modelo experimental en el que se basa el desarrollo de este trabajo. La información concerniente a la hematología del conejo, es en la actualidad aun muy fragmentaria y con amplias discrepancias. Más aun, se conoce muy poco acerca de los factores fisiológicos, agentes fisicoquímicos y condiciones patológicas que se sabe provocan alteraciones hematológicas en el hombre y en otros animales experimentales. Las principales contribuciones acerca del tejido sanguíneo del conejo se sitúan entre 1930 y 1960, y es esta información la que sirve como punto de comparación en la determinación de los parámetros sanguíneos de los conejos normales. Así, tenemos el estudio del conteo diferencial bajo diferentes condiciones normales, como en el embarazo, o patológicas, principalmente en la infección por diversos agentes (53); las diferencias en la constitución hematológica en diferentes variedades de conejos (54); la comparación entre hembras y machos en sus parámetros hematológicos (55); el estudio de los ciclos diurnos de los leucocitos sanguíneos en conejos normales (56); y las variaciones individuales y estacionales de los valores hematológicos en conejos macho normales (57).

Ahora bien, tomando al conejo como animal experimental, al inducir la anemia por remoción de un volumen constante de sangre se provocan cambios que modifican de manera drástica su homeostasis hematológica. La producción de eritrocitos a partir de células madre no diferenciadas es un fenómeno finamente regulado, de

tal manera que el número de eritrocitos se mantiene relativamente constante en el organismo. En estas condiciones, debe remplazarse un cierto número de hematíes que son eliminados de la circulación por el sistema reticuloendotelial y, al sangrar diariamente a los conejos el número de células que el organismo debe reponer aumenta considerablemente. En respuesta a esta perturbación, las células madre migran hacia los sitios de hematopoyesis (58), iniciándose un nuevo periodo de autoreplicación seguido de actividad diferenciativa. Una vez que se alcanza la igualdad entre el número de células que se replica y aquellas que se diferencian, se logra nuevamente un compartimiento de tamaño estable lo cual implica un nuevo equilibrio (16). Sin embargo, las células precursoras originan no solamente a los eritrocitos, sino a todas las otras células de la sangre. Existen estudios acerca de la cinética de CFU cuando la hematopoyesis se inclina en favor de la eritropoyesis (59,60,61) como en nuestro caso. Estos trabajos demuestran que en los ratones existe un mecanismo para la redistribución de las células madre hacia el bazo, incrementándose en este órgano la velocidad de proliferación de CFU-G.M. Así, tomando en cuenta los datos aportados por la bibliografía, y considerando que existen además sitios de reserva de leucocitos maduros como la médula ósea, lechos capilares, bazo, nódulos linfáticos y timo que liberan pequeños números de células a la circulación, se explica la cinética seguida por las células sanguíneas nucleadas circulantes en condiciones de eritropoyesis incrementada. Por una parte existe el estímulo a proliferar y diferenciarse de CFU, y por otra parte la salida de las reservas, con lo cual se obtiene un aumento máximo entre los días 5 y 8 de sangrado, regresando posteriormente al equilibrio estable

cido al igualarse autorenovación y diferenciación de las células madre.

Las poblaciones que más se modifican en la inducción de la anemia son cuatro, de las cuales los segmentados y los linfocitos, normalmente las más abundantes en la circulación, son las que presentan mayores cambios en su número. Sin embargo, las otras dos poblaciones, normoblastos y microlinfocitos, son las que modifican en mayor proporción el número de células nucleadas circulantes. Las dos primeras representan el resultado del mecanismo general de proliferación y diferenciación de las células madre, pero la presencia de las otras dos poblaciones, normalmente ausentes de la circulación, se apartan de los datos reportados en la literatura.

El trabajo de Sabin (62) postula que existen tres mecanismos disponibles en el organismo adulto para incrementar el espacio destinado a la formación de células sanguíneas. El primero es la remoción de grasa de la médula ósea en forma de gotas que salen al torrente sanguíneo. El segundo método es un adelgazamiento del hueso lo cual agranda la cavidad, y el tercer método de incrementar el espacio hematopoyético es el uso de zonas extramedulares. En el desarrollo del trabajo se observó que al inducir la anemia, el plasma de los conejos presentaba un aspecto turbio al centrifugar la sangre. Este cambio se debe a un aumento en la cantidad de lípidos en la sangre, y por tanto, el primer mecanismo parecería jugar un papel importante en nuestro modelo. Por otra parte, la aparición e incremento tan marcado de normoblastos y microlinfocitos en la circulación apoyan la participación del uso de zonas extramedulares en una hematopoyesis incrementada.

