

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

CITOGENESIS SANGUINEA

MONOGRAFIA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA

LINA TERESA ROMERO GUZMAN

MEXICO, D. F.

1981



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MIS PADRES.

MANUEL ROMERO C. y
SOLEDAD GUZMAN DE R.

Que con su amor, esfuerzo y
dedicación han guiado mi vi
da.

CON CARÍNO.

A MI HERMANITA ANA MARIA

A MIS ABUELITAS TERE Y LOLITA

A LA MEMORIA DE MI ABUELITO LUIS

A MI ESPOSO JOSE ANTONIO.

A MI HIJITA LINA ARUMI.

MI GRATITUD A LA Q.F.B.
JOSEFA PIEDRAS ROSS POR
SU ASESORIA EN LA ELABORACION
DEL PRESENTE TRABAJO.

CON RESPETO Y ADMIRACION AL
DR. ROGELIO PAREDES A.
POR SU CONSEJO Y ALIENTO.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE PROF.: JOEL TEJEDA VELASCO
VOCAL PROF.: JOSEFA PIEDRAS ROSS
SECRETARIO PROF.: LUIS ABREU HERNANDEZ.
1er. SUPLENTE PROF.: JOSE LUIS DOMINGUEZ TORIX.
2do. SUPLENTE PROF.: RAUI NIETO CAMACHO.

Sitio donde se desarrolló el tema:

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA DIF.

Laboratorio de Hematología.

SUSTENTANTE:

LINA TERESA ROMERO GUZMAN

Lina T. Romero G.

ASESOR:

Q.F.B. JOSEFA PIEDRAS ROSS

Josefa Piedras

I N D I C E.

I N D I C E

	PAG.
I.- INTRODUCCION	1
II.- OBJETIVO	5
III.- El Ciclo de la Célula	7
IV.- Hematopoyesis en el feto	15
V.- El Microambiente hematopoyético	21
VI.- Células Tronculares Hematopoyéticas	25
Célula Troncular Pluripotente CFU-S	28
Progenitores comprometidos para Granulopoye- sis CFU-C	30
Progenitores comprometidos para Eritropoye- sis BFU-E y CFU-E	33
Progenitores comprometidos para Macrocariopo- yesis	35
VII.- Métodos de cultivo de células	37
1.- Técnica para la producción de nódulos -- clonales hematopoyéticos	38
2.- Crecimiento de colonias de médula ósea - en medio semisólido	39
3.- Crecimiento de colonias eritroides en -- agar semisólido	49

	PAG.
VIII.- Aspectos Morfológicos de las Células Sanguíneas	52
IX.- Aplicaciones Clínicas de las técnicas de cultivo de células hematopoyéticas in-vitro ...	61
X.- Resumen.....	70
XI.- Bibliografía	73

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

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

Si todas las diferentes poblaciones celulares en el organismo humano se renovarían continuamente, los órganos tendrían funciones normales y su huésped viviría por siempre. Si bien, este estado podría producir dificultades, también por otra parte resolvería muchos problemas biológicos que ocurren como consecuencia de la falta de renovación de ciertas poblaciones celulares.

No obstante, la gran mayoría de los tejidos del cuerpo mantienen su estructura y función a lo largo de la vida del individuo y lo hacen debido a la producción de células en aquel tejido que necesita reemplazar las pérdidas por senectud o lesión. En los tejidos de rápido recambio como son la sangre y el epitelio de varios sitios en particular, la producción celular es verdaderamente maravillosa, por ejemplo: en un hombre de 70 Kg., son producidos aproximadamente 2×10^{11} eritrocitos nuevos cada día y la producción es detenida solo por la muerte del individuo y no por fallas de la hematopoyesis.

Las células sanguíneas: eritrocitos, neutrófilos,---

linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos y plaquetas se--
están perdiendo constantemente y así para mantener la homeostas
sis, cada sistema debe tener la capacidad de auto-renovación.-
Como en todos los sistemas de renovación de células de mamífe-
ros, la proliferación se lleva a cabo mediante división celu-
lar. Así en estos sistemas, renovación involucra división de--
células inmaduras seguida de diferenciación (maduración).

Esto, implica la existencia de una fuente desde la --
cual se mantiene la producción de "stems", que significa: célul
las cepa, troncular, madre, mesenquimatosas, estaminales y célu--
la tronco. Únicamente células engendran células y por lo tan--
to, el origen de éstas, en tejidos renovados, completamente difi
ferenciados, deben ser copiadas de las células tronculares de--
ese tejido.

Una célula troncular se puede definir como aquélla -
de la cual la progenie (células hijas) de la división celular--
son células idénticas en apariencia y potencial al de la célu-
la troncular que le dió origen. Un sistema de células troncu--
lares deben renovar compartimientos de células maduras que ya--
no se dividen y que también deben ser capaces de diferenciar--
se. Así, las características requeridas de la célula troncular
hematopoyética son auto-renovación y diferenciación.

La producción de células hematopoyéticas en adultos-

normales se limita a la médula ósea y al sistema linfático. La médula ósea activa en hematopoyesis se encuentra en: vértebras, costillas, esternón, pélvis, escápulas, cráneo y los extremos-proximales del húmero y fémur. La cavidad medular de los huesos restantes está llena de grasa. En los recién nacidos y en los niños la hematopoyesis activa se lleva a cabo además de -- los huesos mencionados, en las porciones distales de las extremidades. Por estudios de autopsia, se ha calculado que el peso aproximado del tejido medular en adultos es de 3.4 a 5.9% del peso corporal, o sea, 1600 a 3700 g.

