



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PRECURSORES ERITROIDES
PRESENTES EN LA MEDULA OSEA DE CONEJOS A LO LARGO
DE UN PROCESO DE ANEMIA INDUCIDO EXPERIMENTALMENTE**

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

p r e s e n t a :

HECTOR DE JESUS MAYANI VIVEROS



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.

" LONG AGO IT BECAME EVIDENT THAT THE KEY TO EVERY BIOLOGICAL PROBLEM MUST FINALLY BE - SOUGHT IN THE CELL, FOR EVERY LIVING ORGANISM IS, OR AT SOMETIME HAS BEEN, A CELL ".

Edmund B. Wilson (1925)

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias, UNAM., bajo la dirección de la M. en C. Alejandra Mainero del Paso y el Dr. Jaime Martínez Medellín.

INDICE GENERAL

	PAGINA
ANTECEDENTES	1
INTRODUCCION	3
COMPOSICION Y FUNCIONES DE LA SANGRE	4
LA HEMATOPOYESIS	6
ONTOGENIA DE LA HEMATOPOYESIS	6
MODELOS DE LA HEMATOPOYESIS Y SU REGULACION	10
LA ERITROPOYESIS	14
Precursores eritroides	15
La eritropoyetina y su mecanismo de acción	20
OBJETIVO	23
MATERIALES Y METODOS	25
a) Características de los conejos	25
b) Inducción de la anemia	25
c) Extracción de la médula ósea	25
d) Procesamiento de la médula ósea	26
e) Conteo de células obtenidas	26
f) Preparación de los frotis	27
g) Tinción de los frotis	27
h) Conteo diferencial	28
i) Medición del diámetro celular	28

RESULTADOS	29
I. ESTUDIO DE LAS CELULAS DE MEDULA OSEA	33
II. ESTUDIO DE LAS CELULAS ERITROIDES	38
III. ESTUDIO MORFOLOGICO DE LOS RETICULOCITOS	45
DISCUSION	56
CONCLUSIONES	64
APENDICE	66
BIBLIOGRAFIA	67

ANTECEDENTES

Una de las principales funciones que desempeña el tejido sanguíneo en los vertebrados es el transporte de oxígeno hacia todos los órganos del cuerpo, haciendo así posible la respiración de cualquier célula. (1) Esta función es llevada a cabo eficazmente gracias a la presencia de una proteína específica: la hemoglobina. Cada molécula de esta proteína está formada por cuatro cadenas polipeptídicas o subunidades y por cuatro moléculas no proteicas denominadas grupos hemo, los cuales tienen como componente central un átomo de hierro, - - siendo éste el que liga directamente al oxígeno. (2,3)

La hemoglobina lleva a cabo su función en el interior de células especializadas, los eritrocitos o glóbulos rojos (4), que se encuentran libres en la circulación. Sin embargo, no es en éstas sino en sus precursores, donde se lleva a cabo la síntesis de la hemoglobina a través de una serie de procesos de diferenciación y maduración denominados en conjunto eritropoyesis, la cual comprende distintos estadios celulares, siendo cada uno de ellos característico morfológica y bioquímicamente. (5)

La eritropoyesis en los mamíferos es especialmente interesante, ya que hacia el final de ella, las células pierden su núcleo y el resto de organelos celulares, dando como resultado final eritrocitos constituidos prácticamente de hemoglobina. (6)

El presente trabajo es un estudio sobre los precursores eritroides reconocibles morfológicamente, que se encuentran en la médula ósea de los huesos largos del conejo. Para tal efecto, hemos empleado un sistema en el que se le induce al animal una anemia crónica por sangrado, de tal forma que, hemos podido cuantificar y caracterizar morfológicamente a dichos precursores, tanto en condiciones normales como en condiciones de anemia, lo que nos ha permitido conocer un poco más el mecanismo de la eritropoyesis en el conejo.

INTRODUCCION

La importancia de la sangre fue reconocida mucho antes - de que se efectuaran estudios formales acerca de su circulación, sus constituyentes y sus diversas funciones. Seguramente el hombre primitivo estaba consciente de su importancia, - ya que sabía que el perderla equivalía a la muerte. De acuerdo con esto, resulta lógico el que una de las primeras hipótesis surgidas se refiera a la sangre como un transportador de alguna especie de espíritu de vida. (7)

En el siglo II de nuestra era, el anatomista griego Galeno, estableció que la sangre, en sus recorridos a través del cuerpo, obtenía su "espíritu vital" al pasar por el corazón; en el cerebro era transformado en "espíritu animal", que podía ser transmitido a través de los nervios. (8) En esa época se suponía que la sangre se movía hacia adelante y hacia atrás, en un movimiento similar al de las mareas, a lo largo de un sistema de tubos denominados venas y arterias. El concepto de un verdadero sistema circulatorio, en el que la sangre se mueve en un circuito completo, no fue propuesto sino hasta que William Harvey hubo completado su importante trabajo en 1628. (10)

En 1658, Swammerdan, estudiando sangre de rana, describió unos corpúsculos rojizos (9); sin embargo, fue A. vanLeeuwenhoek en 1674 el primero en reconocer a dichos corpúsculos como los responsables del color rojo de la sangre y además estimó su diámetro en aproximadamente 10 μ m. (10) De esta for

ma se iniciaron los primeros estudios referentes a la composi
ción del "líquido vital", estudios que han proseguido incesan
temente hasta nuestros días.

COMPOSICION Y FUNCIONES DE LA SANGRE

El tejido sanguíneo se encuentra formado prácticamente - por dos porciones, una líquida denominada plasma y otra sólida constituida por distintos tipos de células (1). El plasma sanguíneo constituye alrededor del 55 al 65 % del volumen total de la sangre; está formado en un 92 % de agua, en la cual se encuentran disueltos componentes moleculares, como son: - proteínas, lípidos, carbohidratos, sales, etc.

Por su parte, la porción celular se encuentra formada - por: eritrocitos o glóbulos rojos, leucocitos o glóbulos blancos y trombocitos o plaquetas (11), que en conjunto constituyen del 45 al 35 % restante del volumen total de sangre.

Los eritrocitos son las células más abundantes, existiendo en promedio 4 800 000/mm³ y 5 400 000/mm³ en la mujer y en el hombre adultos respectivamente. (4)

Dentro de la población de leucocitos, existen los llamados leucocitos mononucleares, que incluyen a los linfocitos y monocitos, y los leucocitos granulados, que pueden ser eosinófilos, basófilos o polimorfonucleares (12). Según estudios - realizados (13), en un milímetro cúbico de sangre de humano - existen en promedio:

Neutrófilos	3 700 células
Linfocitos	2 500 células
Monocitos	400 células
Eosinófilos	150 células
Basófilos	30 células

Por último, los trombocitos o plaquetas, más que células son fragmentos citoplásmicos derivados de un tipo celular no circulante denominado megacariocito, y funcionan básicamente en los mecanismos de coagulación de la sangre, existiendo alrededor de unas 250 000/mm³. (11,14)

La diversidad de sus componentes le ha dado a la sangre la capacidad para llevar a cabo una serie de funciones indispensables para la supervivencia de los seres que la poseen. - Entre estas funciones podemos citar:

- a) El transporte de oxígeno hacia todos los órganos y tejidos del cuerpo por medio de la hemoglobina, proteína oligomérica de peso molecular 68 000 que liga a dicho gas (2,3), y que realiza su función en el interior de los eritrocitos.
- b) La defensa del organismo contra agentes extraños a él. - Para esto existen dos sistemas independientes pero que interaccionan. El "sistema del inmunocito", en el que intervienen los linfocitos, consiste en desarrollar una respuesta inmunitaria contra una sustancia extraña o antígeno. El otro sistema, el "sistema del fagocito", está constituido por neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos, células capaces de fagocitar cuerpos extraños (12).
- c) Actúa como un tejido de comunicación entre diferentes órganos, transportando hormonas, metabolitos, metales, nutrientes, etc., desde los sitios donde son producidos, liberados o absorbidos hasta los órganos donde serán utilizados, almacenados o degradados.

LA HEMATOPOYESIS

Las células sanguíneas que se encuentran en la circulación, presentan una característica particular, son incapaces de autoreplicarse (a excepción de los linfocitos), debido a que son células maduras totalmente diferenciadas, esto es, han perdido la facultad de dividirse y originar nuevas células del mismo tipo. Este hecho, hace necesaria la existencia de otros tipos celulares denominados células hematopoyéticas, es decir, células "generadoras" de los diversos tipos celulares presentes en circulación (15). Al mismo tiempo, la producción de dichas células se lleva a cabo en centros especializados, los llamados órganos hematopoyéticos. Al conjunto de procesos de replicación, diferenciación y maduración que ocurren en los órganos hematopoyéticos y que dan por resultado la formación de las células sanguíneas se le denomina hematopoyesis.

Sin embargo, no en todos los organismos los centros hematopoyéticos son los mismos. En los peces, por ejemplo, el riñón, el hígado, las paredes del tracto digestivo, el corazón y órganos genitales son fuentes de producción de células sanguíneas (16). En los anfibios, el principal órgano hematopoyético es el hígado (3). En los reptiles es el bazo, aunque en algunos, como la tortuga y la lagartija, aparece la médula ósea como centro hematopoyético (16). En aves y en mamíferos, la médula ósea, el bazo, los nódulos linfáticos y el timo realizan dicha función. (3,15,16).

ONTOGENIA DE LA HEMATOPOYESIS

La actividad hematopoyética de los distintos órganos, se inicia antes del nacimiento, es decir, existe hematopoyesis -

prenatal. Para hablar sobre ella, nos referiremos de manera particular a los mamíferos, ya que esta clase de vertebrados es la que mayor importancia tiene para nosotros, y además por que es en éstos donde se ha estudiado más ampliamente.

El desarrollo de las células sanguíneas en la etapa embrionaria es similar en todos los mamíferos (16). La matriz de la cual derivan las células sanguíneas es el tejido conectivo embrionario, el mesénquima. En el embrión humano, las primeras células sanguíneas son formadas en las numerosas islas sanguíneas del saco vitelino, primer órgano hematopoyético (17). De acuerdo con Maximow (18), las células de dichas islas pueden diferenciarse en dos direcciones: las células periféricas dan origen a las paredes de los primeros conductos sanguíneos y las células situadas centralmente se convierten en las células hematopoyéticas primitivas.

Se propone con base en diversos trabajos que las células multipotentes de las islas sanguíneas del saco vitelino son las únicas células hematopoyéticas formadas de novo (19). Además de dar origen a las células sanguíneas primitivas, tienen la capacidad de autorenovarse, lo que hace que la población de células hematopoyéticas se mantenga.

Una vez formadas, estas células migran a través de la circulación hacia los demás órganos hematopoyéticos, desapareciendo esa actividad del saco vitelino y pasando a hígado, iniciándose así el periodo hepático de la hematopoyesis prenatal (15,20). En mamíferos como los ratones, este periodo ocupa alrededor del 80 % de la actividad hematopoyética durante la gestación (15). En los humanos es el órgano principal del 2º al 6º mes (17). Del 55 al 70 % del total de células hematopoyéticas presentes en el hígado son de la serie eritroide, siendo el resto granulocitos y megacariocitos.(15).

Simultáneamente a la hematopoyesis hepática, hay hemato-

poyesis en el bazo y en el timo, siendo estos órganos preferentemente linfopoyéticos; sin embargo, sus periodos hematopoyéticos son de poca duración y baja magnitud comparados con el del hígado. (17)

El periodo final de la hematopoyesis prenatal es el llamado mieloide, que tiene lugar en la médula ósea. Este periodo se inicia alrededor del quinto mes de gestación (17), cuando se desarrollan los centros de osificación en los modelos cartilagosos de los huesos largos. Durante los tres últimos meses de gestación, la médula ósea es, en el humano, el principal centro formador de sangre. (15,17)

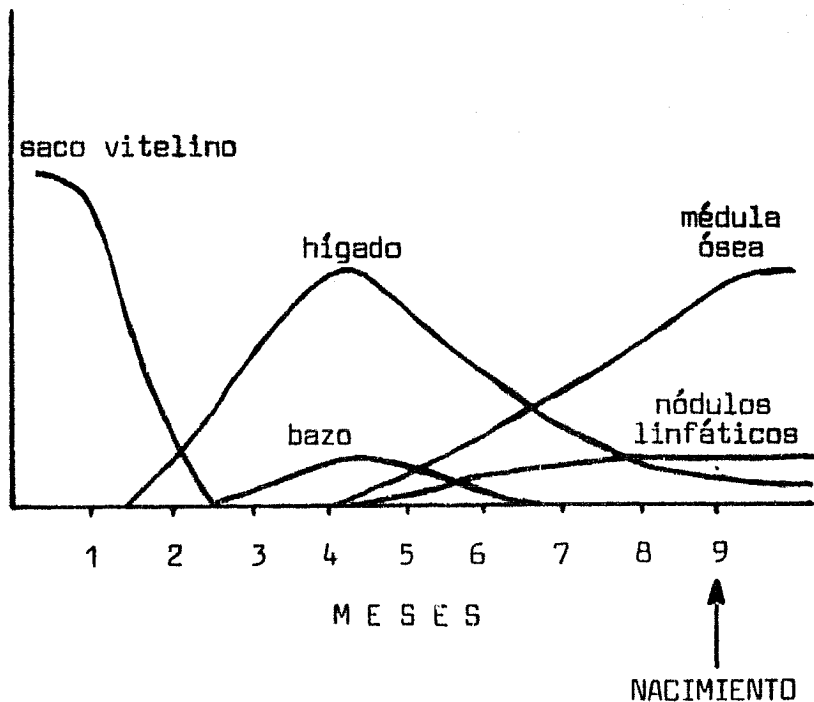


FIG. 1 ORGANOS HEMATOPOYETICOS EN EL HUMANO DURANTE EL DESARROLLO PRENATAL. (17)

En los mamíferos adultos, la actividad hematopoyética se encuentra localizada en dos tipos de tejidos, el linfático y el mieloide. El tejido linfático, en el hombre, se encuentra constituido por los nódulos linfáticos no encapsulados, los ganglios linfáticos, el bazo y el timo (21), todos ellos órganos predominantemente linfopoyéticos. Por su parte, el tejido mieloide corresponde a la médula ósea, donde se producen eritrocitos, plaquetas, leucocitos granulares y monocitos, también hay formación de linfocitos que posteriormente migran a los tejidos linfáticos. (16)

La médula ósea, principal centro hematopoyético de los mamíferos adultos, puede clasificarse en dos tipos: la médula ósea roja y la amarilla.