La presencia de normoblastos en la circulación plantea una serie de interrogantes. Por una parte, como precursores eritrocíticos inmaduros bien podrían ir de la médula ósea hacia los sitios de eritropoyesis extramedular, o bien de estos sitios hacia la médula ósea en donde completarían su desarrollo. Por otro lado, utilizando los datos del número de eritrocitos en la fase de equilibrio (figura 3), puede calcularse de manera aproximada el número de células que se producen. En estos días, la cantidad de células removidas iguala a la producida y este valor es cercano a 2.5×10^6 células/mm³. El número máximo de normoblastos representa únicamente 0.1% de la cantidad de eritrocitos que deben producirse. Aun cuando estas células sufren varias divisiones mitóticas antes de convertirse en hematíes, la cifra sigue representando una fracción pequeña del total. Consecuentemente, la existencia de estas células en la circulación parece no tener explicación alguna en esta etapa. Desconocemos si en la circulación se transforman en células maduras, o si se establecen en otros órganos para colonizarlos, proliferar y diferenciarse posteriormente. Por tanto, puede plantearse una nueva serie de experimentos que nos ayuden a aclarar este problema.

Los microlinfocitos representan una verdadera incógnita. Debido a la cinética de esta población y a sus características morfológicas podría pensarse que se trata de células precursoras hematopoyéticas. Existen diversas evidencias en las cuales se ha demostrado que en los organismos adultos existen células madre hematopoyéticas en bajos números en la sangre que se encuentran en tránsito hacia la médula ósea. Que estas células originan tanto al tejido mieloide como al linfoide. Aquellas que originan directamente a los linfocitos B, se han identificado morfológica

mente como linfocitos pequeños (63). En cultivo, estas células precursoras son difíciles de identificar, pero son capaces de transformarse y generar otras células linfoides (64). Y, en otro estudio se presentan inclusive, datos acerca de la ultraestructura de las presuntas células madre hematopoyéticas de ratón (65,66), identificándolas como células morfológicamente similares al linfocito pequeño pero de menor tamaño. Estas evidencias nos indican la dificultad en la identificación de las células madre, y aún cuando se trata de ratones y no de conejos, la similitud en la morfología de las células madre aisladas y los microlinfocitos no deja de ser aparente. Por ello se decidió establecer la metodología necesaria para el aislamiento de los microlinfocitos. Este paso nos permitirá establecer un enlace entre el estudio morfológico y cinético de las células nucleadas circulantes y el estudio bioquímico más detallado de los microlinfocitos. De aquí se deriva una serie de posibles estudios con esta población aislada como son: su estructuración a nivel de microscopía electrónica, la determinación de marcadores de superficie, la existencia de receptores para transferrina, su capacidad de incorporación de hierro, sus potencialidades en cultivo de tejidos, etc. Es decir, la posibilidad de conocer las capacidades y funciones de los microlinfocitos. Por otra parte, el incremento de microlinfocitos en condiciones de anemia inducida presenta características cíclicas muy marcadas. Si consideramos a esta población como células madre el patrón cíclico representaría ondas alternadas de proliferación y migración, y diferenciación en los distintos centros hematopoyéticos y/o médula ósea. Su tamaño tan pequeño no debería desconcertar ya que "...el linfocito pequeño es una forma especializada de la célula

la parenquimatosa primitiva en un estado de reposo, relativamente inactiva, y reducida al menor tamaño posible con el propósito de su fácil movilización y transporte a través del torrente sanguíneo". (Yoffey y Courtice) (64).