II. O B J E T I V O.

II.- O B J E T I V O.

Dentro del estudio de la Hematología, se encuentra el tema denominado "Citogénesis Sanguínea", que significa producción u origen de las células de la sangre de acuerdo a las siguientes raíces griegas y latinas:

"cito" (griega): cavidad o celda. •

"celda" o "cellula" (latina): célula.

"génesis": origen, producción.

"sanguinis": Humor que circula por los vasos del cuerpo de animales vertebrados que se compone de una parte líquida y una sólida, constituida por corpúsculos de tres clases: eritrocitos, leucocitos y plaquetas.

Sobre dicho tema está basado el presente trabajo y su objetivo principal es el de contribuir a la explicación teórica de los conocimientos que hasta la fecha se tienen.

III.- EL CICLO DE LA CELULA.

III.- EL CICLO DE LA CELULA

En el hombre y en los animales los tejidos y órganos se desarrollan, crecen, diferencian, funcionan y continúan integrados mediante la división celular organizada.

El desarrollo de métodos precisos que permiten el estudio de los detalles de duplicación celular in vivo comenzó en 1950, cuando Doniach y Pele (1), introdujeron la auto-radiografía como un instrumento biológico. Más tarde Howard y Pele (2), usando fósforo radioactivo (^{32}P), aplicaron la técnica -- del precursor marcado, combinada con auto-radiografía para la investigación de la cinética de división celular.

El ciclo celular es un término usado para describir el intervalo entre una mitosis y la siguiente en una o ambas células hijas.

Howard y Pele, dividieron el ciclo celular dentro de cuatro períodos metabólicos:

M: Mitosis. Fase durante la cual ocurren cariocinesis y citocinesis. Se trata del subciclo más fácilmente identificable como "marcador de fase".

Después de la mitosis, una o ambas células hijas pueden dividirse activamente o pasar a ser células postmitóticas-permanentes, o regresar a un estado de reposo proliferativo -- temporal (Go).

G₁: Período de reposo presintético postmitótico. Es el intervalo entre el final de la mitosis y el inicio de la biosíntesis de DNA. En este período la célula elabora las diferentes sustancias con las cuales va a ser capaz de llevar a cabo las funciones del tipo de célula destinada a ser (3). Durante G₁ la célula también se prepara para iniciar la duplicación de su DNA nuclear.

S: Período durante el cual se produce la duplicación de DNA como pre-requisito para la división celular. Su duración (tiempo de síntesis de DNA) se extiende desde el comienzo de la duplicación de DNA en el primer cromosoma en síntesis, hasta el fin de la duplicación en el último de ellos (4). Durante esta fase, las células incorporan precursores de DNA específico. Por lo tanto, este componente de subciclo se convierte en un "marcador de fase" adecuado, por ejemplo, cuando emplean auto-radiografía y timidina marcada con tritio (³H). El uso si

multáneo de fase S y mitosis es la base de la técnica del "porcentaje de mitosis marcada", en el análisis del ciclo celular- (5,6).

G_2 : Período de reposo premitótico. La división de -- las poblaciones G_2 se reconoce teóricamente por la incapacidad de tales células para incorporar precursores de DNA específico así como por "tetraploidia" ("4C").

G_0 : De pruebas recopiladas al respecto, cabe sugerir la existencia de una población de células, que aún cuando no-- participan activamente en la división celular, pueden ser esti- muladas para dividirse en condiciones apropiadas. Estas célu-- las que son postmitóticas "temporales", se han denominado célu-- las " G_0 " (7,8). Así las células G_0 si bien "fértils" (9), se-- encuentran en realidad en un estado de "limbo" proliferativo.- Burrs y Tannoch (10), han postulado un modelo en el cual las-- células pueden abandonar temporalmente el ciclo celular en --- cualquier etapa, considerando la fase G_0 como una prolongación de G_1 , (esto es, que la última fase se haya integrada por G_0 y " G_1 verdadera"). Por otra parte, debido a las evidentes difi-- cultades cinéticas y semánticas que surgen cuando se trata de-- diferenciar células con fases largas G_1 , de las G_0 verdaderas, Greenberg y Col. (11), han propuesto que quizá sea apropiado-- considerar a las células postmitóticas como G_0 y comenzar la + fase G_1 solo cuando realmente se inician los eventos metabóli-

cos que en forma inevitable conducen a la fase "S". Como ejemplos hematológicos de células Go estarían los linfocitos pequeños de sangre periférica antes del estímulo antigénico y seguramente ciertas subpoblaciones de células leucémicas.

La duración de las fases G_1 , S, G_2 y M del ciclo celular varían en diferentes tipos de células. Lipkin (9), ha dado algunos tiempos promedio, para cada una de las fases celulares de poblaciones normales de sitios de rápida renovación-- como el pulmón, córnea, epidermis y tracto gastrointestinal. - La duración de S es pequeña, de 1 a 2 hr, G_2 es generalmente - más larga que M durando 1 a 4 hr, G_1 dura cerca de 7 hr; en células humanas la variación más grande se encuentra en G_1 con - tiempos estimados que van desde unas pocas horas a varios días.

La tabla No. 1, muestra las macromoléculas (DNA, RNA y proteínas) sintetizadas durante esas fases.

TABLA NUM. 1

 Síntesis de macromocélulas durante las 4 fases del ciclo celular.