El primer tipo también se conoce como médula activa o médula hematopoyética: está encargada de la producción de las células sanguíneas, su color se debe al contenido de eritrocitos y sus precursores. (16,21)

La médula amarilla o inactiva está compuesta por células adiposas; se le llama inactiva por el hecho de que no interviene en la producción de células de la sangre.

Al nacer, casi la totalidad de la médula ósea de los mamíferos es roja; conforme la edad del organismo aumenta, la médula amarilla se va extendiendo, reduciéndose el espacio de la médula roja, de tal forma que queda confinada a los huesos del esqueleto axial: esternón, costillas y vertebras y a los extremos proximales de los huesos largos. (22)

Sin embargo, la médula amarilla puede actuar como un espacio de reserva para la expansión de la médula roja cuando ciertas condiciones del organismo demandan un incremento en la producción de células sanguíneas.

MODELOS DE LA HEMATOPOYESIS Y SU REGULACION

Después de que por distintos trabajos, principalmente de tipo histológico, se reconoció a ciertos órganos como centros hematopoyéticos, se hizo fundamental el investigar de qué manera la células hematopoyéticas daban origen a las células sanguíneas.

Desde que se realizaron los primeros estudios al respecto durante las primeras décadas del presente siglo (18), surgieron dos ideas principales: la primera propone que todas las células sanguíneas, eritrocitos, leucocitos y plaquetas provienen de un solo tipo celular común pluripotente; la segunda propone que cada tipo de célula sanguínea deriva de un tipo celular particular.

Así, los estudios subsiguientes se encaminaron a tratar de seguir el linaje de eritrocitos y leucocitos por medio de la morfología celular. De esta forma se propuso como ancestro de todas las células sanguíneas a una célula grande, con un citoplasma abundante, a la que llamaron hemocitoblasto (21). Sin embargo, los criterios para establecer la caracterización de dicha célula eran muy variados y poco concluyentes, por lo que la idea de encontrar a la célula madre pluripotente por medios morfológicos fue poco a poco sustituida por la idea de encontrar dicha célula de acuerdo a su capacidad de dar origen a los distintos tipos celulares sanguíneos.

A principios de los 60's, Till y McCulloch descubrieron en la médula ósea de ratones cierto tipo celular que al ser inyectados a ratones de la misma especie pero cuyo compartimiento hematopoyético había sido nulificado previamente por irradiación, tienen la capacidad de formar colonias macroscópicas en el bazo de estos últimos; estas colonias estaban formadas por células eritroides, granulocíticas y megacariocí

ticas. De esta forma, se llegó a la conclusión de que dicho tipo celular, al que denominaron Unidad Formadora de Colonias en el Bazo (CFU-S), es la célula madre hematopoyética pluripotente buscada por tanto tiempo.

Se estableció entonces que las células madre hematopoyéticas deben cumplir con dos funciones principales: 1) Diferenciarse en los elementos hémicos maduros y 2) Autorenovarse para mantener la población de células madre. (24)

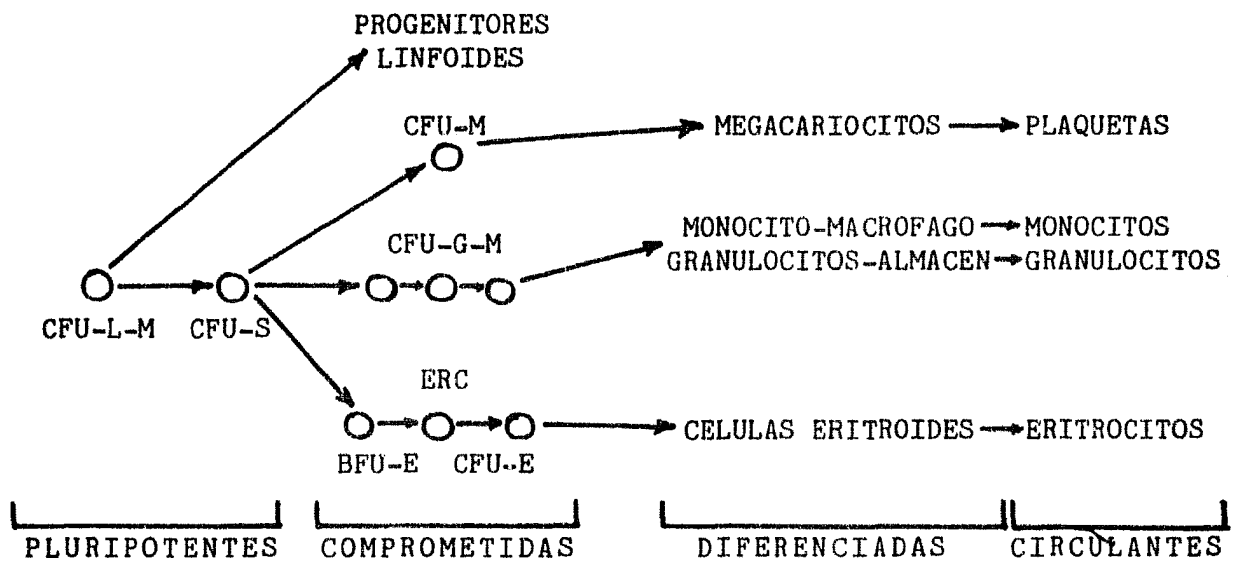
Utilizando una técnica de marcaje cromosómico inducido - por radiación, Becker, McCulloch y Till, demostraron que cada colonia formada en el bazo de ratones irradiados provenía de una sola célula del tipo CFU-S, es decir, las colonias eran - en realidad clones. (25)

Como ya se dijo antes, la frecuencia de CFU-S en bazo y médula ósea de ratones es muy baja, en algunos trabajos se propone que en toda la médula ósea de un ratón adulto hay - - aproximadamente 44 400 CFU-S y 7 000 en el bazo (15); otros estiman que por cada 10^5 células nucleadas de médula ósea hay entre 6 y 56 CFU-S (26). Este hecho ha sido uno de los más fuertes impedimentos para lograr la caracterización morfológica de este tipo celular. Desde su descubrimiento, se han - - aplicado distintas metodologías, como gradientes de densidad, (27), para la purificación de las CFU-S, sin embargo, los resultados obtenidos hasta la fecha no han sido los deseados. - Con respecto a su morfología hay evidencias de que son células con un aspecto, tamaño y peso similar a los linfocitos. - (16)

Los estudios referentes a la composición celular de las colonias formadas por CFU-S demostraron la total ausencia de células linfoides (28), lo que en un principio creó un gran desconcierto, pues el origen de estas células continuaba siendo una incógnita. Sin embargo, en 1977, Abramsom, Miller y -

Phillips (29) demostraron la presencia en la médula ósea de ratones, de un tipo celular capaz de originar células linfoides y CFU-S.

Con base en las diversas evidencias presentadas a lo largo de casi veinte años, Quesenberry y Levitt, en 1979 propusieron el siguiente modelo de hematopoyesis (30):



- 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

FIG. 2: MODELO DE LA HEMATOPOYESIS (30)

Al mismo tiempo en que se han ido estableciendo las relaciones filéticas entre los diversos tipos de células sanguíneas y sus precursores hematopoyéticos, se han realizado trabajos con el fin de conocer los mecanismos reguladores de la hematopoyesis, desde las CFU-L-M y CFU-S hasta los tipos celulares circulantes. Dichos mecanismos reguladores involucran básicamente tres tipos de interacciones:

- a) Interacciones directas célula-célula.
- b) Interacciones indirectas célula-célula.
- c) Interacciones entre factores séricos y sus respectivas células blanco.

Estos tipos de interacciones a su vez se ven influenciados por ciertas condiciones fisiológicas del organismo como - por ejemplo, los requerimientos de oxigenación por parte de los tejidos, la invasión de agentes extraños al organismo, - alteraciones en los centros hematopoyéticos, pérdidas sanguíneas, etc.

De acuerdo a distintos trabajos, las interacciones directas célula-célula ocurren a nivel de los tipos celulares hematopoyéticos primarios pluripotentes, esto es, entre estas células y las de su entorno. Es lo que Curry y Trentin han llamado Microambiente Inductivo Hematopoyético (HIM) (31); ellos demostraron que las células del estroma de la médula ósea y - de las distintas áreas del bazo tienen influencia directa sobre las CFU-S, de tal forma que determinan el tipo de células que se originan a partir de éstas (15). Por otro lado, parece ser que el tamaño de la población de CFU-S es un autoregulator de su propia producción. Se ha visto que cuando hay - una disminución en el número de células circulantes sin alterar los órganos hematopoyéticos, las CFU-S primero se diferencian y luego se autorenewan (24), mientras que cuando la población de CFU-S se reduce a un 10 % o menos, su actividad de

diferenciación prácticamente se anula y tiende solamente a la autorenovación. (32)

Dentro de las interacciones indirectas célula-célula, existen dos de particular relevancia. La primera de ellas es la que involucra al factor hematopoyético denominado "actividad estimuladora de colonias" (CSA), el cual tanto in vivo - como in vitro induce la producción de monocitos, macrófagos y de granulocitos (33). Se sabe que los mismos monocitos, macrófagos, linfocitos y células endoteliales son fuentes productoras de CSA (33,34) y que dicho factor actúa a nivel de las CFU-G-M. (30).

La segunda interacción de este tipo es la que ocurre entre los linfocitos T y las células eritroides, se ha encontrado que dichos linfocitos generan ciertos productos que intervienen en la regulación de la producción de los progenitores eritroides.

Por último, las interacciones entre factores séricos y sus células blanco son particularmente claras en la producción de eritrocitos y plaquetas. Con respecto a los primeros, se sabe que su producción es regulada por un factor humoral el cual ha sido denominado eritropoyetina, que es una glicoproteína producida en el riñón (33,35,36). Esta actúa sobre las ERC y sobre la población de normoblastos. (30,33)

Por su parte otro factor humoral denominado trombopoyetina ejerce una acción específica sobre las CFU-M para inducir la producción de plaquetas.

LA ERITROPOYESIS

Se denomina eritropoyesis al conjunto de procesos biológicos como la diferenciación, proliferación, actividades bio-

sintéticas y maduración, que hacen posible el que existan en el torrente sanguíneo las cantidades apropiadas de eritrocitos y hemoglobina, de tal forma que pueda llevarse a cabo el transporte adecuado de gases en el organismo (5). La eritropoyesis es entonces un mecanismo complejo cuyo producto final es el eritrocito o glóbulo rojo. (5, 10, 11)

El estudio de esta vía hematopoyética, tiene sus orígenes en el siglo pasado, cuando en 1868 Neumann publicó sus resultados en los que dice que los glóbulos rojos humanos se originan de células precursoras nucleadas existentes en la médula ósea.(10)

A partir de ese momento surgieron dos cuestionamientos fundamentales: ¿qué factores regulan la producción de eritrocitos? y ¿cómo son y cuántos son los precursores eritroides?, ninguna de estas dos preguntas ha sido respondida totalmente en la actualidad.

PRECURSORES ERITROIDES

Desde que fueron descubiertos en la médula ósea del humano, en el siglo pasado, los precursores eritroides han sido estudiados cada vez más ampliamente. De esta forma, se han llegado a describir cinco estadios anteriores al eritrocito (5,10,16,17): Pronormoblasto, normoblasto basófilo, normoblasto policromatófilo, normoblasto ortocromático y reticulocito (algunos autores sustituyen el término normoblasto por el de eritroblasto). Sin embargo, estudios llevados a cabo en los últimos veinte años, han demostrado que la línea eritroide se inicia con una población de células más diferenciadas que las CFU-S, pero no reconocible como pronormoblasto. (41,42).

En 1964, Bruce y McCulloch (43) demostraron que las - - CFU-S no son sensibles a la eritropoyetina y que por lo tanto son una población distinta y antecesora de las células sensibles a eritropoyetina.

O'Grady y Lewis (44) propusieron que las células sensibles a eritropoyetina pueden proliferar aún en ausencia de dicha glicoproteína, sin embargo, requieren de ella para diferenciarse en los elemento eritroides reconocibles morfológicamente.

Los trabajos de Axelrad, McLeod, Shreeve y Heath (45,46) a mediados de los 70's demostraron que la población que había sido llamada de células sensibles a eritropoyetina estaba formada al menos por dos poblaciones: Las células del tipo - - BFU-E (unidad expansiva de colonias eritroides) y las CFU-E (unidad formadora de colonias eritroides), lograron además - separar ambas poblaciones con base en sus distintas velocidades de sedimentación. Las BFU-E son células provenientes de las CFU-S, probablemente de manera directa. Son células inmaduras que al dividirse originan a las CFU-E. En el tejido eritroide, las BFU-E son más escasas que las CFU-E y además - son células con mayor velocidad de sedimentación que las segundas. Para su desarrollo, las BFU-E requieren mayores concentraciones de eritropoyetina que las CFU-E (45). En condiciones de anemia, la población de BFU-E no sufre alteraciones considerables en su tamaño, mientras que la de CFU-E se incrementa varias veces (47). Algunos autores piensan que tanto - las BFU-E como las CFU-E son los estadios extremos del compartimiento sensible a eritropoyetina no reconocible morfológicamente, lo que implicaría una serie de estadios intermedios.

A pesar de la caracterización bioquímica y cinética que de ambos precursores se ha hecho, su caracterización morfológica no ha sido claramente establecida; Orlic ha propuesto -- que son células de 8 a 12 μ de diámetro con un núcleo irregu-

lar y de cromatina dispersa, su citoplasma contiene numerosos ribosomas libres y poco retículo endoplásmico rugoso. (40)

Aparentemente las CFU-E son las células que directamente originan a los precursores eritroides identificables morfológicamente. Estos últimos han sido caracterizados más ampliamente en el humano (5,10,11,16,17,55), sin embargo, parece -- ser que su morfología es similar en todos los mamíferos estudiados. La siguiente descripción se basa en los estudios hechos en humanos utilizando la tinción de Wright.

El primero y más inmaduro de estos estadios es el pronormoblasto, célula que aparentemente es incapáz de autorenovarse (48) ya que se encuentra "programada" exclusivamente para la diferenciación. Su diámetro es de aproximadamente 20μ y su forma es irregularmente ovalada. El núcleo ocupa aproximadamente el 80 % del total de la célula, su posición es generalmente central o cargada ligeramente hacia un lado. La cromatina es fina con gránulos pequeños presentando uno o más nucleolos. Su citoplasma es muy basófilo. En este estadio no se detectan aún moléculas de hemoglobina en el citoplasma, -- aunque Harrison, et. al. (49) han reportado la acumulación de RNAm como evento preliminar a la síntesis de dicha proteína. Al dividirse por mitosis, el pronormoblasto origina al normoblasto basófilo.