Ahora bien, hay que recordar que en los experimentos en los que los conejos reciben diariamente hierro por vía intraperitoneal, existen diferencias cuando los comparamos con aquellos que no son suplementados con hierro. Esta observación permite inferir algún efecto de este metal sobre las células nucleadas circulantes. El requerimiento de hierro se deriva del papel central que juega en el metabolismo energético de las células. Anteriormente se pensaba que la cantidad de hierro en el organismo estaba controlada únicamente por la regulación de su absorción, y que la excreción del metal jugaba un papel pasivo. Sin embargo, la mayoría de las células contienen hierro en cantidades relativas proporcionales a la cantidad de hierro en los almacenes corporales, y así la pérdida obligatoria de células ocasiona la salida selectiva pero limitada de hierro. En condiciones normales la pérdida se balancea con la absorción de hierro para mantener una cantidad relativamente constante de hierro a lo largo de la vida del organismo y, el fenómeno de absorción usualmente tiene un papel regulador más activo (67). La recirculación del hierro de eritrocitos senescentes por las células reticuloendoteliales es un eslabón esencial en el intercambio del hierro. Parte de este hierro regresa rápidamente al plasma, y otra parte se recambia con los almacenes de las células reticuloendoteliales y se reutiliza más lentamente. Si el requerimiento de hierro para la eritropoyesis se incrementa, ya sea que la causa sea el sangrado, hemólisis o hipoxia, se aumenta la cantidad de este elemento que

se provee a través de la movilización de los almacenes de hierro y a través de un incremento en la absorción de hierro (68).

Ya que durante la inducción de la anemia se impide la reutilización del hierro y se incrementa la eritropoyesis, se decidió suplementar a los conejos con hierro. Los resultados muestran en forma muy clara que el suministro exógeno de hierro no influyó ni en el número de eritrocitos ni en la cantidad de hemoglobina, parámetros que esperaríamos encontrar disminuidos en los conejos que no reciben hierro si este metal estuviera limitando la eritropoyesis. Sin embargo, la administración de hierro sí influyó en la cinética y número de las células nucleadas en respuesta a la inducción de la anemia. Inicialmente se pensó que estos datos podrían explicarse si la administración de hierro provoca una reacción inflamatoria en el peritoneo. Esta ocasionaría la modificación de algunas poblaciones celulares al migrar hacia el sitio de reacción, y la caída en el contenido de hierro sérico y en el porcentaje de saturación de la transferrina (69). Los resultados muestran en forma concluyente que no sólo no existe granulopenia y monocitopenia, sino que los segmentados incrementan significativamente su número, y que el contenido de hierro sérico y la saturación de la transferrina se incrementan. Por otra parte, la población responsable en mayor proporción de la diferencia en número de células nucleadas en conejos con y sin suplemento de hierro, es la de normoblastos y su elevación coincide con el incremento de hierro sérico entre los días 1 y 6, hierro en exceso de la cantidad necesaria para saturar la transferrina circulante. Así, el hierro unido posiblemente a una proteína diferente y no a su acarreador fisiológico, se encuentra involucrado en la modulación de la circulación de los linfocitos, la

producción de segmentados, y a una mayor liberación de las formas eritrocíticas inmaduras o normoblastos.

Finalmente un efecto más del suministro de hierro sobre las células nucleadas, y principalmente sobre los segmentados, es la atenuación de las variaciones cíclicas en ellas. Este fenómeno de ciclicidad postulado para las células sanguíneas en general, puede resultar poco aparente en las figuras debido nuevamente a la variación individual en el número de células y al desfaseamiento de las oscilaciones entre los diferentes individuos de la población. El concepto de oscilación cíclica establece que al disminuir el número de células en la sangre, primero se incrementa su liberación y como resultado aumentan los factores humorales que regulan los diferentes compartimientos hematopoyéticos, incrementando la proliferación y diferenciación de las células precursoras (70,71,72,73). Sin embargo, se trata de un fenómeno que no se observa frecuentemente en individuos normales por el efecto atenuador de la reserva de células en médula ósea, pero sí una vez que la reserva ha disminuído como sucede durante la inducción de la anemia.

En otros experimentos en los que se sangraron diferentes volúmenes sanguíneos (3,6,9 y 12 ml/kg de peso) se encontró que no existían diferencias en la producción de eritrocitos una vez que se alcanzaba un límite en la eritropoyesis, límite que se alcanzó al remover 9 ml/kg de peso. Es decir, aún cuando aumentáramos el volumen de sangre extraído no habría una mayor producción de células (84). Se pensó en dos factores limitantes: el suministro de hierro, y la cantidad de transferrina circulante. Ya que el hierro no tuvo un efecto limitante en la eritropoyesis, se pensó que la transferrina pudiera ser el factor limitante. Al in

yectar transferrina se crearían nuevos sitios de transporte de hierro y aumentaría la eritropoyesis. El incremento de hierro sérico que se observa en los conejos aunado al incremento en la concentración de transferrina, traería como resultado la elevación del recambio de hierro con los tejidos así como el aumento en la biosíntesis de transferrina (74,75,76), posiblemente incrementando aún más la eritropoyesis y en consecuencia la producción de células nucleadas de la sangre.