Fase del ciclo celular.	Síntesis de DNA.	Síntesis de RNA.	Síntesis de proteínas.
G ₁	-	+	+
S	+	+	+ (máximo)
G ₂	-	-	+
M	-	-	+ (mínimo)

De acuerdo al patrón de renovación, las poblaciones celulares se pueden dividir en tres grupos principales:

Duplicadoras continuas: Estas células se dividen durante toda la vida del huésped. Por ejemplo, el Sistema gastrointestinal y hematopoyético.

Duplicadoras discontinuas: En estas células la duplicación se lleva a cabo desde el nacimiento hasta el crecimiento completo. Después de esto, ellas se dividen en forma muy débil, y tienen la capacidad de incrementar su duplicación cuando se estimula la restauración del órgano. Por ejemplo, células del hígado, túbulos renales y hueso.

IV.- HEMATOPOYESIS EN EL FETO.

No duplicadoras: Estas células se pueden duplicar -- durante un tiempo breve después del nacimiento y posteriormente pierden esta capacidad. Por ejemplo, Sistema nervioso, Sistema muscular liso y estriado, del corazón y glomérulo renal.- Estas células no se reemplazan por si mismas en clase, pero se podría renovar DNA en algunas de ellas.

IV.- HEMATOPOYESIS EN EL FETO.

Varios órganos de mamíferos pueden llevar a cabo hematopoyesis, pero aparentemente el ambiente dentro del hueso es óptimo para la proliferación y maduración de las células sanguíneas. Sin embargo, las cavidades de los huesos no se desarrollan hasta el quinto mes de vida intrauterina, así, durante la vida fetal temprana otros sitios presumiblemente menos favorables son los responsables de la producción de glóbulos rojos.

En el feto humano las células sanguíneas se forman primero fuera del embrión, en los numerosos islotes sanguíneos del saco vitelino (12). La síntesis de hemoglobina también se inicia en el saco vitelino durante el período mesoblástico de hematopoyesis (Figura No. 2).

La primera evidencia de eritropoyesis se puede observar, aproximadamente, en el día 19 de la gestación. En esta época, los islotes sanguíneos del saco vitelino tienden a diferenciarse en dos direcciones: las células situadas en la periferia de estos islotes forman las paredes de los vasos sanguíneos primarios, mientras que a partir de las células localiza-

das centralmente surgen las células sanguíneas primitivas o -- "células tronculares" (12,13).

Todos los eritrocitos circulantes producidos en este período se presentan con grandes núcleos y cromatina nuclear - de apariencia inmadura y tienen un período de vida más pequeño que los eritrocitos adultos, virtualmente, todos desaparecerán aproximadamente en el cuarto mes de vida fetal. Esas células-- fueron consideradas erróneamente por Erlich como megaloblastos de anemia perniciosa. En el segundo mes de gestación estas células son lentamente reemplazadas por pequeñas células no nucleadas, derivadas de eritropoyesis hepática (14). Al mismo -- tiempo hay una gradual desaparición de hemoglobina conteniendo cadenas epsilon (hemoglobina Gower tipo IE₄ y hemoglobina Gower tipo II $\alpha_2\epsilon_2$), pero no se sabe si la producción de hemoglobinas embrionicas es una propiedad exclusiva del saco vitelino (15). Durante los siguientes meses de la vida fetal, el-- hígado es el principal órgano productor de células sanguíneas- (Figura No. 2). Entre el tercero y séptimo mes hay una producción importante de glóbulos rojos en el bazo.

A partir aproximadamente del 5o. mes de vida fetal - se pueden reconocer células leucopoyéticas en las regiones cartilaginosas de los huesos, pero la eritropoyesis se instala en las cavidades óseas lentamente. El período mieloides de la hematopoyesis representa el órgano cuantitativamente más importan-

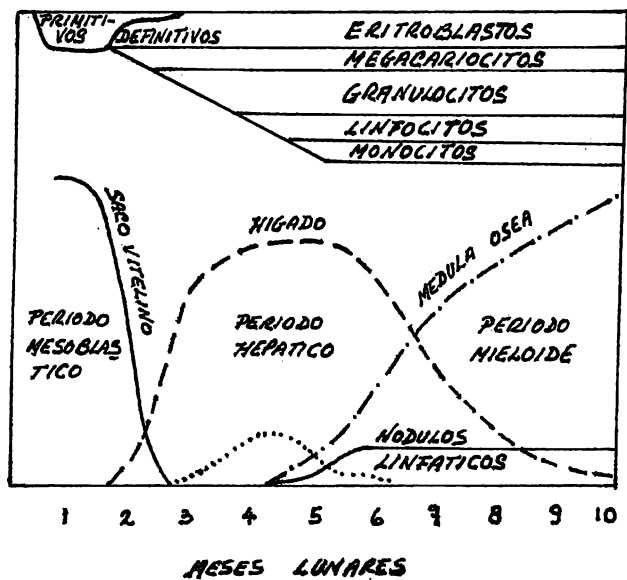


FIGURA Núm. 2

Estudios de hematopoyésis en el embrión y feto.

te, desde el sexto mes hasta que termina la gestación. A lo largo de la vida fetal, los eritroblastos de hígado, bazo y médula ósea sintetizan hemoglobina fetal ($\text{HbF}, \alpha_2 \gamma_2$) y hasta-- después del nacimiento empiezan a aparecer cantidades apreciables de hemoglobina adulta ($\text{HbA}, \alpha_2 \beta_2$).