Este segundo estadio tiene un diámetro entre 16 y 18μ . El núcleo ocupa tres cuartas partes del área total y con tinción de Wright presenta un color violeta rosáceo a diferencia del morado del núcleo del pronormoblasto. La cromatina se arregla en gránulos gruesos. El citoplasma es muy basófilo, tiñéndose de un color azul intenso y con numerosos poli--ribosomas.

El siguiente estadio es el llamado normoblasto policromatófilo, cuyo diámetro es de 12 a 15μ . Es en este estadio -- donde se dispara la síntesis de hemoglobina, la cual se depo-

sita en el citoplasma confiriéndole un color que va del azul claro al verde grisáceo. El núcleo ocupa alrededor de la mitad del área total y es generalmente excéntrico. La cromatina se encuentra más condensada que en los estadios anteriores. M. Bessis, ha propuesto que en realidad existen dos estadios policromatófilos, siendo el segundo de un diámetro ligeramente menor y con mayor cantidad de hemoglobina que el primero.

El último estadio nucleado en la eritropoyesis de mamíferos es el normoblasto ortocromático, producto de la última división mitótica. Su diámetro varía de 10 a 14 μ . El núcleo, totalmente picnótico (condensado), ocupa alrededor de una cuarta parte del área total y es totalmente excéntrico. Se ha visto que este estadio celular ejecuta movimientos ondulatorios, probablemente como preparación a la expulsión del núcleo. Precisamente con este evento se produce el nacimiento del reticulocito, el cual sale a la circulación a través de sinusoides.

Con respecto a la expulsión del núcleo, se ha demostrado que dicho organelo sale completo de la célula, llevándose un anillo delgado de citoplasma y membrana, sin sufrir ruptura alguna (50). Sin embargo, ¿qué es lo que determina que el núcleo sea expulsado? Algunos autores proponen que cuando la acumulación de hemoglobina en el citoplasma llega a una concentración crítica, el núcleo debe ser expulsado (37); por otro lado, Tavassoli y Crosby (51), concluyen que el problema es puramente mecánico, es decir, que al intentar pasar a la circulación a través del sinusoides, el citoplasma, que es flexible logra hacerlo, pero el núcleo, más rígido, es incapaz de atravesarlo, produciéndose una ruptura que origina la pérdida del núcleo y la salida del reticulocito a la circulación. Ahora bien, existen datos de que en condiciones de anemia hay una salida masiva de normoblastos, policromatófilos y ortocromáticos, a la circulación (52), e incluso de que la ex-

pulsión del núcleo puede ocurrir ahí mismo (53).

El reticulocito, cuyo diámetro es de 10 aproximadamente, conserva mitocondrias, restos de retículo endoplásmico, remanentes del aparato de Golgi y polirribosomas, estos últimos - en menor número que en las células nucleadas (54). Durante los estadios nucleados de diferenciación, se sintetiza entre el 70 y 80 % del total de hemoglobina presente en el eritrocito, el resto es sintetizado durante la etapa de reticulocito (10), la cual dura alrededor de 48 horas. Paulatinamente el reticulocito se va deshaciendo de sus organelos y estructuras citoplásmicas, algunas de las cuales son degradadas, mientras que organelos como las mitocondrias son excitados en vesículas (56).

Así llegamos al estadio final, el eritrocito, carente totalmente de organelos y ribosomas y constituido intracelularmente prácticamente por hemoglobina. Su diámetro es de 7.5 a 8.3 μ y su volúmen es de 83 μ^3 . Su vida promedio en el humano es de 120 días; a medida que envejece, su superficie membranal va sufriendo alteraciones que provocan que al pasar por órganos como el bazo sean reconocidos por macrófagos los cuales los atrapan y destruyen. (3,4,10,11,17)

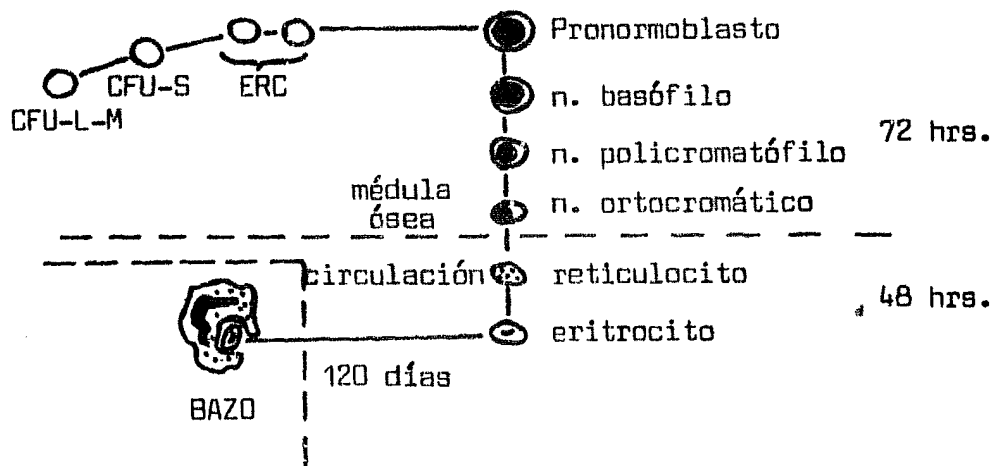


FIG. 3: MODELO DE LA ERITROPOYESIS (10,40)

Al mismo tiempo que se van presentando cambios morfológicos durante la eritropoyesis, ocurren cambios a nivel bioquímico, algunos de los cuales están resumidos en el siguiente cuadro de acuerdo a : Lowy, et. al. (57), Denton y Arnstein (58) y Nuñez, et. al. (67):

	D N A		R N A		HEMOGLO	Receptores
	Síntesis	Contenido	Síntesis	Contenido	BINA	para transfe
					Contenido	rrina
Pronormoblasto	+	+	+	+	-	+
N. Basófilo	+	+	+	+	±	+
N. Policromatófilo	±	+	+	+	+	+
N. Ortocromático	-	+	±	+	+	+
Reticulocito	-	-	-	+	+	+
Eritrocito	-	-	-	-	+	-

LA ERITROPOYETINA Y SU MECANISMO DE ACCION

En 1906, Carnot y Deflandre sugirieron que la oxigenación de la sangre regula la producción de células rojas a través de un factor intermediario (35). El estudio de este factor prosiguió y en 1948, Bonsdorff y Jalavisto lo llamaron factor de estimulación eritropoyética o eritropoyetina (37). En 1953, Erslev publicó resultados concluyentes sobre la presencia de un factor humoral estimulador de la actividad eritropoyética, cuya concentración en el plasma de conejos anémicos es mayor que en el plasma de conejos normales (35).

Actualmente sabemos que dicho factor, la eritropoyetina,

es una glicoproteína que contiene un 33 % de carbohidratos - (38), siendo fundamental para su actividad biológica el ácido siálico. Su peso molecular ha sido calculado entre 27 000 y 70 000. Su coeficiente de sedimentación es de 5S y su movilidad electroforética corresponde a la región de las α -globulinas (15,36,37). Se sabe que el órgano que principalmente la produce es el riñón (35). En 1966, Alexanian (39) demostró - que la eritropoyetina no solo está presente en sujetos anémicos, sino también en normales, en menor concentración, esto - es, es un regulador constante de la actividad eritropoyética.

En 1973, Gordon et.al., propusieron que en la circula- - ción existe un factor eritropoyético no activo o precursor de la eritropoyetina, el cual es convertido en eritropoyetina ac- - tiva por otro factor denominado eritrogenina, que es producido en el riñón bajo condiciones de hipoxia (40).

De cualquier forma, aunque en la actualidad no se conoce con exactitud el mecanismo de producción de la eritropoyeti- - na, es indiscutible su participación en la eritropoyesis.

Una vez analizados brevemente los precursores eritroides enfocaremos nuestra atención a la manera como actúa la eritro- - poyetina sobre cada uno de ellos. Este problema no ha sido - resuelto plenamente, sin embargo, hay diversos trabajos que - contribuyen a su mejor comprensión.

Como se dijo anteriormente, las células del tipo BFU-E, requieren mayores concentraciones de eritropoyetina para su desarrollo que las CFU-E (45), lo cual aparentemente se debe a que en su superficie membranal tienen menor número de recep- - tores para dicha proteína, lo que las hace menos sensibles. - (47). En cuanto a las CFU-E, la eritropoyetina parece regu- - lar su capacidad proliferativa y de autorenovación ya que se ha demostrado que su tamaño poblacional así como el número de

colonias en desarrollo son dependientes de la concentración de ella (40,45,47); de tal forma que a mayores concentraciones, el número de pronormoblastos producidos se incrementa (59).

Se ha propuesto que tanto en éstas células como en los precursores morfológicamente reconocibles, la acción de la eritropoyetina, involucra los siguientes eventos: (60)

- a) Interacción de la eritropoyetina con receptores específicos en la membrana.
- b) Activación de un factor citoplásmico que transfiera el mensaje hacia el genoma.

En 1969, Pavlov (61), demostró que la síntesis de mRNA, tRNA y rRNA en los precursores eritroides se incrementa en condiciones de alta concentración de eritropoyetina, esto podría explicar el aumento en la velocidad de diferenciación y maduración de cada estadio en condiciones de anemia (37,40,48,60), lo que ocasiona que sus periodos de vida se reduzcan.

También se ha demostrado que la eritropoyetina tiene efecto sobre la incorporación de hierro en las células eritroides, provocando un incremento en la síntesis de hemo (62).

Por último, es importante hacer notar que aunque diversos trabajos han demostrado que la eritropoyetina no es el único factor regulador de la eritropoyesis (como ejemplo ref. 72), las evidencias actuales parecen concluir que es el de mayor relevancia.

OBJETIVO

En la actualidad, la composición y fisiología de la sangre son aspectos que, en términos generales, se tienen bien caracterizados y cuyas aplicaciones médicas han sido fundamentales. Sin embargo, el origen de este tejido todavía encierra una gran cantidad de incógnitas para el hombre, debido a que son numerosos, variados y complejos los factores y mecanismos que están involucrados en su producción.

En el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias, UNAM, se realizan diversos estudios sobre los mecanismos de formación de la sangre y de manera particular sobre las vías metabólicas del hierro (Fe) para su incorporación en la biosíntesis de la hemoglobina. Para tales estudios se ha desarrollado un sistema in vivo en conejo, en el cual, se le induce al animal una anemia crónica por sangrado, de tal forma que el mecanismo de eritropoyesis se amplifica (63, 64). Además, se ha demostrado que la máxima respuesta de este mecanismo se alcanza cuando se extraen diariamente de 9 a 12 ml de sangre por kg de peso del animal (65). Esto facilita enormemente el acceso al estudio y comprensión de los procesos bioquímicos y celulares que ocurren a lo largo de dicho mecanismo.

Como respuesta del organismo al estímulo del sangrado, se observan en la circulación un aumento en el número y porcentaje de reticulocitos, y cuando la respuesta es máxima, se observa además un incremento en el diámetro y volumen celular de reticulocitos y eritrocitos (macrocitosis). Estos cambios

observados en la sangre, deben tener su origen en el sistema hematopoyético del conejo, por lo que se hace absolutamente indispensable el estudio de dicho sistema.

El presente trabajo tiene el propósito de estudiar cualitativa y cuantitativamente a los precursores eritroides presentes en la médula ósea de los huesos largos del conejo y su relación con las demás poblaciones celulares ahí presentes, buscando así comprender a este nivel los procesos de formación de la sangre.

Los precursores eritroides serán sujetos a un análisis morfológico y cinético detallado a lo largo del periodo de anemia, para tratar de entender un poco más profundamente el origen de los cambios que se observan en la circulación en cuanto a tamaño y producción de las células rojas.

MATERIALES Y METODOS

a) CARACTERISTICAS DE LOS CONEJOS

Para todos los experimentos se utilizaron conejos Nueva Zelanda blancos, cuyas edades fluctuaban entre los 10 y 15 meses, y cuyos pesos eran de 3.3 a 3.9 kg; eran pues, conejos de pesos y edades correspondientes a la etapa adulta. Fueron alimentados ad libitum con purina, zanahorias y lechuga. Todos ellos fueron criados en el bioterio de la Facultad de - - Ciencias, UNAM.

b) INDUCCION DE LA ANEMIA

Los conejos fueron sangrados diariamente por punción cardiaca. El volumen de sangre a extraer se determinó de acuerdo al peso corporal del animal, removiéndose en todos los experimentos nueve mililitros diarios por kg de peso. Dos parámetros hematológicos, hematocrito y hemoglobina, se cuantificaron durante la inducción de la anemia solamente como indicadores del proceso.

c) EXTRACCION DE LA MEDULA OSEA

Se sacrificó a cada conejo desnucándolo, después de lo cual se extrajeron los fémures, tibias y húmeros. Cada hueso fué abierto con pinzas por ambos extremos, de tal forma que por uno de ellos se introdujo una jeringa que contenía solución salina G-BSA (SSG-BSA) (ver apéndice 1), y por el otro extremo salía la mezcla de médula ósea y solución.

Dicha mezcla fué vertida en un vaso de precipitado de 400 ml., el cual se encontraba en un recipiente con hielo. La médula de todos los huesos fué colocada en el mismo vaso. La extracción fué hecha lo más rápidamente posible.

d) PROCESAMIENTO DE LA MEDULA ÓSEA

Inmediatamente después de extraída, la médula ósea suspendida en SSG-BSA, fué filtrada a través de cuatro capas de gasa para eliminar restos de tejido graso, músculo y fragmentos de hueso. Luego se centrifugó a 1 200 rpm durante 10 min a 6°C, en una centrífuga Beckman Model TJ-6. Al terminar, los sobrenadantes se descartaron y los paquetes celulares se resuspendieron en SSG-BSA juntándose todos ellos en un tubo de Kolmer, manteniéndose siempre en frío. Posteriormente la muestra fué centrifugada durante 10 min. a 1 200 rpm en una centrífuga clínica Adams-Dynac con cabezal de columpio CT-1350 a temperatura ambiente. El sobrenadante fué descartado y el paquete celular resuspendido una vez más en SSG-BSA. Este procedimiento se repitió dos veces más, al final de los cuales se midió con exactitud el volumen total de la muestra resuspendida. Después de ésto se efectuó el conteo de células y por último se hicieron frótis.

e) CONTEO DE CELULAS OBTENIDAS

La cantidad total de células obtenidas en la extracción de médula ósea se determinó en un contador electrónico Haema-Count MK-2S. Se tomaron 20 μ l de muestra que fueron diluidos en 16 ml de Isotón (ver apéndice 2), haciéndose una dilución 1:800. De ésta, se tomaron a su vez 100 μ l y se llevaron a un volumen de 10ml, lo que representó una dilución 1:80000. Fué esta última la que sirvió para determinar el número total de

células obtenidas, el cual es expresado por el contador como: número de células $\times 10^6/\text{mm}^3$.