Así, en el 2° y 3er experimentos se decidió investigar el papel que tiene esta proteína en condiciones de eritropoyesis incrementada. Después de inyectar transferrina efectivamente se encontró incrementada su concentración en la circulación. Sin embargo, la eritropoyesis no sólo no se incrementó sino que se provocó una disminución de los eritrocitos circulantes de manera drástica, y hasta cuatro días después se restableció el número que se encuentra en el equilibrio.

Hay que señalar que la transferrina provocó cambios muy pronunciados en la cinética de las células nucleadas totales independientemente de si los conejos estaban o no suplementados con hierro. El primer efecto observado por la inyección de la transferrina fue el descenso en el número de células en la circulación una hora después de administrada, ya que los conejos control muestran que el comportamiento "normal" consiste en la reposición rápida de las células en la circulación con pocas modificaciones en lo que se refiere a la composición diferencial. Es difícil distinguir si el efecto de la transferrina fue el de impedir selectivamente la salida de las células de los centros hematopoyéticos, o el de secuestrar selectivamente también a las células en algún otro órgano. No por ello el efecto deja de ser inespera-

do este efecto.

Se presentan además algunas diferencias en la cinética seguida por las diferentes poblaciones así como en el porcentaje que representan en el aumento en el número de células nucleadas totales después de la transferrina, dependiendo de si los conejos reciben o no diariamente hierro. Finalmente, existen diferencias en lo concerniente a las dos poblaciones extraordinarias de la circulación, los normoblastos y los microlinfocitos que no pueden explicarse. Estas dos poblaciones muestran una simetría en los días de aumento en los conejos con y sin suplemento de hierro, pero el porcentaje y el número en el que se presentan es francamente mayor en los conejos con hierro que en los conejos sin suplemento de hierro. Ahora bien, durante el desarrollo del primer experimento se detectaron diferencias en lo que se refiere a la población de normoblastos, pero no parecía existir efecto alguno del hierro sobre los microlinfocitos. Sin embargo el incremento en la concentración de transferrina produce la salida a la circulación de grandes cantidades de microlinfocitos. Puede especularse que la transferrina dió alguna señal que ocasionó la salida de las presuntas células madre o microlinfocitos hacia nuevos sitios hematopoyéticos que colonizan, proliferando y diferenciándose posteriormente. En el trabajo con conejos suplementados con hierro se detecta únicamente el inicio de una segunda ola de células en la circulación ya que el experimento se finalizó en el día 18 de sangrado. Sin embargo, la salida de células que puede observarse en los días 18 a 21 en el experimento con conejos sin suplemento de hierro sería el resultado de los procesos de proliferación y diferenciación iniciados por la inyección de transferrina.

En resumen, el efecto de la transferrina sobre las células nucleadas parece estar dado a dos niveles: a) la salida de las células a la circulación en forma rápida (días 12 y 13) lo cual implica una liberación de células que ya han cumplido su proceso de diferenciación y maduración, y b) una salida posterior que parecería estar dada por células que al momento de inyectarse la transferrina se encontraban en los pasos de diferenciación, o inclusive, en estadios anteriores como células precursoras que inician los procesos de compromiso hacia una vía determinada de diferenciación.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

La extracción de un volúmen constante de sangre por medio de punción intracardiaca nos permite establecer una anemia experimental crónica en el conejo (variedad Nueva Zelanda). Los trabajos realizados presentan resultados que proporcionan un eslabón más en la larga cadena de los estudios encaminados al conocimiento de los mecanismos formadores de sangre y a la diferenciación celular.

Bajo estas condiciones la eritropoyesis se incrementa aproximadamente cuatro veces. La respuesta de las células sanguíneas nucleadas al estímulo de la anemia consiste en la elevación transitoria de su número entre los días 5 y 8 de sangrado regresando después a sus niveles normales. Este incremento es debido principalmente a la aparición en gran número de dos poblaciones celulares generalmente ausentes de la circulación: la de normoblastos, y una población que hemos denominado microlinfocítica por su tamaño y apariencia.

La concentración elevada de hierro sérico en los conejos suplementados con hierro se relaciona con el incremento en la población de normoblastos, por lo que se plantea que la saturación de hierro en el plasma es un mecanismo regulador en sí mismo e indicador muy sensible del balance del hierro en estas condiciones. La necesidad tisular de este metal sería el determinante primario del recambio de hierro sérico, por lo que se establece la presencia de un proceso de suplemento capaz de reponder rápida e independientemente de la saturación de la transferrina per se.