Durante la primera mitad de la gestación se encuentran granulocitos circulantes (16). Se ha observado producción de leucocitos en zonas no medulares en un embrión de siete semanas, sin embargo, la producción principal de leucocitos se lleva a cabo hasta que se instala el período mieloide de la hematopoyesis. Esta evidencia apoya el concepto que la médula es el único órgano potencialmente hematopoyético, con un ambiente apropiado para el completo desarrollo de tejido granulocítico y megacariocítico.

En general, el recuento de granulocitos está por debajo de 1,000/ml de sangre durante la primera mitad de la gestación. Durante los últimos 3 meses, el número de granulocitos se eleva rápidamente, en el momento del nacimiento, el recuento es superior al que se observa normalmente en otras etapas de la vida.

En contraste con lo que ocurre con los granulocitos, el recuento de linfocitos es mayor en la primera mitad de la gestación que el observado posteriormente (17). La linfopoye--

sis comienza aproximadamente en la octava semana de vida intrauterina en los plexos linfáticos, en la novena, en el timo y-- sobre la duodécima semana en los ganglios linfáticos. Alrededor de la vigésima semana de gestación el recuento de los linfocitos circulantes es de unos 20,000/ml. de sangre y a partir de entonces, desciende gradualmente hasta cerca de 3,000/ml. - de sangre a las 40 semanas de gestación.

Los megacariocitos aparecen en el saco vitelino hacia la sexta semana. Por esta época pueden apreciarse también en el hígado, pudiendo estar presentes en este órgano hasta el final de la gestación. A partir del tercer mes fetal los megacariocitos se encuentran de manera constante en la médula ósea.

A lo largo de la vida fetal tardía, el control fisiológico de producción de glóbulos rojos probablemente está restringido a hipoxia tisular y liberación de eritropoyetina (18) El feto está bajo continuo estímulo hipóxico y la eritropoyetina se ha demostrado en el líquido amniótico de madres de niños con eritroblastosis fetal. Lo que no se sabe si la eritropoyetina puede atravesar la barrera placentaria.

V.- EL MICROAMBIENTE HEMATOPOYETICO

V.- EL MICROAMBIENTE HEMATOPOYETICO (19).

Ershler y col., presentan evidencia completa hasta la fecha de que existe un microambiente hematopoyético y de las enfermedades de éste en el hombre. Dichos autores, estudiaron a pacientes con anemia probablemente congénita (debido a falta de maduración de precursores eritroides) y encontraron que si se colocaban células de médula ósea en sistemas de cultivo, se originaban abundantes precursores eritrocíticos, los cuales maduraban y sintetizaban grupos hem. Contrariamente, si se colocaba una sección de médula obtenida de la misma biopsia en el medio de cultivo, las células no se dispersaban y no había síntesis de hem. Así, concluyeron que el crecimiento y maduración de precursores eritrocíticos aparentemente mejoraba cuando el medio ambiente de la médula era eliminado.

Hay un microambiente hematopoyético que es esencial para la función normal de células tronculares hematopoyéticas. Algunos datos apoyan esta idea: la hematopoyesis (excepto la linfopoyesis) está confinada a la médula en el adulto normal; una inyección intravenosa de médula con el propósito de trasplante de ésta en el hombre y en ciertos animales produce hematopoyesis solamente medular; y un microambiente hematopoyéti-

co defectuoso se ha demostrado claramente en el ratón SL/SL^d. - Trentin, basado en hematopoyesis comparativa en el bazo y médula del ratón, formuló el concepto de que hay áreas anatómicas que sirven para dirigir a la célula troncular hematopoyética-- pluripotente hacia una u otra línea celular específica de diferenciación. El mismo autor, sugiere que hay un componente inductivo para el microambiente hematopoyético. En muchos laboratorios se está estudiando este aspecto en ratones modelo y así-- han surgido definiciones aún no muy claras de este microambiente. En la actualidad no se puede afirmar si éste representa la presencia de factores positivos en médula o la presencia de -- factores hostiles en otros tejidos. En parte, la dificultad -- en definir la naturaleza del microambiente, radica en la com-- plejidad del tejido medular. Existen en la literatura trabajos que sugieren que el microambiente está íntimamente relacionado a células semejantes a macrófagos, células adventicias y células adiposas. Además, hay evidencia, que linfocitos T deben -- tener un papel regulador en hematopoyesis mieloide. Una variedad de posibilidades para aspectos importantes del microambiente, pueden ser sugeridas: la relación precisa de estructuras-- anatómicas, secreción de productos estimulantes o inhibidores-- que sirven de apoyo celular e hipotéticamente de comunicación-- directa entre "células hijas" y células tronculares hematopo-- yéticas.

Algunos ejemplos de enfermedades que se pueden deber

a microambiente hematopoyético defectuoso son las siguientes:- neutropenia congénita tipo Kostman, anemia aplástica, así como radiaciones con rayos X o gamma.

VI.- CELULAS TRONCULARES HEMATOPOYETICAS.

VI.- CELULAS TRONCULARES HEMATOPOYETICAS.

El origen de las células hematopoyéticas ha sido un problema muy debatido en Hematología. Basados en observaciones morfológicas, Maximow y col. (13), consideraron que todas las células sanguíneas provenían de una célula troncular común --- -TEORIA MONOFILETICA.- Otros como Sabin y col. (20), sugirieron que existían diversas células tronculares para cada una de las series de células sanguíneas - TEORIA POLIFILETICA-. Otras teorías intermedias entre esos extremos (dualista, trialista, neounitaria, etc.), fueron propuestas por Naeyeli, Shelling y Downey (21).