Posteriormente dicho número se multiplicó por mil para obtener la relación: número de células $\times 10^9/\text{ml}$, y finalmente se multiplicó este último por el volumen total y así conocer el número total de células extraídas.

f) PREPARACION DE LOS FROTIS

Los frotis fueron hechos en cubreobjetos de 22 x 22 mm - de tamaño (63); en uno de ellos, sostenido solo por los bordes, se depositó una gota de la muestra de médula ósea con pipeta Pasteur. Otro cubreobjetos fué colocado sobre el primero de tal forma que quedaron cruzados y con las puntas libres distribuyéndose la muestra entre ambos. Rápidamente se separaron los cubreobjetos con un movimiento de deslizamiento horizontal. Los frotis se dejaron secar a temperatura ambiente.

g) TINCION DE LOS FROTIS

Una vez secos, los frotis se tiñieron usando colorante - de Wright (Merck), el cual se preparó de la siguiente manera: 0.24 g de colorante se disolvieron en 100 ml. de metanol - - (Merck). La solución se dejó reposar durante 5 días, después de los cuales se filtró (63), posteriormente se hizo una dilución 1:2 con metanol (17) y quedó lista para su uso. 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 ácidos, como el núcleo y el RNA citoplásmico; por su parte la eosina, que es roja, tiñe los - componentes celulares básicos. Algunas estructuras se tiñen

con ambos componentes, adquiriendo un color rojo violeta.

Cada frotis se cubrió completamente con el colorante durante 2 minutos y al cabo de éste tiempo se diluyó con agua destilada sin tirar el colorante; así permaneció otros 7 minutos, luego se lavó con abundante agua de la llave. Se dejó secar a temperatura ambiente y por último se montó en un portaobjetos sobre una gota de aceite de inmersión (Merck).

h) CONTEO DIFERENCIAL

Los frotis se observaron en un microscopio de contraste de fases SPENCER (American Optical Corporation), usando el objetivo de inmersión (100x). Se utilizó un teclado Clay-Adams de 8 teclas, contándose alrededor de 1 200 células por concha.

i) MEDICION DEL DIAMETRO CELULAR

Se hizo en un fotomicroscopio II Carl Zeiss, empleando - el objetivo de inmersión (100x), y un ocular con rejilla graduada.

RESULTADOS

Trabajos anteriores llevados a cabo en este laboratorio (63,65) han demostrado que al inducir una anemia crónica por sangrado diario en el conejo, ocurren una serie de cambios en la circulación que involucran tanto a la producción de células como a la síntesis de hemoglobina. Al mismo tiempo, se ha demostrado que la respuesta máxima del sistema eritropoyético al estímulo del sangrado se alcanza cuando son removidos diariamente de 9 a 12 ml de sangre por kg de peso corporal del animal (65). Algunos de estos resultados están resumidos en la figura 4, en donde se observa que al iniciar el proceso (día 0), todos los valores hematológicos corresponden a los reportados para conejos sanos. A partir del primer día de sangrado ocurre un descenso muy marcado en cuanto a hematocrito, número de células rojas y cantidad de hemoglobina en la circulación. Al mismo tiempo el número de reticulocitos en la sangre comienza a incrementarse, lo que indica que el mecanismo de eritropoyesis se está amplificando como respuesta al estímulo del sangrado.

Entre los días 4 y 6 los tres primeros parámetros llegan a sus valores más bajos, mientras que el número de reticulocitos sigue incrementándose. En los siguientes días, los parámetros que habían descendido presentan una recuperación hasta alcanzar, alrededor del día 11 un nuevo equilibrio. Por su parte, el número de reticulocitos, que se había venido incrementando durante todo el proceso, alcanza sus valores máximos entre los días 9 y 11, a partir de los cuales, se mantiene también en equilibrio.

Esta nueva etapa de equilibrio alcanzada alrededor del -

día 11 del proceso implica que el mecanismo de eritropoyesis se ha amplificado al máximo, de tal forma que diariamente se están produciendo el mismo número de células rojas que son re movidas de la circulación por el sangrado diario.

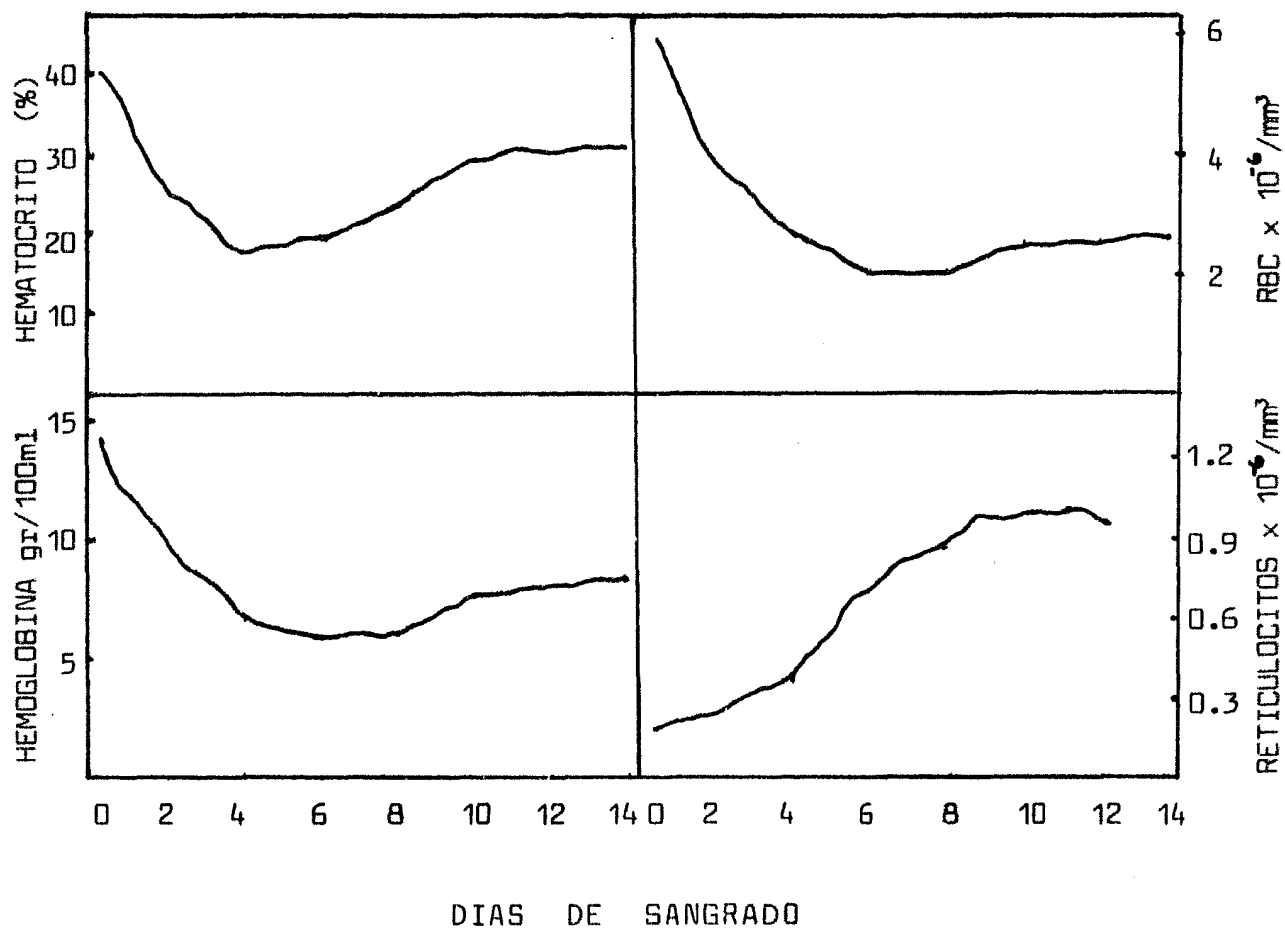


FIG. 4: CAMBIOS EN ALGUNOS PARAMETROS HEMATOLOGICOS DEL CONEJO DURANTE UN PROCESO DE ANEMIA INDUCIDA POR SANGRADO. (63,64,65)

De acuerdo a lo anterior, decidimos llevar a cabo los experimentos para el estudio de la médula ósea en días que fuerán representativos de cada una de las etapas que se presentan durante la inducción de la anemia:

- a) Día 0. Día inicial de sangrado, en el cual todos los parámetros hemstológicos corresponden a los valores normales.
- b) Día 4. Etapa crítica, en la que los parámetros alcanzan sus valores más bajos. El mecanismo de eritropoyesis se ha comenzado a amplificar (ver número de reticulocitos en la figura 4).
- c) Día 8. Etapa de recuperación. La producción de células rojas está muy incrementada.
- d) Días 12 y 14. Etapa de equilibrio. La producción de células aparentemente ha llegado a un máximo.

Para cada día se hicieron dos experimentos, exceptuando en el día 8, en que se hicieron tres.

Como ya se mencionó en materiales y métodos, los huesos empleados fueron fémures, tibias y húmeros, en primer lugar, porque se sabe que son los huesos largos los que responden más eficazmente en la producción de células a estímulos como la hipoxia (17); en segundo lugar, porque son estos huesos los que permiten obtener el mayor número posible de células en cada extracción de médula ósea; en tercer lugar, porque debido a su tamaño y localización son fáciles de extraer del animal.

Para que la extracción de médula ósea fuera siempre lo más homogénea posible, la metodología seguida fué siempre la misma, tratando que cada hueso quedara totalmente limpio en

su parte interna.

Para llevar a cabo el conteo diferencial de médula ósea, las células fueron clasificadas de acuerdo a su morfología, - en los siguientes tipos:

- Granulocitos: Incluyen basófilos, eosinófilos, segmentados y las formas inmaduras de cada uno de éstos.
- Mononucleares: comprenden linfocitos y sus precurso--res, monocitos, células plasmáticas, blastos mononu- - cleares y células no identificables pero de aspecto semejantes a las anteriores.
- Normoblastos: Células reconocibles, de acuerdo a lo - reportado (5,10,11,16,17,55) como precursores eritroi- des nucleados.
- Reticulocitos y eritrocitos: Células rojas no nuclea- das.

Ahora bien, como ya sabemos, los eritrocitos son células presentes solamente en la circulación, no son células de la - médula ósea; por su parte los reticulocitos tampoco son con- siderados como células de la médula ósea, debido a que se ha postulado que se originan durante el paso a través de los si- nusoides de la médula ósea hacia la circulación, o bien, que se forman en la médula e inmediatamente salen a la sangre. - Por lo tanto, ambos tipos celulares no son considerados en este trabajo como poblaciones de la médula ósea, atribuyéndose su presencia a la irrigación sanguínea del tejido hematopoyé- tico.

I- ESTUDIO DE LAS CELULAS DE MEDULA OSEA

Aunque nuestro interés principal durante la realización de este trabajo se centró en los precursores eritroides reconocibles morfológicamente, fué indispensable contestar a tres preguntas fundamentales que tenían gran relevancia en el estudio de la eritropoyesis de conejo:

¿ Es reproducible el número de células extraídas de la médula ósea de los huesos largos del conejo en cada uno de los experimentos ?

¿ Dicho número tiene alguna relación con respecto al día de sangrado en que se hizo la extracción ?

Y por último, ¿ Qué ocurre con las otras poblaciones celulares de la médula ósea durante el período de anemia ?

Empezaremos describiendo los resultados que dan respuesta a las preguntas anteriores y posteriormente centraremos nuestra atención en los precursores eritroides.

En cada uno de los experimentos realizados se cuantificó el número total de células obtenidas en la extracción de la médula ósea. Los resultados obtenidos demuestran que dicho número fué incrementándose conforme el período de anemia fué transcurriendo.

Como se puede ver en la tabla 1 y en la figura 5, el incremento fué pequeño durante los primeros días de sangrado; - alrededor del día 4 la cinética de estas células adquirió una pendiente más pronunciada hasta el día 12 en el que el número total de células deja de incrementarse, siendo prácticamente el mismo que para el día 14, lo que implica que se ha llegado a un nuevo equilibrio. Si consideramos el número inicial, aproximadamente 24×10^6 células y el número en el equilibrio, alrededor de 79×10^6 , puede notarse que el número total de células obtenidas es poco más de tres veces mayor en el equilibrio.

Ahora bien, tomando en cuenta que en todos los experimentos la metodología empleada para la extracción y procesamiento de las células fué la misma y que los conejos utilizados fueron todos de edad, peso y tamaño semejantes, parece razonable concluir que el incremento observado es real.

Dentro de las células obtenidas en la extracción, encontramos reticulocitos y eritrocitos, células propias de la circulación sanguínea, y que como ya se mencionó con anterioridad no han sido consideradas como parte de la población de médula ósea, por lo tanto fué necesario realizar conteos diferenciales a través del microscopio, para evitar tomarlas en cuenta en los estudios posteriores.

En la figura 5 se observa una cinética más o menos paralela entre el número de células totales y el número de células de médula ósea. Durante todo el proceso, el número de células de médula ósea representó entre el 70 y 80% del total obtenido; lo anterior indica que el incremento antes mencionado se debe a las células de médula ósea.

	Nº de Células ($\times 10^8$)				
Día de Sangrado	0	4	8	12	14
CELULAS TOTALES	24.25 \pm 0.7	34.85 \pm 0.1	54.26 \pm 11.6	78.00 \pm 6.0	79.20
CELULAS DE MEDULA OSEA	16.75 \pm 3.1	27.40 \pm 3.1	44.40 \pm 11.1	58.00 \pm 3.6	60.03

TABLA 1: Número de células ($\times 10^8$) obtenidas en la extracción de la médula ósea de los huesos largos del conejo durante un proceso de anemia inducida por sangrado.

Hasta aquí hemos considerado a las células de la médula ósea como una sola población, sin embargo, sabemos que en realidad existen varias poblaciones celulares, por lo que la siguiente meta fué seguir a cada una por separado durante el proceso de anemia, obteniendo así su comportamiento individual. Las poblaciones se clasificaron como ya se mencionó, en granulocitos, normoblastos y mononucleares. El estudio se hizo -- por medio de conteos diferenciales, considerando como 100% al total de células de médula ósea.