La inyección de la transferrina es capaz de inducir cambios drásticos en la cinética de las células sanguíneas provocando la liberación masiva y cíclica de las diferentes poblaciones alterando sobre todo, la liberación de normoblastos y microlinfocitos en un proceso cuya magnitud depende aparentemente de la presencia de un suplemento de hierro.

El aislamiento y purificación de los microlinfocitos constituye un primer paso en el estudio de esta población cuyas capacidades y/o funciones se desconocen.

Así, el trabajo continuo aprovechando las ventajas planteadas por la amplificación del sistema productor de sangre, será capaz si se enfoca y trabaja adecuadamente, de proporcionar nuevas evidencias en los caminos de la hematopoyesis y su regula-ción así como en la diferenciación celular.

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

- 1.- Bernal, J.D. SCIENCE IN HISTORY. Penguin Books. England, Volume 1 (1969).
- 2.- Nelsen, E.O. COMPARATIVE EMBRIOLOGY OF THE VERTEBRATES. Mc. Graw-Hill Book Co. USA (1953).
- 3.- Moore, MAS. and Metcalf, D. Ontogeny of the Haemopoietic System: Yolk Sac Origin of in Vivo and in Vitro Colony Forming Cells in the Developing Mouse Embryo. Brit J Haemat 18, 279 (1970).
- 4.- Wintrobe, M.M. CLINICAL HEMATOLOGY. Lea and Febiger. Philadelphia, 5th Edition (1962).
- 5.- Williams, J.M.; Beutler, E.; Erslen? E.J. and R. Wayne-Rundles. HEMATOLOGY. Mc Graw-Hill Book Co. USA (1972).
- 6.- Loutit, J.F. Verstile Haemopoietic Stem Cells. Brit J Haemat 15, 333 (1968).
- 7.- Barnes, D.H.W. and Loutit, J.F. Haemopoietic Stem Cells in the Peripheral Blood. The Lancet ii, 1138 (1967).
- 8.- Till, J.E.; McCulloch, E.A. and Siminovitch, L. A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation Based on the Growth of Spleen-Colony-Forming Cells. Proc Natl Acad Sci (USA) 51, 29 (1964).
- 9.- McCulloch, E.A. and Till, J.E. The Sensitivity of Cells from Normal Mouse Bone Marrow to Gamma Radiation in Vitro and in Vivo. Rad Res 16, 822 (1962).
- 10.- Siminovitch, L.; McCulloch, E.A. and Till, J.E. The Distribution of Colony Forming Cells Among Spleen Colonies. J Cell Comp Physiol 62, 327 (1963).
- 11.- Wu, A.M.; Till, J.E.; Siminovitch, L. and McCulloch, E.A. A Cytological Study of the Capacity for Differentiation of Normal Hemopoietic Colony-Forming Cells. J Cell Physiol 69, 177 (1967).

- 12.- Abramson, S.; Miller, R.G. and Phillips, R.A. The Identification in Adult Bone Marrow of Pluripotent and Restricted Stem Cells of the Myeloid and Lymphoid Systems. *J Exp Med* 145, 1567 (1977).
- 13.- Quesenberry, P. and Levitt, L. Hematopoietic Stem Cells. *New Engl J Med* 301, 755 (1979).
- 14.- Wolf, N.S. and Trentin, J.J. Hemopoietic Colony Studies V. Effect of Hemopoietic Organ Stroma on Differentiation of Pluripotent Stem Cells. *J Exp Med* 127, 205 (1968).
- 15.- Becker, A.J.; McCulloch, E.A.; Siminovitch, L. and Till, J.E. The Effect of Differing Demands for Blood Cell Production on DNA Synthesis by Hemopoietic Colony Forming Cells of Mice. *Blood* 26, 296 (1965).
- 16.- Chervenick, P.A. and Boggs, D.A. Patterns of Proliferation and Differentiation of Hematopoietic Stem Cells after Compartment Depletion. *Blood*, 37, 568 (1971).
- 17.- Fitchen, J.H.; Foon, K.A. and Cline, M.J. The Antigenic Characteristics of Hematopoietic Stem Cells. *N Engl J Med* 305, 17 (1981).
- 18.- Koeffler, H.P.; Billing, R.; Levine, A.M. and Golde, D.W. Ia Antigen is a Differentiation Marker on Human Eosinophils. *Blood* 56, 11 (1980).
- 19.- Spivak, J.L.; Misiti, J. et al Suppression and Potentiation of Mouse Hematopoietic Progenitor Cell Proliferation by Ouabain. *Blood* 56, 315 (1980).
- 20.- Cline, M.J. and Golde, D.W. Cellular Interactions in Haematopoiesis. *Nature* 277, 177 (1979).
- 21.- Toksöz, D.; Dexter, T.M.; Lord, B.I. et al. The Regulations of Hemopoiesis in Long-Term Bone Marrow Cultures II. Stimulation and Inhibition of Stem Cell Proliferation. *Blood* 55,