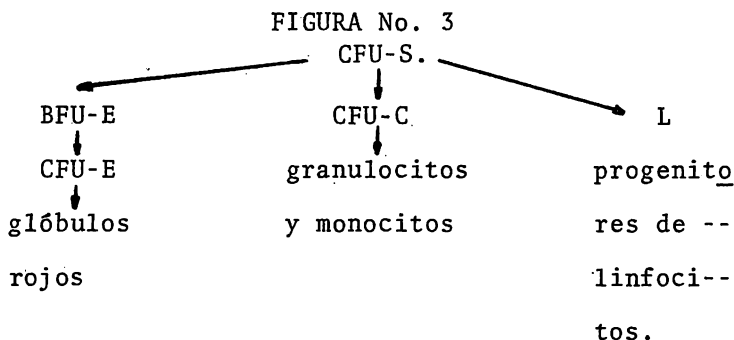
El problema, sin embargo, permaneció esencialmente sin resolver hasta los años sesentas, cuando varios métodos quedaron disponibles para el estudio cuantitativo de poblaciones de células precursoras hematopoyéticas.

El estudio de las células progenitoras no se ha podido llevar a cabo mediante los clásicos criterios morfológicos, así, la información disponible se deriva del desarrollo de técnicas indirectas, en éstas, las células primitivas expresan su capacidad para crecer y diferenciarse, sus números y propieda-

des son entonces deducidas examinando su progenie. El más importante de tales métodos, es aquél basado en la formación de colonias, donde la progenie de un único progenitor se localiza geográficamente como una colonia suficientemente grande para permitir, tanto el análisis de la composición celular como la determinación de la eficiencia para formar colonias de diferentes suspensiones celulares.

La célula hematopoyética más temprana se considera-- que es una célula troncular pluripotente "S" (Figura No. 3).-- Los descendientes diferenciados de células tronculares incluyen eritrocitos, granulocitos, macrófagos y megacariocitos. -- Existe ambigüedad respecto a la relación entre linfopoyesis y células "S". En el ratón existen evidencias cromosómicas inequívocas, que las células "S". En el ratón existen evidencias cromosómicas inequívocas, que las células "S" y las células -- de ganglios linfáticos productoras de anticuerpos pueden pertenecer a la misma clona. También hay experimentos en los que -- células de colonias de bazo fueron competentes para repoblar espacios linfoides, esto es también una evidencia de que las células "S" son precursoras de células linfoides. La única evidencia conocida para aceptar que el linaje de células linfoides es independiente de células "S" se deriva de la leucemia-- granulocítica crónica, donde el cromosoma Filadelfia, característico de la clona leucémica mieloide, predomina en esta enfermedad y no se encuentra en células linfoides de sangre peri

férica cuando éstas se estimulan para mitosis con fitohemaglutinina.



CELULA TRONCULAR PLURIPOTENTE. (CFU-S)

Para el estudio de hematopoyesis temprana o sea el estudio de células tronculares, se utilizó el método de formación de colonias en el bazo de ratones letalmente irradiados o ratones genéticamente anémicos. Al exámen morfológico de los nódulos, se observa que consisten de células eritropoyéticas, granulopoyéticas u ocasionalmente megacariocíticas madurando o de una mezcla de 2 o cuando mucho 3 de los tipos (22,23). En los estadios tempranos del crecimiento de la colonia predomina usualmente una línea celular. Los nódulos permiten su numeración separada y su número guarda relación lineal al número de células nucleadas inyectadas. La extrapolación de esta relación lineal al origen no varía significativamente de cero, como si la única entidad en la suspensión original fuera la responsable para cada colonia esplénica. A esta entidad se le llama

ma "unidad formadora de colonias" CFU-S.

Con éste método y para demostrar si provenían de la misma clona, se usaron marcadores cromosómicos (24,25). Tales marcadores se indujeron por irradiación de las suspensiones de células que se iban a inyectar en los ratones. Examinando las células de la CFU-S, se observó que 95 - 100% de las células tenían la aberración cromosómica.

Con este ensayo clonal y cuantitativo, ha sido posible determinar una de las propiedades de la CFU-S: Pluripo --- tencia aún cuando fué poco aparente por la identificación de --- tres líneas celulares en las colonias en el bazo; se estable--- ció con mayor certeza sólo después de análisis más detallado. La dificultad deriva de la observación que en algunas colonias una proporción significativa de células (5%) en metafase, en--- colonias con marcadores cromosómicos, no contenían el marcador característico de la colonia.

La conclusión de que la CFU-S era pluripotente se ob--- tuvo mediante experimentos de trasplante; en éstos, las células de colonias identificadas como predominantemente eritropoyéticas o granulopoyéticas se inyectaron en huéspedes irradiados, las colonias desarrolladas en los bazos de estos animales y la distribución de los tipos celulares dentro de tales colonias fueron muy similares a las observadas en las colonias de-

origen. Desafortunadamente, toda la información concerniente-- a células tronculares pluripotenciales está basada en datos de varias cepas de ratones.

El modelo común de esta población celular es que encontrándose en estado no proliferativo (Go), pueden entrar al ciclo de proliferación llevando a división o diferenciación celular, dentro de una línea comprometida. No hay evidencia para invocar un concepto de división celular asimétrica, células -- madre en Go o en un estado proliferativo pueden igualmente empezar a diferenciarse.

Las CFU-S, son células "móviles" en el sentido en -- que las células tronculares están circulando en la sangre periférica ($1-5 \times 10^5$ células sanguíneas nucleadas). Durante recuperación, por ejemplo de irradiación de cuerpo total o estimulación antigénica, su movilización puede incrementarse significativamente.