En el día 0, esto es, en conejos normales, la población de granulocitos representó alrededor del 58% del total, las mononucleares el 24% y los normoblastos el 18%. Estos porcentajes son semejantes a los observados en humanos, en donde se ha reportado para granulocitos entre el 55 y 61%, para normoblastos, alrededor del 21% y para mononucleares del 20 al 23% (68).

Conforme avanza la anemia, la población de granulocitos disminuye en porcentaje en forma constante hasta el día 12, - en el que llega a un equilibrio, representando ahora solamente el 31%. La población de mononucleares, por su parte, incrementa ligeramente su porcentaje los primeros 4 días, sin embargo, desciende posteriormente hasta alrededor de un 12%.-- Por último, la de normoblastos a diferencia de las otras dos, incrementa continuamente su porcentaje. Al principio su incremento es lento, pero a partir del días 4 se hace más marcado hasta el día 12 en que alcanza un nuevo estado de equilibrio, representando ahora alrededor del 55% del total. Los resultados anteriores se encuentran en detalle en la tabla 2 y figura 6.

Ahora bien, conociendo el porcentaje relativo de cada población y el número total de células de médula ósea, pudimos cuantificar a cada una de ellas a lo largo de la anemia, lo que nos permitió obtener datos más significativos y que nos -

proporcionarán mayor información, sobre dichas poblaciones.

PORCENTAJE

Día de Sangrado	0	4	8	12	14
GRANULOCITOS	57.95 ± 1.8	49.30 ± 2.4	42.48 ± 4.3	31.78 ± 3.2	30.50 ± 1.5
MONONUCLEARES	24.42 ± 3.4	27.43 ± 3.8	16.16 ± 3.1	10.60 ± 1.6	14.86 ± 2.7
NORMOBLASTOS	17.50 ± 1.5	23.22 ± 1.4	41.38 ± 7.3	57.60 ± 1.6	54.68 ± 1.2

TABLA 2: Porcentaje relativo de cada una de las poblaciones celulares de la médula ósea de los huesos largos del conejo durante un periodo de anemia inducida por sangrado.

En el día 0, los granulocitos son los más numerosos - - (9.6×10^8 células), le siguen las mononucleares (4×10^8 células) y por último los normoblastos (3×10^8).

Los granulocitos incrementaron su número durante los primeros días del proceso de una forma más o menos constante, - llegando a un nuevo equilibrio alrededor del día 8, en el que alcanza un número aproximado de 19×10^8 células lo que representa un aumento de poco más del 100 %.

Por su parte, la población de mononucleares mostró también un ligero incremento durante los primeros 4 días del sangrado, sin embargo, debido a las desviación estandar obtenidas no podemos asegurar que dicho incremento sea significativo, lo que sí podemos decir es que existe una tendencia en esta población a aumentar ligeramente durante los primeros 4 días, a partir de los cuales se mantiene en un nuevo equilibrio.

Por último los normoblastos, que empezaron siendo los -

menos numerosos, son los que logran el mayor incremento. En los primeros días su aumento es lento, sin embargo en el día 4 su producción se incrementa de tal forma que llega en el día 8 a un valor de 18×10^8 células, y en el día 12 de 33×10^8 células, siendo este último su valor máximo en el que se mantienen; su incremento total es de poco más de 10 veces (tabla 3, fig. 7)

De hecho, el aumento en el número total de células de médula ósea entre los días 8 y 12, se debe solamente a la población eritroide, puesto que las otras dos se encuentran ya en equilibrio (figs. 6 y 7).

Día de sangrado	Nº DE CELULAS ($\times 10^8$)				
	0	4	8	12	14
GRANULOCITOS	9.64 ± 1.5	13.43 ± 0.9	19.04 ± 5.9	18.55 ± 3.0	19.20
MONONUCLEARES	4.19 ± 1.3	7.63 ± 1.9	7.20 ± 2.2	6.08 ± 0.6	7.28
NORMOBLASTOS	2.89 ± 0.3	6.31 ± 0.3	17.88 ± 3.7	33.32 ± 1.1	33.50

TABLA 3: Cuantificación de cada una de las poblaciones celulares de la médula ósea de los huesos largos del conejo durante un periodo de anemia inducida por sangrado.

II- ESTUDIO DE LAS CELULAS ERITROIDES.

Aunque el estudio de las células eritroides lo iniciamos ya con los resultados anteriores, en ellos hemos considerado a los normoblastos como una sola población, lo que, si bien es necesario, no nos permite conocer más a fondo el mecanismo eritropoyético, puesto que las células eritroides comprenden estadios de diferenciación que se van sucediendo, teniendo cada uno de ellos características particulares, por lo que para este estudio hemos decidido considerarlos como poblaciones separadas.

Comenzaremos por describir la caracterización morfológica que de ellos se hizo a lo largo del periodo de anemia. Como se mencionó con anterioridad, este análisis fue hecho a nivel de microscopía óptica y empleando la tinción de Wright.

Los estadios que se identificaron y caracterizaron en este trabajo son los que se han estudiado ampliamente sobre todo en el humano. En orden creciente de maduración dichos estadios son: pronormoblasto, normoblasto basófilo, normoblasto policromatófilo y normoblasto ortocromático. Nos referiremos en primer lugar a la caracterización hecha en conejos normales, sacrificados en el día 0.

a) Pronormoblasto. Es una célula grande prácticamente circular, cuyo diámetro es de 16 a 17 μ . Su citoplasma es de color azul, ocupando entre el 30 y el 40% de la superficie total de la célula. El núcleo es circular, con posición más o menos central, representando entre el 60 y el 70% del área celular. La cromatina es granulosa con algunas porciones más claras que otras; su color es morado claro.

b) Normoblasto basófilo. Esta célula es también circular, pero de menor diámetro (15 μ). Su citoplasma es de color azul intenso, siendo un poco más abundante.

te que en el pronormoblasto. El núcleo es excéntrico y circular. La cromatina presenta una granulación fina y es de color rosado.

c) Normoblasto policromatófilo. Esta es la célula que mayor variedad morfológica presenta, su forma es circular, sin embargo, su diámetro varía de 11 a 13.2 μ . El citoplasma, de color azul claro o grisáceo, ocupa alrededor del 60% del área total. El núcleo es circular, excéntrico y más compacto que en los estadios anteriores. La cromatina presenta gránulos grandes y es de color morado.

d) Normoblasto ortocromático. Es la célula de menor tamaño (9.6 μ). Su forma es ovalada; el citoplasma es muy abundante y de color grisáceo. El núcleo es circular, totalmente excéntrico y muy compacto.

Imágenes representativas de los estadios anteriores se presentan en la figura 8.

La caracterización hecha en este estudio demuestra que la morfología de las células eritroides del conejo es prácticamente igual a la del humano, sin embargo, el diámetro de estas últimas es mayor en cada estadio. Al hacer la caracterización morfológica de los precursores a lo largo de la anemia observamos un incremento en el diámetro celular de los cuatro estadios (tabla 4, fig. 9).

El incremento observado en el diámetro de estas células, fue más marcado en la población de pronormoblastos, en los que de hecho es estadísticamente significativo. Con respecto a las otras tres poblaciones, aunque no podemos asegurar que dicho incremento es significativo debido a las desviaciones estándar, podemos ver que existe la tendencia hacia el aumento en el diámetro. Posiblemente ampliando el tamaño de la muestra en estudio podríamos obtener resultados más concluyentes.

DIAMETRO (μ)Día de
Sangrado

0

4

8

12

14

PRONORMO BLASTO (PN)	16.50 \pm 0.5	18.98 \pm 2.0	21.2 \pm 1.1	20.78 \pm 1.8	18.8 \pm 0.5
N.BASOFI LO (NB)	14.98 \pm 0.5	17.18 \pm 2.0	16.98 \pm 1.8	16.80 \pm 1.4	15.8 \pm 0.7
N.POLICRO MATOFILO (NP)	12.08 \pm 1.2	12.60 \pm 0.9	13.13 \pm 1.4	13.08 \pm 1.5	13.0 \pm 1.3
N.ORTOCRO MATICO (NO)	9.67 \pm 0.5	11.13 \pm 1.1	11.37 \pm 1.3	11.62 \pm 1.1	11.2 \pm 1.4

TABLA 4: Diámetro (en μ) de las células eritroides reconocibles morfológicamente, presentes en la médula ósea de los huesos largos del conejo a lo largo de una - anemia inducida por sangrado.

tes.

De los resultados anteriores se desprenden dos hechos -- que me parecen interesantes. En primer lugar, el incremento en el diámetro celular de los precursores eritroides nucleados implicaría también un aumento en el tamaño de las células no nucleadas, esto es, reticulocitos y eritrocitos, lo cual se ha demostrado ya en trabajos anteriores (65). En segundo lugar, el que los pronormoblastos incrementen su diámetro en forma marcada y aparentemente inmediata, nos estaría diciendo que el estímulo del sangrado es recibido desde, por lo menos una población anterior, no identificable morfológicamente y que da origen a los pronormoblastos modificados.

Una vez caracterizados los precursores eritroides, éstos fueron sujetos a un análisis cinético durante el periodo de anemia, con el fin de conocer el comportamiento de cada uno de los estadios.

Primero hablaremos sobre el porcentaje relativo de cada población, el cual se obtuvo por medio de conteos diferenciales, considerando al total de normoblastos como el 100%.

En el día 0, los n. policromatófilos, representaron alrededor del 63%, los ortocromáticos el 25%, los basófilos el 9% y los pronormoblastos el 3%. De estos resultados surge una pregunta interesante: ¿Por qué si los normoblastos ortocromáticos son el estadio final de diferenciación dentro de la serie de normoblastos y se llega a ellos a través de divisiones mitóticas no son los más abundantes en la médula ósea?; existen dos hechos que en conjunto podrían dar respuesta a esta pregunta. Algunos autores como Lessin y Bessis (10) proponen que los n. policromatófilos incluyen más de un estadio de diferenciación, lo que ellos llaman n. policromatófilo temprano y tardío, cuyas diferencias morfológicas no son muy considerables, siendo difícil separarlas en diferentes poblaciones, --

aunque en realidad lo son. Por otro lado, estos mismos autores y Erslev (48) sugieren que una vez formado el n. ortocromático, su paso a reticulocito es sumamente rápido, puesto -- que no ocurre ya ninguna división celular, sino solo la expul sión del núcleo, proceso que aparentemente lleva menos tiempo y requiere menor preparación por parte de la célula.

Ahora bien, comparando los resultados de este trabajo en conejos no anémicos con los reportados por otros autores por estudios hechos en humanos normales, encontramos las siguientes relaciones:

	ESTE TRABAJO	OSGOOD AND SEAMAN (69)	BERMAN et.al. (70)	GLASER,et.al. (71)
Pronormoblastos	3.5%	1.8%	3%	2.2%
N. Basófilos	8.9%	17.8%	10%	7.4%
N. Policromatófilos	63.7%	53.6%	86%	78.6%
N. Ortocromáticos	24.8%	26,8%	1%	11.8%

TABLA 5: Comparación entre los porcentajes relativos obtenidos en este trabajo de cada una de las poblaciones eritroides presentes en la médula ósea del conejo normal y los reportados por otros autores para humanos normales.

Al obtener el porcentaje de cada estadio a lo largo de la anemia, encontramos que éstos se mantuvieron prácticamente constantes (tabla 6, fig. 10), lo que implica que el incremento total de la población de normoblastos durante todo el proceso, es dado por un incremento paralelo de cada uno de los estadios.

Día de Sangrado	PORCENTAJE				
	0	4	8	12	14
PRONORMOBLASTO	3.54 ± 1.2	4.6 ± 3.6	2.27 ± 0.4	2.39 ± 0.7	2.91 ± 0.5
N.BASOFILO	8.85 ± 1.7	6.7 ± 2.5	13.22 ± 0.9	11.26 ± 0.9	10.97 ± 1.3
N.POLICROMATOFILO	62.76 ± 3.9	61.6 ± 11	60.51 ± 2.7	58.10 ± 2.1	59.00 ± 2.1
N.ORTOCROMATICO	24.80 ± 3.4	27.0 ± 5	23.98 ± 2.7	28.32 ± 2.3	27.14 ± 3.0

TABLA 6: Porcentaje relativo de los estadios eritroides presentes en la médula ósea de los huesos largos del conejo durante un proceso de anemia inducida por sangrado.

La relación cuantitativa de cada estadio, se observa en la tabla 7 y fig. 11. Los pronormoblastos mostraron el incremento menos marcado de los cuatro estadios, aumentando su número 8 veces desde el día 0 al equilibrio. Las otras tres poblaciones iniciaron su incremento de una forma lenta hasta el día 4, en el que su número se disparó. Los N. basófilos incrementaron su población alrededor de 16 veces, los policromatófilos lo hicieron cerca de 11 veces y los ortocromáticos - unas 12 veces. Esto nos da un incremento de 11 veces en la población total eritroide (fig. 7)

Día de Sangrado	Nº DE CELULAS ($\times 10^{-8}$)				
	0	4	8	12	14
PRONORMO BLASTO	0.10 \pm 0.0	0.28 \pm 0.2	0.39 \pm 0.1	0.79 \pm 0.2	0.82
N.BASOFI LO	0.24 \pm 0.0	0.41 \pm 0.1	2.34 \pm 0.4	3.75 \pm 0.4	4.14
N.POLICRO MATOFILO	1.82 \pm 0.3	3.93 \pm 0.9	10.78 \pm 2.2	19.36 \pm 1.4	20.47
N.ORTOCRO MATICO	0.70 \pm 0.0	1.69 \pm 0.2	4.35 \pm 1.2	9.41 \pm 0.4	8.10

T A B L A 7; Cuantificación de cada una de las poblaciones eritroides reconocibles morfológicamente presentes en la médula ósea de los huesos largos del conejo durante un proceso de anemia inducida por sangrado.

La cinética que muestran las células eritroides a lo largo del proceso, vista de una forma integral, muestra una correlación interesante al compararla con la cinética que siguen los reticulocitos en la circulación (fig. 4) obtenida en trabajos anteriores. En ésta se ve que durante los primeros cuatro días de sangrado el incremento en el número de reticulocitos en circulación es pequeño, aumentando en forma significativa a partir del día 4 hasta el día 11, en el que llegan a un nuevo equilibrio. En las figuras 7 y 11 se observa que la población eritroide responde al sangrado lentamente en un principio y que es alrededor del día 4 en el que se acelera su producción, correspondiendo este hecho a la etapa de mayor incremento en el número de reticulocitos en circulación. El equilibrio observado en sangre es entonces reflejo del - -

equilibrio alcanzado en la producción de células eritroides - en la médula ósea.