931 (1980).

- 22.- Price, G.B.; McCulloch, E.A. and Till, J.E. A New Human Low Molecular Weight Granulocyte Colony Stimulating Activity. *Blood* 42, 341 (1973).
- 23.- Broxmeyer, H.; Van Zant, G.; Zucali, J.R. et al. Mechanisms of Leukocyte Production and Release XII. A Comparative Assay of the Leukocytosis-Inducing Factor (LIF) and the Colony-Stimulating Factor (CSF). *Proc Soc Exp Biol Med* 145, 1262 (1974).
- 24.- Quesenberry, P. and Levitt, L. Hematopoietic Stem Cells. *N Engl J Med* 301, 819 (1979).
- 25.- Baggiolini, M.; de Duve, C.; Masson, P.L. and Heremans, J.F. Association of Lactoferrin with Specific Granules in Rabbit Heterophil Leukocytes. *J Exp Med* 131, 559 (1970).
- 26.- Broxmeyer, H.E.; Smithyman, A. et al. Identification of Lactoferrin as the Granulocyte-Derived Inhibitor of Colony Stimulating Activity Production. *J Exp Med* 148, 1052 (1978).
- 27.- Broxmeyer, H.E.; de Sousa, M. et al. Specificity and Modulation of the Action of Lactoferrin, a Negative Feedback Regulator of Myelopoiesis. *Blood* 55, 324 (1980).
- 28.- Kurland, J.I.; Bockman, R.S.; Broxmeyer, H.E. and Moore, M.A.S. Limitation of Excessive Myelopoiesis by the Intrinsic Modulations of Macrophage-Derived Prostaglandin E. *Science* 199, 552 (1978).
- 29.- Nathan, D.G.; Chess, L. et al. Human Erythroid Burst-Forming Unit: T-Cell Requirement for Proliferation in Vitro. *J Exp Med* 147, 324 (1978).
- 30.- Metcalf, D.; Johnson, G.R. and Burgess, A.W. Direct Stimulation by Purified GM-CSF of the Proliferation of Multipotential and Erythroid Precursor Cells. *Blood* 55, 138 (1980).

31.- Gordon, L.I.; Miller, W.J. et al. Regulation of Erythroid Colony Formation by Bone Marrow Macrophages. *Blood* 55, 1047 (1980).

32.- Bartelmez, S.M.; Dodge, W.H. and Bass, D.A. Differential Regulation of Spleen Cell-Mediated Eosinophil and Neutrophil Macrophage Production. *Blood* 55, 489 (1980).

33.- Sandoz. ATLAS OF HEMATOLOGY (1952).

34.- Aisen, P. and Listowsky, I. Iron Transport and Storage Proteins. *Ann Rev Biochem* 49, 357 (1980).

35.- Chandra, R.K. Iron and Immunocompetence. *Nutrition Reviews* 34, 129 (1976).

36.- Nishiya, K.; de Sousa, M. et al. Regulation of Expression of a Human Lymphoid Cell Surface Marker by Iron. *Cell Immunol* 53, 71 (1980).

37.- Jarvis, J.H. and Jacobs, A. Morphological Abnormalities in Lymphocyte Mitochondria Associated with Iron-Deficiency Anaemia. *J Clin Path* 27, 973 (1974).

38.- Siva Prasad, J. Leucocyte Function in Iron-Deficiency Anemia. *Am J Clin Nutr* 32, 550 (1979).

39.- Morgan, E.H. Transferrin, Biochemistry, Physiology and Clinical Significance, *Molec Aspects Med* 4, 1 (1981).

40.- Nunez, M.T.; Glass, J. et al. Transferrin Receptors in Developing Murine Erythroid Cells. *Brit J Haemat* 36, 519 (1977).