Durante la embriogénesis hay ondas de migración de - CFU-S, primero del saco vitelino al hígado y después del hígado a la médula ósea y al bazo (26).

POGENITORES COMPROMETIDOS PARA GRANULOPYESIS CFU-C- (27).

El estudio de la granulopoyésis en la diferenciación

hematopoyética temprana, tuvo un gran avance por el hallazgo-- de que las células hematopoyéticas de ratón son capaces de formar colonias granulopoyéticas y/o monocíticas en cultivos con medio semisólido. Se demostró por observación directa, que estas colonias granulopoyéticas-monocíticas eran clonales y este procedimiento fué establecido como método cuantitativo cuando se comprobó relación lineal entre formación de colonias y número de células adicionadas al cultivo. Un requerimiento para la formación de tales colonias en cultivo, es la presencia de estimuladores derivados de capas celulares o de fuentes no celulares como suero de ratón inyectado con endotoxina y una glicoproteína obtenida de orina humana. De acuerdo con la nomenclatura adoptada para el ensayo de colonias de bazo, la célula -- que da origen a colonias granulopoyéticas monocíticas se le ha llamado "unidad formadora de colonias en cultivo" CFU-C.

Con el establecimiento del ensayo para CFU-C, se investigó su relación con la CFU-S, pudiéndose concluir que entre las dos clases de progenitores hay relativamente pocos pasos de diferenciación que separan la CFU-S pluripotente de la CFU-C. Sobre esta base se asume que CFU-C es progenie de la -- CFU-S.

Los métodos de cultivo para granulopoyésis se adaptaron para células humanas. Las células humanas que daban lugar a colonias granulopoyéticas eran similares a las de ratón en--

relación a su velocidad de sedimentación y densidad. Como en los progenitores granulopoyéticos de los ratones se encontró-- que las células humanas estaban divididas en poblaciones pro--liferando rápidamente y otras proliferando lentamente. Por estas razones, aún en ausencia de un punto de referencia similar a la CFU-S de los ratones, se asume que la CFU-C en el hombre es una clase de progenitor comprometido para granulopoyesis.-- Existen importantes diferencias entre los requerimientos de --cultivo para granulopoyesis en ratón y para granulopoyesis humana. A diferencia de los progenitores de ratón, sólo se han-- identificado un número limitado de fuentes de estimulador para granulopoyesis humana, éstos incluyen: sobrenadantes de cultivo de leucocitos humanos, células de riñón de embrión humano, --preparaciones de membrana celular de leucocitos humanos. La --glicoproteína de orina humana efectiva para estimular la forma--ción de colonias granulopoyéticas de ratón, demostró poca o --ninguna actividad en células humanas. Aún cuando las células--hematopoyéticas humanas poseen "actividad para estimular colonias" (CSA) en asociación con sus membranas son capaces de liberarla dentro del medio de cultivo, no es de sorprender en---contrar células productoras de CSA coexistiendo con progenitores granulopoyéticos.

El compartimiento de célula troncular, macrófago-monocito-granulocito contiene células susceptibles de diferenciarse por la vía monocito-macrófago o granulocito y la célula ---

truncular granulocítica puede ser además dividida en aquéllas dando origen a colonias basófilas o eosinófilas. Mediante velocidad de sedimentación, se ha podido separar parcialmente a -- células que dan origen a colonias eosinófilas de aquellas que dan origen a colonias granulocito-monocito. Linfocitos activados parecen liberar un factor que estimula la formación de colonias eosinófilas y este factor es distinto del que estimula colonias neutrófilo-monocito. Recientemente Broxmeyer y col. -- han demostrado que los granulocitos maduros contienen una sustancia llamada "actividad inhibidora de colonias" (CIA), la -- cual bloquea la producción o liberación de CSA por monocitos. -- La actividad inhibidora de colonias parece ser la lactoferri-- na, una glicoproteína ligada a hierro contenida en altas con-- centraciones en los gránulos secundarios de granulocitos maduros. Esta sustancia bloquea la producción basal o liberación (o ambas) de CSA por monocitos, pero no bloquea la producción de CSA por monocitos estimulados por endotoxinas. Así, cuando los niveles de granulocitos comienzan a aumentar, CIA deriva-- da de granulocito puede actuar para inhibir la producción de -- monocito-granulocito por bloqueo de la evolución de CSA de monocitos a menos que haya un estímulo continuo tal como puede -- suceder en infecciones.

PROGENITORES COMPROMETIDOS PARA ERITROPOYESIS BFU-E-
y CFU-E (26,27).

Los avances más recientes en las técnicas de colo --

nias, son aquéllas aplicadas a la eritropoyesis. El primer ensayo descrito se basó en el desarrollo de pequeñas colonias -- después de dos días de incubación de células de médulas o hígado de feto de ratón en plasma conteniendo eritropoyetina. Este método llenaba los requerimientos de validación usuales, incluyendo relación lineal entre formación de colonias y número de células nucleadas. Las colonias consistían de eritroblastos o eritrocitos y se desarrollaban sólo en presencia de eritropoyetina. Cuando se aumentaron las cantidades de eritropoyetina y se prolongó el período de incubación se observó que las colonias pequeñas no se distribuían homogéneamente en el cultivo, sino más bien se encontraban en brotes. Estos, podían ser contados y su número se relacionó linealmente al número de células probadas. La nomenclatura para los otros ensayos se aplicó a este sistema; a los progenitores de las colonias pequeñas se les llamó "unidad formadora de colonias dependiente de eritropoyetina" CFU-E y a los progenitores de los brotes "unidad formadora de brotes dependiente de eritropoyetina" BFU-E.