III ESTUDIO MORFOLOGICO DE LOS RETICULOCITOS

Al realizar la caracterización morfológica de las células eritroides nucleadas (normoblastos) a lo largo de la anemia, observamos un incremento del diámetro celular en los cuatro estadio. Este hecho, nos llevó a estudiar morfológicamente a los reticulocitos presentes en las preparaciones de médula ósea.

Debido a que los reticulocitos presentan una morfología relativamente simple, fijamos nuestra atención a su diámetro celular, encontrando que, como los precursores nucleados, mostraron un incremento considerable en él durante el proceso de anemia (tabla 8). Ya para el día 4 su diámetro había aumentado 2 y prácticamente es en este día en el que llegan al equilibrio.

Día de Sangrado	D I A M E T R O (μ)				
	0	4	8	12	14
RETICULOCITOS	8.09 ± 0.8	10.2 ± 0.9	10.61 ± 1.3	10.57 ± 1.7	10.69 ± 1.8

TABLA 8: Diámetro de los reticulocitos encontrados en la médula ósea de los huesos largos del conejo durante un proceso de anemia inducida por sangrado.

Como se puede ver en la tabla 8, el diámetro celular de los reticulocitos fué siempre ligeramente menor al de los N.-ortocromáticos, lo cual era de esperarse considerando el mode

lo clásico de la eritropoyesis (fig. 3). Sin embargo, a partir del día 4 encontramos ciertos reticulocitos cuyo tamaño era extremadamente grande, a los que llamamos megareticulocitos. Decidimos entonces considerarlos como una población independiente y estudiar sus características, las cuales se pueden resumir en dos: son células cuyo diámetro promedio es $13.2 \pm 0.67\mu$ y que tiñen, con colorante de Wright, de manera más pálida que los reticulocitos normales. El diámetro que presentan implica que son células más grandes que los N. ortocromáticos y de tamaño comparable a los N. policromatófilos.

Al considerarlos como parte de la población de los reticulocitos normales, encontramos que en el día 4 representan entre el 5 y 6% del total; en el día 8, el 14.3%; en el día 12, el 14.6% y en el día 14 el 16%. Ya se mencionó que en el día 0 no se encontraron. Esta nueva población celular sugiere una serie de preguntas que por el momento no podemos contestar. ¿Por qué se producen bajo condiciones de anemia? ¿De qué tipo celular provienen? ¿Qué función pueden tener? En la figura 12 se muestran imágenes representativas de este tipo celular.

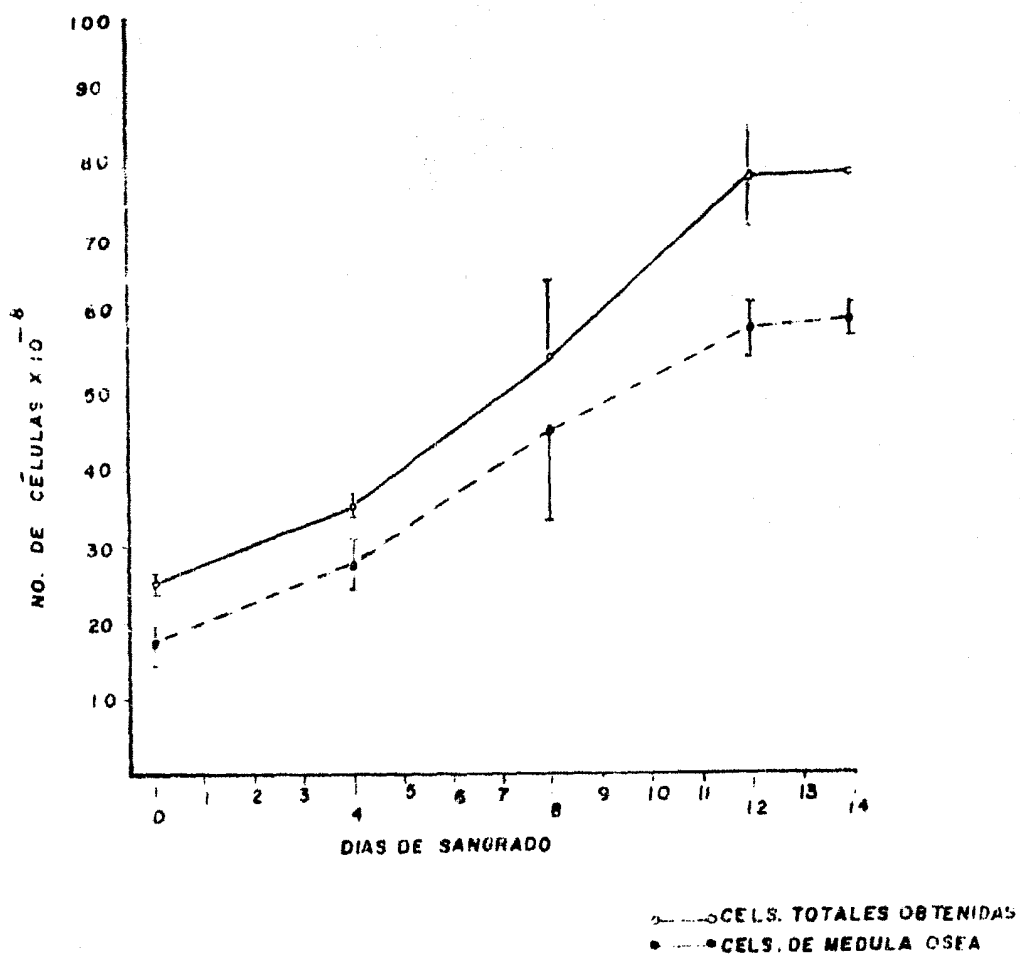


FIG. 5 Número de células ($\times 10^{-8}$) obtenidas en la extracción de la médula ósea de los huesos largos del conejo durante un proceso de anemia inducida por sangrado.

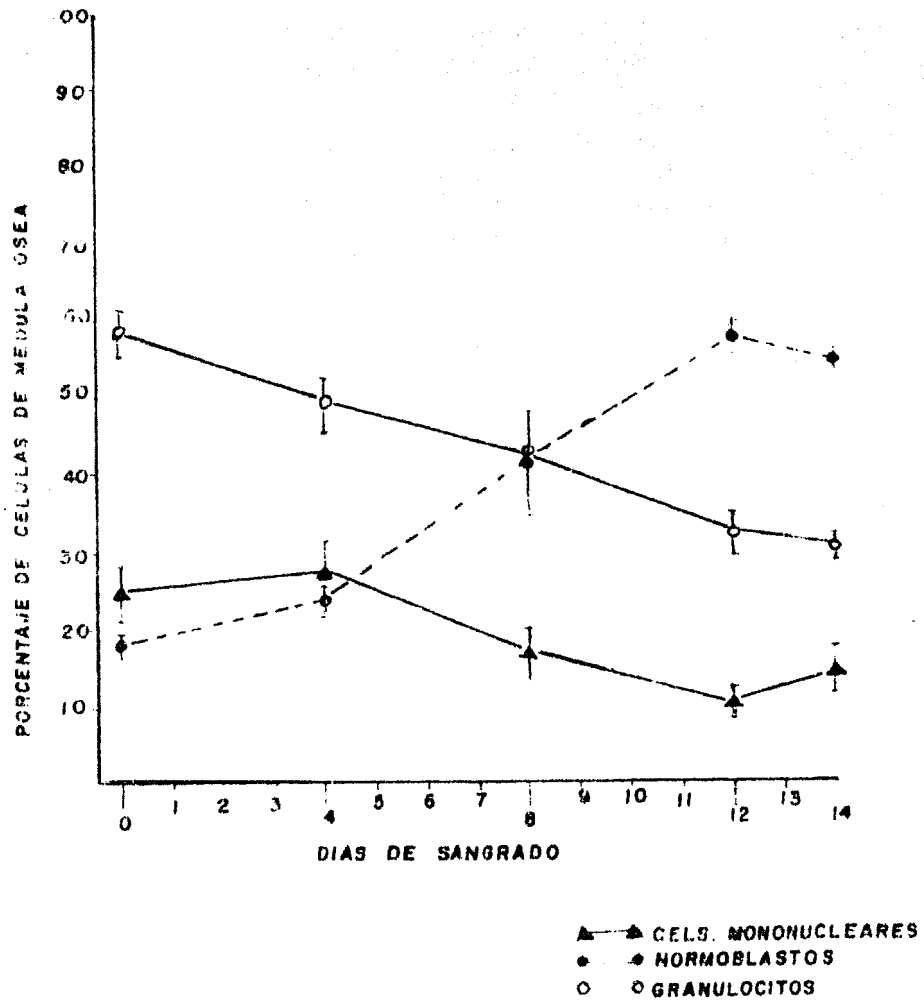


FIG. 6 Porcentaje relativo de cada una de las poblaciones celulares de la médula ósea de los huesos largos del conejo durante un periodo de anemia - inducida por sangrado.

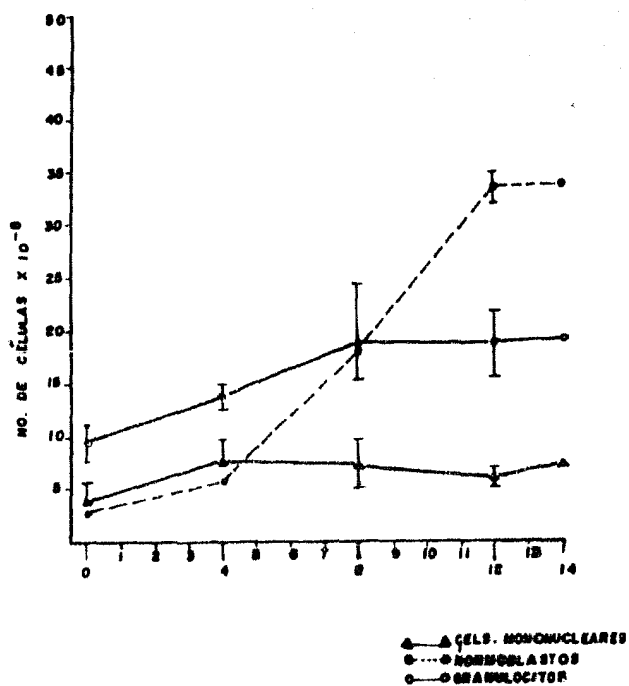
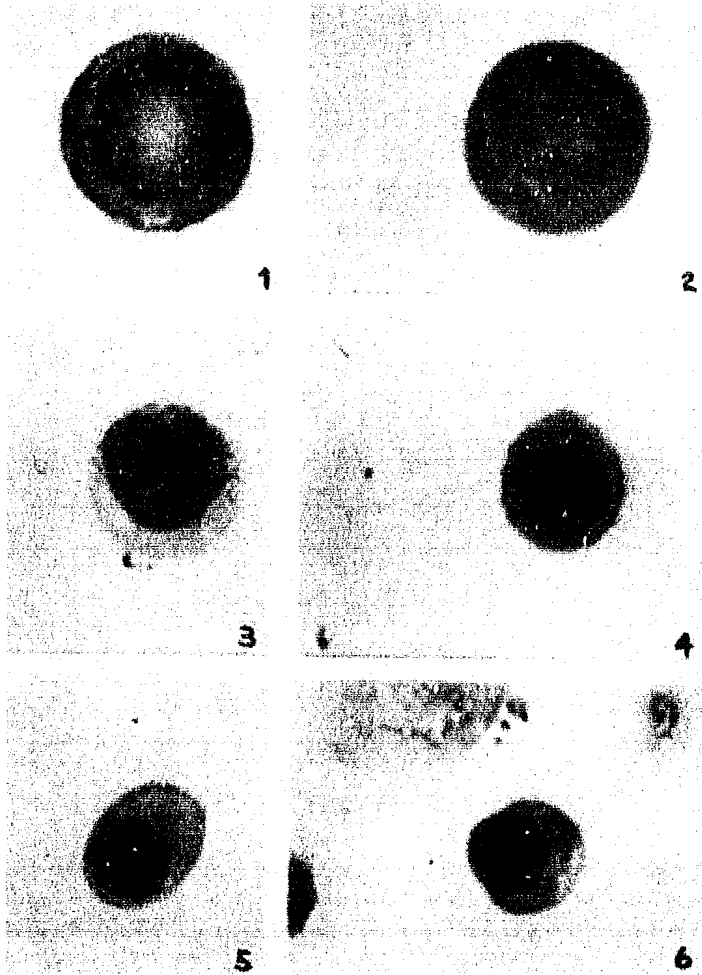


FIG. 7 Cuantificación de cada una de las poblaciones celulares de la médula ósea de los huesos largos del conejo durante un periodo de anemia inducida por sangrado.



- | | |
|-------------------------|-------------------------|
| 1. Pronormoblasto | 5. N. Ortocromático |
| 2. N. Basófilo | 6. N. Ortocromático - - |
| 3.4. N. Policromatófilo | expulsando el núcleo |

FIG. 8 Estadios reconocibles morfológicamente dentro de la secuencia eritropoyética del conejo.