41.- Nunez, M.T.; Cole, E.S. and Glass, J. Cytosol Intermediates in the transport of Iron. *Blood* 55, 1051 (1980).

42.- Fletcher, J. and Huehns, E.R. Significance of the Binding of Iron by Transferrin. *Nature* 215, 584 (1967).

43.- Huebers, H.; Huebers, E.; Csiba, E. and Finch, C.A. Iron Uptake from Rat Plasma Transferrin by Rat Reticulocytes. *J Clin Invest* 62, 944 (1978).

- 44.- Galbraith, G.M.P.; Galbraith, R.M. and Page Faulk, W. Transferrin Binding by Human Lymphoblastoid Cell Lines and Other Transformed Cells. *Cell Immunol* 49, 215 (1980).
- 45.- Galbraith, G.M.P.; Goust, J.M.; Mrecurio, S.M. and Galbraith, R.M. Transferrin Binding by Mitogen-Activated Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Clin Immunol Immunopath* 16, 387 (1980).
- 46.- Schulman, H.M.; Wilczynska, A. and Ponka, P. Transferrin and Iron Uptake by Human Lymphoblastoid and K-562 Cells. *Biochem Biophys Res Comm* 100, 1523 (1981).
- 47.- Larrick, J.W. and Cresswell, P. Transferrin Receptors on Human B and T Lymphoblastoid Cell Lines. *Biochim Biophys Acta* 583, 483 (1979).
- 48.- Pulido, G. 1982. Estudio de los Mecanismos Involucrados en el Transporte de Hierro en Conejos Hechos Anémicos por Sangrado. Tesis Profesional, Facultad de Ciencias, UNAM.
- 49.- Valdés López, V.M. 1977. Estudios sobre la Dinámica de Formación de la Sangre en Conejos Hechos Anémicos por Sangrado. Tesis Profesional, Facultad de Ciencias, UNAM.
- 50.- Mainero del Paso, A. 1979. Estudio y Caracterización de los Leucocitos de Conejo Bajo Condiciones de Anemia Inducida. Tesis Profesional, Facultad de Ciencias, UNAM.
- 51.- Brewer, J.M.; Pesce, A.J. and Ashworth, R.B. *Experimental Techniques in Biochemistry*. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey (1974).
- 52.- Bancroft, H. *Introducción a la Bioestadística*, Eudeba S.E.M. Buenos Aires (1974).
- 53.- Cheng, S.C. Leucocyte Counts in Rabbits: Observations on the Influence of Various Physiological Factors and Pathological Conditions. *Am J Hyg* 11, 449 (1930).
- 54.- Casey, A.E.; Rosahn, P.D. et al. *The Hemocytological Cons-*

- titution of Adult Male Rabbits from Fifteen Standard Breeds. J Exp Med 64, 453 (1936).
- 55.- Rosahn, P.D.; Pearce, L. and Hu, C.K. Comparison of the Hemacytological Constitution of Male and Female Rabbits. J Exp Med 60, 687 (1934).
- 56.- Casey, A.E. The Diurnal Levels of Blood Leukocytes in the Normal Rabbit. Proc Soc Exp Biol Med 45, 863 (1940).
- 57.- Pintor, P. and Grassini, V. Individual and Seasonal Spontaneous Variations of Haematological Values in Normal Male Rabbits. Statistical Survey. Acta Haemat 17, 122 (1957).
- 58.- Rencricca, N.J.; Rizzoli, V. et al. Stem Cell Migration and Proliferation During Severe Anemia. Blood 36, 764 (1970).
- 59.- Lawrence, J.S. and Craddock, C.G. Stem Cell Competition: The response to antineutrophilic serum as affected by hemorrhage. J Lab Clin Med 72, 731 (1968).
- 60.- Rickard, K.A.; Rencricca, N.J. et al. Myeloid Stem Cell Kinetics During Erythropoietic Stress. Brit J Haemat 21, 537 (1971).
- 61.- Quesenberry, P. ; Levin, J. et al. Stem Cell Migration Induced by Erythropoietin or Haemolytic Anemia: the effects of Actinomycin and Endotoxin Contamination of Erythropoietin Preparations. Brit J Haemat 41, 253 (1979).
- 62.- Sabin, F.R.; Miller, F.R. et al. Changes in the Bone Marrow and Blood Cells of Developing Rabbits. J Exp Med 64, 97 (1936).
- 63.- Miller, R.G. and Phillips, R.A. Development of B Lymphocytes Fed Proc 34, 145 (1975).
- 64.- Carstairs, K. The Human Small Lymphocyte: Its Possible Pluripotential quality. The Lancet i, 829 (1962).
- 65.- van Bekkum, D.W.; van Noord, M.J. and Dicke, K.A. Attempts at Identification of Hemopoietic Stem Cell in Mouse. Blood 38, 547 (1971).