Se emplearon procedimientos de correlación para estimar las posiciones relativas de la BFU-E y la CFU-E en el linaje de la eritropoyesis. CFU-E, la más diferenciada de las dos células progenitoras, se encontró que no correlaciona con eritroblastos tempranos reconocibles. Ambas, BFU-E y CFU-E, se pueden considerar más tempranas en la diferenciación que los estadios morfológicamente identificados del eritrocito. El aná

lisis de la composición celular de las colonias individuales - del bazo, revelaron una correlación significativa entre BFU-E y CFU-S, mientras que CFU-E fueron más numerosas en colonias - predominantemente eritropoyéticas y no correlacionaron con --- CFU-S. Estos datos colocarían al BFU-E en la vía eritropoyética a un estadio de diferenciación comparable al de CFU-C en--- granulopoyesis, mientras que CFU-E sería considerada como más-diferenciada.

La adaptación de los cultivos para progenitores eritropoyéticos en células humanas ha progresado rápidamente. Se han demostrado colonias análogas a aquéllas derivadas de la -- CFU-E de ratones en colonias de médula ósea humana, aún cuando tales colonias requieren 6 a 8 días para crecer, en contraste a crecimiento de 2 días para células de ratón. Cambiando con-- centración de eritropoyetina y el tiempo de incubación se han obtenido colonias eritroides de médula humana y se asume que-- son análogas a la BFU-E del ratón.

PROGENITORES COMPROMETIDOS PARA MEGACARIOPOYESIS.

Los megacariocitos parecen derivar de CFU-S, y su diferenciación es determinada, en parte, por factores microam-- bientales. La megacariopoyesis y la producción de plaquetas -- son estimuladas por trombocitopenia y suprimidas por trombocitosis (28). Muchos estudios han indicado que la regulación de-

producción de plaquetas depende de la substancia humoral llamada "trombopoyetina" y se han propuesto pruebas de esta entidad Wainchenker y col. (29), reportaron el crecimiento en cultivo de plasma coagulado de colonias megacariocíticas de células de médula ósea de adulto con el uso de cuatro diferentes fuentes de eritropoyetina, así como un factor estimulante. Una gran proporción de colonias megacariocíticas (75%) fueron puras, las otras fueron mezclas de eritroblastos y megacariocitos. Estudios ultraestructurales demostraron que la maduración de megacariocitos fue esencialmente normal y que hubo desprendimiento de plaquetas. En la ausencia de eritropoyetina se observaron pocas colonias megacariocíticas espontáneas mientras que ninguna colonia eritroide estuvo presente. Sin embargo, la eritropoyetina incrementó cinco veces el número total de colonias.

Esos datos sugieren que la eritropoyetina está involucrada en la diferenciación de megacariocitos humanos, pero que ella no actúa sola, sino que otro factor relacionado al número de células sembradas parece esencial para la formación de colonias megacariocíticas humanas. Este factor puede ser el equivalente in vitro, a la trombopoyetina descrita in vivo.

Jackson (30), ha sugerido que pequeñas células mononucleares acetilcolinesterasa positivas son precursores de megacariocitos, pero su papel como células tronculares es todavía incierto.

VII.- METODOS DE CULTIVO DE CELULAS

VII.- METODOS DE CULTIVO DE CELULAS.

TECNICA PARA LA PRODUCCION DE NODULOS CLONALES HEMATOPOYETICOS.

Cuando un ratón es expuesto a una dosis letal de radiación los tejidos hematopoyéticos se eliminan completamente, si a la radiación le sigue una inyección de una suspensión de células de médula ósea singeneica normal, bazo o células de hígado fetal, los animales sobreviven y durante las tres o cuatro semanas siguientes se produce esplenomegalia debido al gran incremento de actividad hematopoyética. Si además, el número de células inyectadas en el ratón se reducen, por ejemplo, a 10^4 o 10^5 células de médula ósea (las cuales son suficientes para que sobreviva el animal), aparecerán nódulos discretos sobre el bazo, aproximadamente siete días más tarde (Figura No. 4) (31). Cada nódulo está formado de células hematopoyéticas reconocibles y sus precursores; no obstante, si una suspensión de células se prepara de una colonia separada y se inyecta nuevamente a un ratón irradiado, en muchos casos se producen colonias sobre el bazo de dicho animal (32). La célula formadora de las primeras colonias no solo produce células sanguíneas y sus precursores, sino también una población de células de su propia especie.

Se han hecho numerosos intentos para producir colonias esplénicas por este camino en otros animales como ratas y conejos, pero el único animal en el cual se desarrollan colonias esplénicas es el ratón. Toda la información que se tiene de la célula troncular hematopoyética es el resultado de la aplicación de esta técnica en el ratón. Sin embargo, sólo por inferencia se pueden sacar conclusiones considerando otros mamíferos incluyendo al hombre (33).

CRECIMIENTO DE COLONIAS DE MEDULA OSEA EN MEDIO SEMI SOLIDO. (34).

Hace 15 años se desarrollaron las técnicas de cultivo que ahora permiten el crecimiento a varias subpoblaciones de células hematopoyéticas en medio semisólido, como colonias de clonas de células diferenciadas. La mayoría de estas técnicas se han modificado para servir de soporte al crecimiento de células humanas.