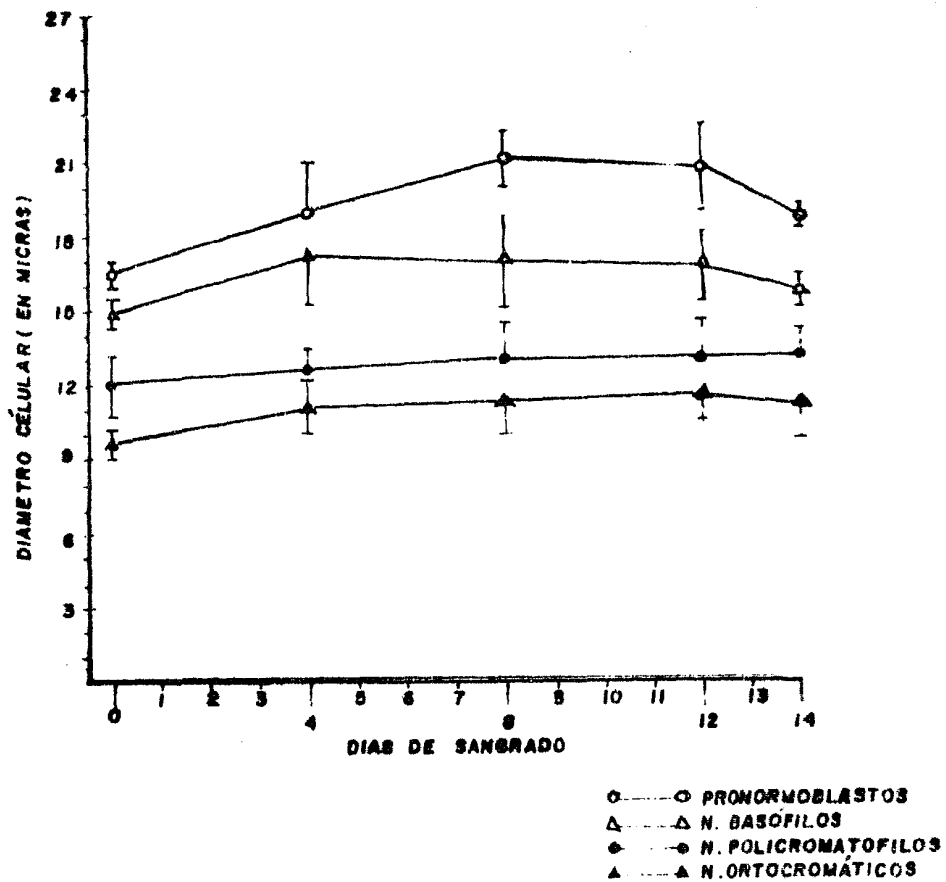


FIG. 9 Diámetro (en μ) de las células eritroides reconocibles morfológicamente, presentes en la médula ósea de los huesos largos del conejo a lo largo de una anemia inducida por sangrado.

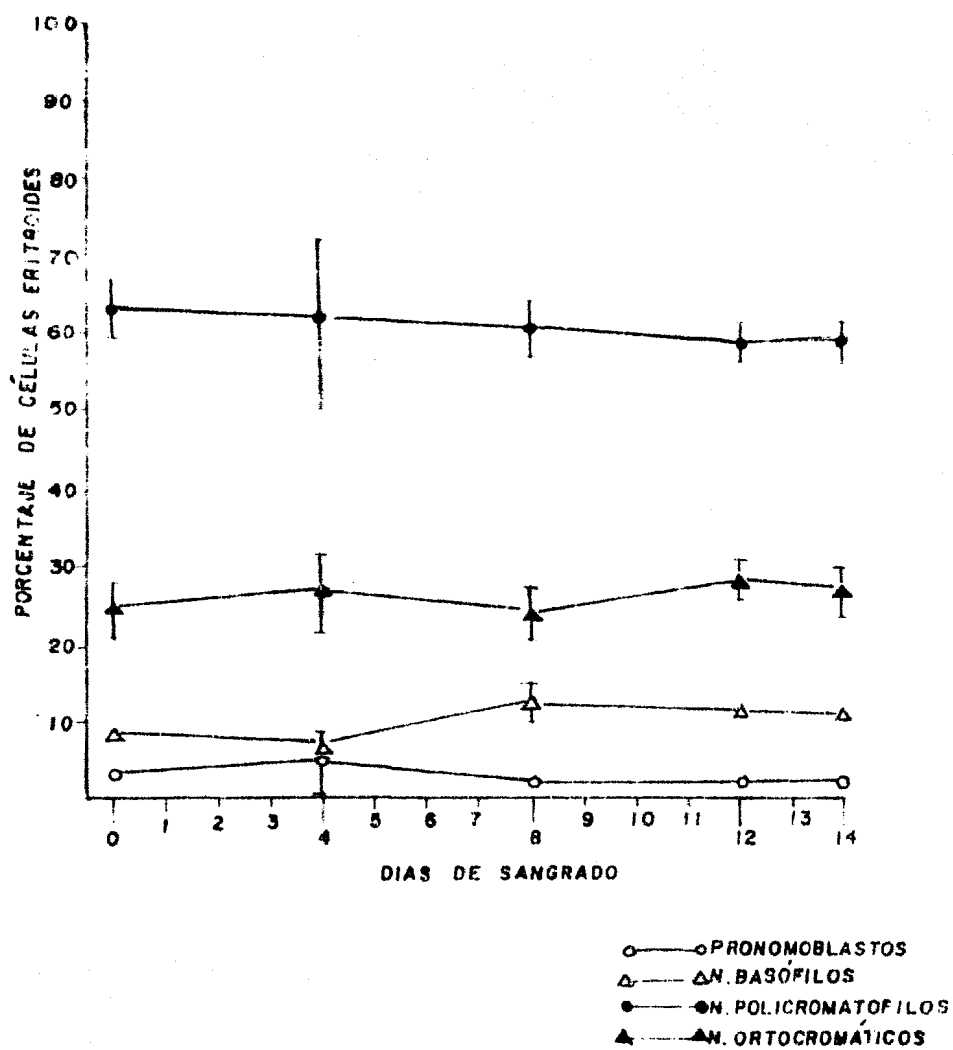


FIG. 10: Porcentaje relativo de los estadios eritroides presentes en la médula ósea de los huesos largos del conejo durante un proceso de anemia inducida por sangrado.

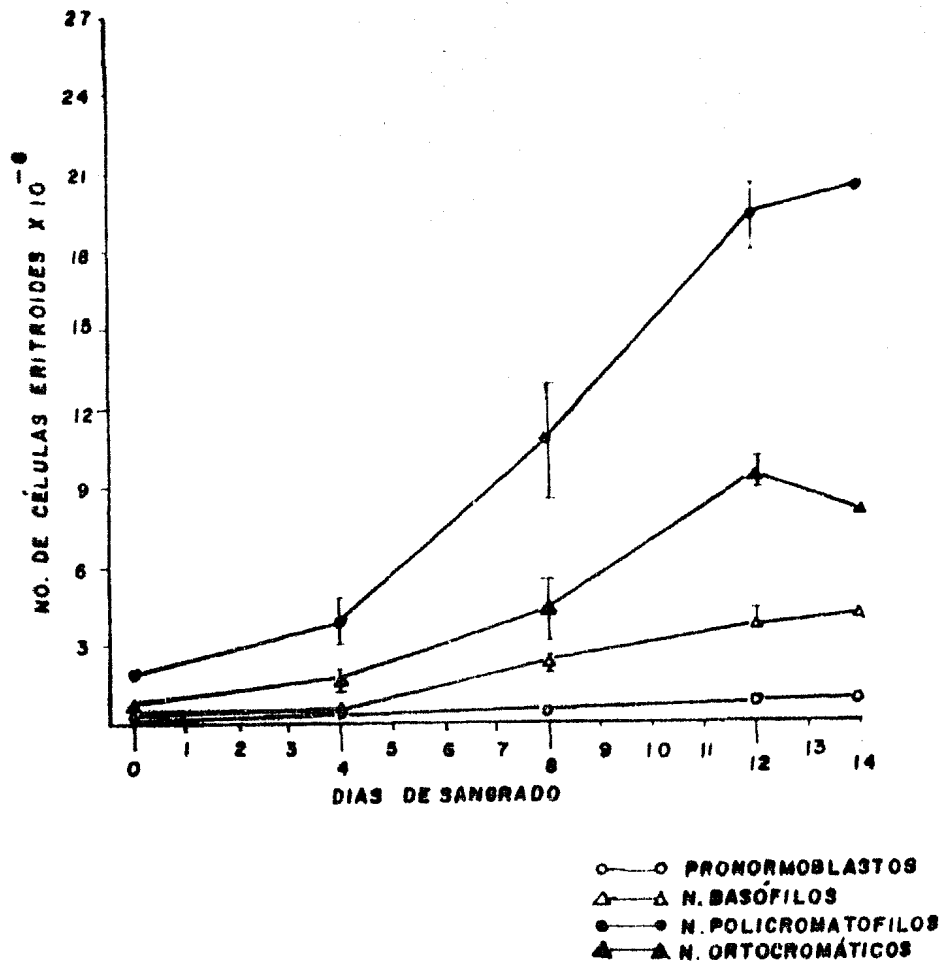


FIG. 11 Cuantificación de cada una de las poblaciones eritroides reconocibles morfológicamente presentes en la médula ósea de los huesos largos del conejo durante un proceso de anemia inducida por sangrado.



FIG. 12 A: Megareticulocito junto a tres normoblastos.



FIG. 12 B: Reticulocitos de la médula ósea de los huesos largos de conejo anémico

1. Megareticulocito
2. Reticulocito
3. Normoblasto

DISCUSION

Antes de iniciar propiamente la discusión de los resultados del presente trabajo, quisiera replantear muy brevemente el panorama general que llevó a la realización de éste.

La hematopoyesis es un conjunto de procesos complejos y finamente regulados, que mantienen la producción constante de los distintos tipos de células sanguíneas. Dentro de ella, - existe una línea particular a través de la cual tienen su origen los eritrocitos o glóbulos rojos, la llamada eritropoyesis, que aunque ha sido objeto de amplios y diversos estudios, encierra aún bastantes interrogantes. Estudios hechos anteriormente en este laboratorio, han demostrado que al inducir una anemia crónica por sangrado diario en el conejo, el mecanismo de eritropoyesis se amplifica, presentándose la máxima respuesta cuando el volumen de sangre extraído es de 9 a 12 - ml diarios por Kg de peso. Bajo estas condiciones, se observan dos hechos particulares:

a) Un aumento en la producción de células rojas, de tal forma que llega a producirse diariamente el mismo número de células que es removido de la circulación por el sangrado diario y por el sistema reticuloendotelial.

b) Un aumento en el tamaño de las células rojas circulantes (macrocitosis).

Buscando dar respuesta a estos fenómenos, emprendimos el estudio de los precursores eritroides de la médula ósea del conejo, durante un periodo de anemia inducido experimentalmente.

Durante dicho proceso observamos que a medida que éste - avanzaba, el número de células que eran extraídas de la médula ósea de los huesos largos del animal se incrementó hasta - llegar a un nuevo equilibrio. Lo anterior implica que la médula ósea roja de los huesos largos del conejo se "agrandó" - como respuesta al sangrado, esto es, el espacio destinado a - la formación de células sanguíneas se incrementa.

En 1936, Sabin (73) postuló la existencia de tres meca-- nismos posibles en el organismo adulto para incrementar el es pacio destinado a la producción de células sanguíneas: el - primero consiste en la remoción de grasa de la médula ósea en forma de gotas que sales al torrente sanguíneo, de tal manera que el espacio que deja la grasa (médula ósea amarilla) es - ocupado por la médula ósea roja. El segundo es un adelgaza-- miento del hueso, lo cual agranda la cavidad medular, y el úl timo es el uso de zonas fuera de la médula ósea, esto es, una hematopoyesis extramedular. Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la idea de que es alguno de los dos primeros - mecanismos, o incluso ambos, los que actúan durante la induc-- ción de la anemia en el conejo. Sin embargo, lo anterior no descarta la posibilidad de que durante este proceso se presente una hematopoyesis extramedular, es decir, que las células del tejido hematopoyético mieloide migren y colonicen órganos como el hígado, el bazo y otros centros linfáticos.

Los porcentajes relativos de las tres poblaciones celu-- lares presentes en la médula ósea de los huesos largos, obteni dos en este trabajo muestran una gran similitud con los reporta dos para el humano (68). El hecho de que más de 50 % del - total de células de la médula ósea (en condiciones normales) sean granulocitos plantea una pregunta importante: ¿ si las células blancas son aproximadamente el 0.1 % del total de cé-- lulas en circulación y de ellas el 60 % son granulocitos, por qué en la médula ósea este tipo celular representa más del -

50 % y los normoblastos solo alrededor del 20 % ?. Aparentemente la respuesta radica en el hecho de que el tiempo de maduración de los granulocitos es alrededor de nueve días y su vida promedio en circulación es de aproximadamente 24 horas o tal vez menos; también parece ser que existe en la médula un almacén de ellos, lo que no ocurre con las células de la línea roja, las cuales además, tienen una vida en circulación (eritrocitos) de aproximadamente 60 días en el conejo y 120 días en el humano.

Como respuesta al estímulo del sangrado diario, las tres poblaciones de la médula ósea incrementaron su número. Evidentemente la anemia inducida experimentalmente no afectó a las tres poblaciones de igual forma. La población de células mononucleares fué aparentemente la menos afectada (figura 7), presentando un ligero incremento (menos de una vez) y alcanzando su nuevo equilibrio alrededor del día 4.

La población de granulocitos tuvo un mayor incremento (alrededor del 100%) y llegó al equilibrio en el día 8, lo que implica que el sangrado afectó a dicha población más que a las células mononucleares, lo anterior guarda relación con los números reportados para cada una de estas poblaciones en la circulación en sujetos normales. Aparte de estos resultados, realmente es poco lo que podemos concluir sobre el comportamiento de estas dos poblaciones durante la anemia, puesto que no fueron analizadas de manera detallada y por su complejidad deben ser objeto de un estudio aparte.

Definitivamente la población eritroide fué la que más se vió afectada durante el proceso de anemia. Su número se incrementó once veces alcanzando el nuevo equilibrio alrededor del día 12. Debemos considerar lo anterior como lógico si tomamos en cuenta que el número de células rojas en circula--

ción es el 99.9% del total de células de la sangre.

El equilibrio que muestran los normoblastos desde el día 12, corresponde con el reportado por Valdés-López (63) y Martínez-Medellín, et. al. (65) para las células rojas en circulación, quienes encuentran que dicho equilibrio es alcanzado alrededor del día 11.

Con respecto al incremento de la población eritroide surgen dos cuestionamientos: en primer lugar, ¿ por qué la producción de células rojas presenta un aumento de cinco a seis veces en la circulación si en la médula ósea de los huesos largos el aumento es de 11 veces ?, y en segundo lugar, ¿ el equilibrio alcanzado alrededor del día 12 es debido a que el compartimiento eritroide ha llegado a su máxima respuesta, o bien, es debido a que ya no hay más espacio disponible en el interior de los huesos para la expansión de la médula ósea roja.

La primera observación implicaría que no todos los huesos del animal responden de la misma forma, esto es, que en los huesos del esqueleto axial el incremento en la eritropoyesis es mucho menor que en los huesos largos, dando como respuesta total del organismo el aumento de cinco a seis veces observado en sangre. Sería interesante el realizar estudios posteriores semejantes a éste pero considerando a cada hueso por separado.

Con respecto a la segunda pregunta, me parece que los resultados obtenidos en este trabajo no dan elementos suficientes para contestarla, por lo que habrá que esperar la realización de futuros estudios encaminados a responderla.