- 66.- Rubinstein, A.S. and Trobaugh, F.E. Ultrastructure of Presumptive Hematopoietic Stem Cells. *Blood* 42, 61 (1973).
- 67.- Conrad, M.E. and Barton, J.C. Factors Affecting Iron Balance. *Am J Hematol* 10, 199 (1981).
- 68.- Fillet, G.; Cook, J.D. and Finch, C.A. Storage Iron Kinetics. III. A Biologic Model for Reticuloendothelial Iron Transport. *J Clin Invest* 53, 1527 (1974).
- 69.- Hershko, C.; Cook, J.D. and Finch, C.A. Storage Iron Kinetics VI. The Effect of Inflammations on Iron Exchange in the Rat. *Brit J Haemat* 28, 67 (1974).
- 70.- Patt, H.M.; Lund, J.E. and Maloney, M.A. Cyclic Hematopoiesis in Grey Collie Dogs: A Stem-Cell Problem. *Blood* 42, 873 (1973).
- 71.- Mangalik, A. and Robinson, W.A. Cyclic Neutropenia: The Relationship Between Urine Granulocyte Colony Stimulating Activity and Neutrophil Count. *Blood* 41, 79 (1973).
- 72.- Adamson, J.W.; Dale, D.C. and Elin, R.J. Hematopoiesis in the Grey Collie Dog. Studies of the Regulation of Erythropoiesis. *J Clin Invest* 54, 965 (1974).
- 73.- Chikkappa, G.; Chanana, A.D. et al. Cyclic Oscillation of Blood Neutrophils in a Patient with multiple Myeloma. *Blood* 55, 61 (1980).
- 74.- Rosenmund, A.; Gerber, S.; Huebers, H. and Finch, C.A. Regulation of Iron Absorption and Storage Iron Turnover. *Blood* 56, 30 (1980).
- 75.- Lane, R.S. Changes in Plasma Transferrin Levels Following the Administration of Iron. *Brit J Haemat.* 12, 249 (1966).
- 76.- Lane, R.S. Transferrin Synthesis in the Rat: A Study Using the Fluorescent Antibody Technique. *Brit J Haemat* 15, 355 (1968)

- 77.- Bøyum, A. A One-Stage procedure for Isolation of Granulocytes and Lymphocytes from Human Blood. *Scand J Lab Clin Invest* 21, suppl 97, 51 (1968).
- 78.- Cullen, E.I. and Medzihradsky, F. Concurrent Isolation of Granulocytes and Lymphocytes with Unaltered Permeability, Energy State and Metabolic capacity in Vitro. *Biochem Med* 23, 133 (1980).
- 79.- Segal, A.W.; Fortunato, A. and Herd, T. A Rapid Single Centrifugation Step Method for the Separation of Erythrocytes Granulocytes and Mononuclear Cells on Continuous Density Gradients of Percoll. *J Immunol Meth* 32, 209 (1980).
- 80.- Gmelig-Meyling, F. and Waldmann, T.A. Separation of Human Blood Monocytes and Lymphocytes on a Continuous Percoll Gradient. *J Immunol Meth.* 33, 1 (1980).
- 81.- Martínez-Medellín, J. and Schulman, H.M. The Kinetics of Iron and Transferrin incorporation into Rabbit Erythroid Cells and the Nature of Stromal-Bound Iron. *Biochim Biophys Acta* 264, 272 (1972).
- 82.- Alba-Lois, L. Velázquez, P. et al. Descripción de un método sencillo para la purificación de la transferrina. XIII Reunión Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. Aguascalientes, (1980).
- 83.- Mancini, G.; Carbonara, A.O. and Heremans, J.F. Immunochemical quantitation of Antigens by Single Radial Immunodiffusion. *Immunochemistry*. Pergamon Press. Vol 2 pp 235 (1965).
- 84.- Valdés-López, V.M.; Mainero, A. et al. Characteristics and Limits of the Erythropoietic Response in Chronically Anemic Rabbits. *Blood* 58 suppl 1, 103 a (1981).