Las características morfológicas de las células eritroides del conejo y los porcentajes relativos de cada uno de sus estadios, mostraron gran similitud con lo reportado para humanos, siendo entonces muy probable que en ambas especies el sistema eritropoyético funcione de manera semejante, por lo -

que todos los estudios encaminados a conocer más profundamente este sistema experimental, pudieran tener, gran relevancia en un futuro en el campo de la medicina.

El análisis morfológico y cinético de las células eritroides sugiere que el estímulo del sangrado fue recibido desde alguna(s) población(es) precursora(s) de los pronormoblastos pero que no es reconocible morfológicamente. Lo anterior se basa en los siguientes hechos: Los pronormoblastos son células incapaces de autorrenovarse (42), estando totalmente programadas para la diferenciación, por lo que el aumento en su número no puede deberse a una mayor autorreplicación, sino a un incremento en el número de las células que les dan origen. Además, el aumento en su diámetro también debe ser resultado de modificaciones que ocurren a nivel de sus precursores. Por otro lado, diversas evidencias postulan que las BFU-E y las CFU-E, precursores de los pronormoblastos, son células de aspecto linfóide que se encuentran en la médula ósea, por lo tanto, estos tipos deben estar presentes dentro de la población de células que denominamos como mononucleares, las que mostraron un ligero incremento durante los primeros días, alcanzando su valor máximo alrededor del día 4, mismo día en que la población de normoblastos incrementa considerablemente su producción.

Por otro lado, el hecho en que los cuatro estadios de diferenciación eritroide se presente una marcada tendencia al aumento en el diámetro pudiera explicar el origen de la macrocitos observada en sangre. Sobre esto último, algunos autores postulan que la macrocitos producida en condiciones de anemia es resultado de un "salto" en la secuencia eritropoyética, esto es, que el normoblasto policromatófilo expulsa directamente el núcleo y se convierte en un macroreticulocito (37), sin embargo, esto implicaría que el número y porcentaje de los normoblastos ortocromáticos disminuyera considerable-

mente durante la anemia, y como puede verse en las figuras 10 y 11, su porcentaje se mantiene constante y su número aumenta. Otros trabajos (40), establecen que la macrocitosis eritroide se observa aún en formas inmaduras, lo que concuerda con nuestros resultados.

La aparición de formas megaloblásticas (megaloreticulocitos), plantea una serie de interrogantes, mencionadas ya con anterioridad, a las que no se puede dar respuesta en este trabajo, sin embargo, podríamos dejar abiertas dos posibilidades: Ocurre efectivamente un "salto" en la secuencia eritropoyética, pero que no vemos; o bien, provienen de un tipo celular - distinto, activado sólo en condiciones patológicas.

Con base en resultados aportados por la bibliografía y - los obtenidos en este trabajo, propongo a continuación un modelo que trata de explicar el mecanismo de eritropoyesis en - el conejo, bajo condiciones de anemia inducida experimentalmente:

La remoción diaria de sangre provoca que se incrementen las concentraciones de ciertos factores séricos involucrados en la eritropoyesis, específicamente la eritropoyetina (35) y la transferrina (64), esta última es la proteína que transporta hierro a las células de la línea roja para la síntesis de hemoglobina (74). Ambos actúan a nivel de las células eritroides de la médula ósea; la eritropoyetina promueve un incremento en la capacidad proliferativa y de autorrenovación - de células como las BFU-E y CFU-E, y actúa también a nivel de los precursores eritroides reconocibles morfológicamente, acelerando su maduración y diferenciación. Por su parte, la --- transferrina actúa básicamente sobre éstos últimos acelerando el suministro de hierro. De esta forma, el número de normo-- blastos y de sus precursores no identificables morfológicamente aumenta; sin embargo, dicho aumento es lento en un principio, por lo que no se puede impedir que el número de células

rojas en la circulación disminuya durante los primeros días - del sangrado (65). Alrededor del día 4, las BFU-E y las CFU-E alcanzan su máximo aumento y los normoblastos disparan su producción, lo que se ve reflejado en la sangre con una etapa de recuperación que se inicia alrededor del día 5. En todo este proceso, la producción de células rojas sigue la misma secuencia que en condiciones normales, pero ahora se encuentra muy acelerada y las células que se forman son de mayor tamaño, -- producto de alteraciones sufridas a nivel de BFU-E y/o CFU-E. Entre los días 10 y 12 de sangrado, la población de normoblastos alcanza su máximo incremento y permanece en una nueva etapa de equilibrio, lo que se observa en sangre a partir del - día 11. Ahora bien, no en todos los huesos del animal la respuesta es la misma, son los huesos largos los que muestran -- una actividad eritropoyética más alta (17), incrementándose la población de normoblastos poco más de 10 veces. Los hue--sos del esqueleto axial probablemente responden en mucho menor proporción de tal forma que el incremento total del sistema eritropoyético es alrededor de 5 veces.

Evidentemente hay muchos aspectos que este modelo, por - demás simple, no explica, como es el caso de la aparición de los megaloreticulocitos, sin embargo, el modelo propuesto es resultado del trabajo realizado y éste no es más que el ini--cio de una serie de estudios encaminados a conocer de manera profundo los factores bioquímicos y celulares involucrados en la producción de la sangre, trabajando a nivel de la médula ósea. Será necesario en un futuro, la purificación de las células eritroides; el estudiar de manera independiente a cada uno de los huesos del animal durante la anemia; el investigar si existe o no hematopoyesis extramedular; buscar a las células madre hematopoyéticas; emplear elementos radioactivos, como el Fe, que permitan obtener información sobre vías metabólicas en la médula ósea; en fin, estamos abriendo apenas una

de las muchas puertas que aún permanecen cerradas dentro del estudio de la formación de la sangre.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, - en el que empleamos como sistema experimental al conejo, podemos concluir lo siguiente:

- Como respuesta al sangrado diario se incrementa la producción de células sanguíneas en la médula ósea de los huesos largos del animal, siendo la población de normoblastos la que responde en forma más marcada; aumenta su número alrededor de 11 veces, alcanzando un nuevo equilibrio aproximadamente en el día 12 de sangrado, en el que representa un 55% del total de células de la médula ósea.

- Aunque la población total de normoblastos incrementó su número en forma considerable, cada una de las subpoblaciones eritroides mantuvo prácticamente constante su porcentaje relativo, lo que indica que no existen saltos en la secuencia eritropoyética en condiciones de anemia.

- Durante el proceso de anemia, todos los estadios eritroides mostraron una marcada tendencia a incrementar su diámetro, hecho que podría explicar la macrocitosis observada en las células rojas circulantes.

- El incremento en el número y en el diámetro celular de los pronormoblastos, implicaría que el estímulo del sangrado es recibido desde, por lo menos, una población anterior no identificable morfológicamente.

- A partir del día 4 de sangrado encontramos un tipo celular de gran tamaño, al que llamamos megareticulócito. Su aparición plantea una nueva serie de interrogantes.

APENDICE

1) Solución salina G-BSA (1000 ml)

a) Solución salina G-10x (100 ml)

NaCl 8 g

KCl 0.4 g

Na₂HPO₄ 0.154g

MgSO₄ -7H₂O 0.154g

Glucosa 1.10g

KH₂PO₄ 0.15g

Ajustar a pH=7 y aforar a 100 ml.

b) BSA 0.5% en solución salina fisiológica.

c) 100 ml BSA 0.5%

90 ml Solución salina G-10x

Aforar a 1000 ml con agua destilada.

2) Isotón (1000 ml).

NaCl 7.9g

EDTA 0.38 g

KCl 0.40 g

NaH₂PO₄ 0.19 g

Na₂HPO₄ 1.95 g

BIBLIOGRAFIA

1. Leeson; Leeson. (1977) *Histología*. 3a. ed. Ed. Interamericana. México
2. Perutz, M.F. (1978) Sci Am Dec. 239 (6): 92
3. Mac Clean N. (1979) *Hemoglobina*. Ed. Omega Barcelona España.
4. Hillman, R.; Finch, G. (1974). *Red Cell Manual*. 4th. ed. F.A. Davis Company.
5. Rifkind, R et.al. (1974) *En Red Blood Cell*. I. 2nd. Ed. - Academic Press Inc. USA
6. Beutler, E; Srivastava, S. (1972) *En "Hematology"* Williams, J. et.al. McGraw--Hill Company. N.Y. p.94
7. Asimov, I. (1972) *Introducción a la Ciencia*. Ed. Plaza and Janes. España
8. Greene, J. (1965) *100 grandes científicos*. 1a. ed. Ed.- Diana. México, D.F.
9. Yoshikawa, H. and Rapoport, S. (1974) *Cellular and Molecular Biology of Erythrocytes*. University Park Press. Tokio
10. Lessin, L.; Bessis, M. (1972) *En "Hematology"*. Williams J. et.al. Mc.Graw-Hill Company. N.Y. p. 62
11. Gordon A. (1976). *Fisiología de las células sanguíneas*. C.E.C.S.A. México
12. Boggs, D.; Winkelstein, A. (1975) *White Cell Manual*. 3rd. ed. F. A. Davis Company.
13. Orfanakis, et. al. (1970) Am. J. Clin. Path. 53:647
14. Harker, L. (1974) *Hemostasis Manual*. 2nd. Ed. F.A. Davis Company.
15. Metcalf, D; Moore, M. (1971) *Haemopoietic cells*. North-Holland Publishing Company. Amsterdam.
16. Krause, W.; Cutts, J.H. (1981) *Concise text of Histology* Williams and Wilkins. Baltimore, U.S.A. p.92

17. Wintrobe, M. (1962) Clinical Hematology. Lea and Febiger 5th. ed. Philadelphia.
18. Maximow. (1924). Physiol. Rev. 4(4): 533
19. Moore, M; Metcalf, D. (1970) Brit. J. Haemat 18:279
20. Nessi, Bozzini (1979). J. Embryol. exp. Morph 52:13
21. Ham. A. (1975) Tratado de Histología. Ed. Interamericana México. p. 279
22. Van Dyke, D. et.al.; (1972) En "Hematology" Williams, J.- et.al. McGraw-Hill Co. N.Y. p.37
23. Mc.Culloch, E; Till, J. (1962). Rad. Res. 16:822
24. Lewis, J.; Trobaugh, F. (1964) Nature. 204(4958):589
25. Becker, A.; McCulloch, E.; Till, J.E. (1963) Nature. 197 (4866):452
26. Boggs, D. et.al. (1982). J. Clin Invest. 70:242
27. Turner, R. et.al. (1967) J. Cell. Physiol. 69:73
28. Fowler. A. et.al. (1967) J. Cell. Physiol. 69:65
29. Abramson, s.et.al. (1977) J. Exp. Med. 145:1567
30. Quesenberry, M.D.; Levitt, L. (1979) N. Engl. J. Med. - 301(14):755
31. Curry, J.et.al. (1967) J. Exp. Med. 125:703
32. Chervenick, P.; Boggs, D. (1971). Blood 37(5):568
33. Quesenberry, M.D.: Levitt, L. (1979). N. Engl. J. Med. 301(15):819
34. Cline, M.; Golde, D. (1979) Nature 277:177
35. Erslev, M. (1953) Blood
36. Jacobson, et.al. (1957) Nature 179:633
37. Harris, J. and Kellermeyer, R (1970) The Red Cell Harvard University Press U.S.A.
38. Sheeler, P. and Bianchi, D. (1980) Cell Biology. John - Wiley and Sons. usa
39. Allexanian, R (1966) Blood 28:344
40. Paul J. (1976) Br. Med. Bull. 32(3):277
41. Schooley, J. (1966) J. Cell Physiol. 68:249
42. O'Grady, L.et.al. (1968) J. Lab. Clin. Med. 71(4):693
43. Bruce, W.; McCulloch, E. (1964). Blood. 23(2):216

44. O' Grady, L.; Lewis, J. (1970) J. Lab. Clin. Med. 76 (3): 445
45. McLeod, Shreeve and Axelrad. (1974) Blood 44:517
46. Heath, Axelrad, McLeod and Shreeve. (1976) Blood. 47 (5): 777
47. Nienhuis and Benz. (1977) N. Engl. J. Med. 297(26):1318
48. Erslev, A. (1972) en Hematology. Williams, J. et. al. McGraw-Hill Co. N.Y. U.S.A.
49. Harrison, P.(1974a) J. Cell. Biol. 63:402
50. Skutelsky and Danon (1967) J. Cell.Biol. 33:625
51. Tavassoli and Crosby (1973) Science 179:912
52. Mainero del Paso, A. (1982) Tesis de Maestría. Fac. de Química.
53. Simpson and Kling (1967) J. Cell. Biol. 35:237
54. Rifkind, Danon and Marks (1964) J. Cell. Biol. 22:599
55. Sandoz.(1952) Atlas of Hematology
56. Simpson and Kling (1968) J. Cell. Biol. 36:103
57. Lowy, B. et. al. (1972) en Hematology. Williams J. etial. Mc Grow- Hill Co. N. Y. p. 100
58. Denton, M.J. and Arnstein, H. (1973) Brit. J. Haemat. 24:7
59. Chui, et. al. (1971) J. Cell. Biol. 51:585
60. Peschle, C. (1980) Ann. Rev. Med. 31:303
61. Pavlov, A. (1969) BBA 195:156
62. Glass, J. et. al. (1975) J. Cell. Biol. 65:298
63. Valdés-López V. (1977) Tesis Profesional Fac. de Ciencias UNAM.
64. Pulido, G. (1982) Tesis Profesional Fac. de Ciencias UNAM
65. Martínez- Medellín, J. et. al. (1982) en Biochemistry and Physiology of Iron. Paul Saltman and Jack Hegenauer eds Elsevier North Holland Inc.
66. Williams W. J. (1972) en Hematology. Williams W. J. et. al. Mc Grow-Hill Co. N.Y.
67. Nuñez, M. et. al. (1977) Brit. J. of Haemat. 36:519

68. Craddock, C. (1972) en Hematology. Williams A. J. et. al. Mc Grow- Hill Co. N.Y.p. 607
69. Osgood and Seaman (1944) Physiol. Rev. 24:46
70. Berman, et. al. (1949) Blood 4:511
71. Williams, J. (1972) en Hematology. Williams J. et. al. Mc Grow- Hill Co. N. Y. p. 23
72. Bonanow-Tzedaki et. al. (1981) 10:267
73. Sabin, F. R. et. al. (1936) J. Exp. Med. 64:97
74. Egyed, A. (1982) en The Biochemistry and Physiology of Iron. Paul Saltman and Jack Hegenauer eds. Elsevier-North Holland, Inc. p. 103