Para obtener proliferación de una población celular en particular, se debe adicionar al medio de cultivo concentraciones adecuadas del factor regulador específico apropiado. Sin éste no hay proliferación de la población celular concerniente y por lo general muere rápidamente. Por ejemplo, para obtener proliferación de colonias eritropoyéticas en cultivo semisólido se debe adicionar eritropoyetina (1 a 5 U/ml). Pa-

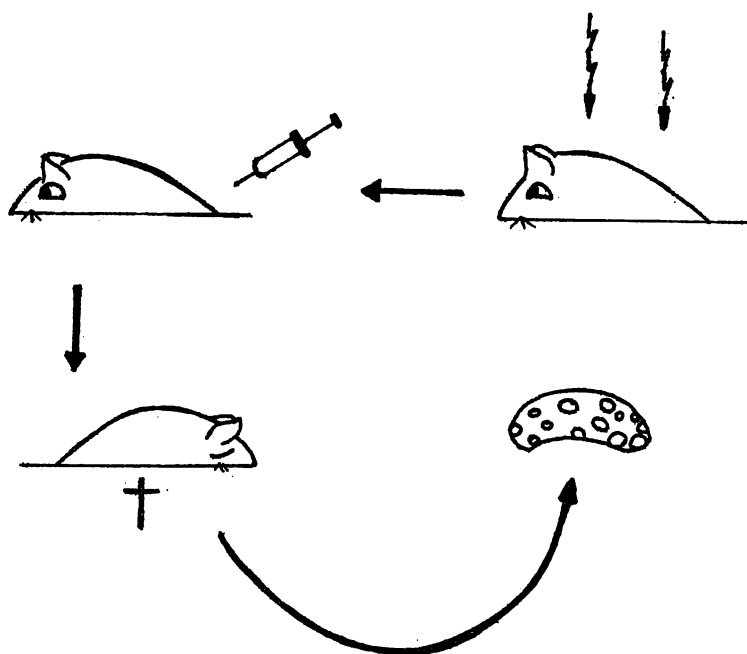


FIGURA Núm. 4

Producción de nódulos clonales hematopoyéticos sobre los bazos de ratones irradiados por inyección de células de médula ósea singeneica.

ra obtener formación de colonias de neutrófilos y macrófagos-- se debe adicionar al medio factor estimulante de colonias de-- macrófagos y granulocitos. Otros factores específicos se enlis-- tan en la tabla No. 2, donde se indican las subpoblaciones que pueden ser selectivamente estimuladas para proliferar.

La formación de colonias de linfocitos T o B son apa-- rentemente excepciones a la generalización de que un factor hu-- moral específico es necesario para la proliferación de células. Se obtiene un buen crecimiento de colonias de linfocitos B de-- ratón simplemente adicionando 2-mercaptoetanol al medio de cul-- tivo y la formación de colonias de linfocitos T humanos se pue-- de obtener usando fitohemaglutinina para estimular la prolife-- ración de linfocitos. Sin embargo, en ambos sistemas existe -- la evidencia que factores específicos, posiblemente originados de macrófagos pueden ser sintetizados en el disco de cultivo-- durante el período de incubación y que estos factores son ne-- cesarios para la proliferación sostenida de colonias de linfo-- citos.

Después de una semana de incubación las colonias he-- matopoyéticas se observan de tamaño variable (rango de 50-5000 células). En los discos de cultivo también se observan numero-- sos y pequeños agregados de 3 a 50 células, que in vivo son -- los progenitores inmediatos de células formando colonias CFU-G

TABLA No. 2

MÉTODOS PARA ESTIMULAR FORMACIÓN DE COLONIAS DE TIPOS ESPECÍFICOS DE CELULAS HEMATOPOYÉTICAS.

TIPO DE COLONIA	FACTORES REGULADORES ESPECÍFICOS.	SISTEMA ADAPTADO PARA CELULAS HUMANAS.
Neutrófilos, monocitos o ambos	Factor estimulante - de granulocito-macrófago.	Si
Eosinófilo	Factor estimulante-- de colonia-eosinófila.	Si
Eritrocito.	Eritropoyetina.	Si
Megacariocito	Factor estimulante - de colonia-megacariocito.	No
Linfocito B	2 mercaptoetanol	No
Linfocito T.	Fitoheماغلوتینینا	Si

En la mayoría de los casos, las células que forman colonias en cultivo, son las progenitoras específicas de la clase celular en particular que se ha cultivado y que es la célula intermedia en diferenciación entre la troncular hematopoyética multipotencial y la más temprana morfológicamente reconocible en la subpoblación particular.

En la tabla No. 3 se presentan las frecuencias de las diferentes células que forman colonias en el hombre y en el ratón.

El sistema de colonias in-vitro, se puede preparar para que exista una relación lineal entre el número de células cultivadas y el número de colonias desarrolladas.

Todos los sistemas de cultivo muestran un curioso asincronismo de iniciación de proliferación de las células CFU-C, que no se relaciona con la etapa del ciclo celular in-vivo, y el cual no se ha podido explicar. Las colonias también muestran marcada asincronía en la diferenciación, y las colonias adyacentes pueden contener células inmaduras o bien diferenciadas. Usualmente, también hay asincronía de diferenciación dentro de la misma colonia y la población puede contener células dividiéndose y células postmitóticas.

Los cultivos pueden ser usados como sistemas de

TABLA No. 3

FRECUENCIA DE CELULAS FORMADORAS DE COLONIAS.

FRECUENCIA DE CELULAS FORMADORAS-
DE COLONIAS POR 10^5 CELULAS DE ME
DULA.

TIPO DE COLONIA.	HUMANO	RATON
Neutrófilo-macrófago	50-100	300
Eosinófilo	10-30	20
Megacariocito	-----	20
Eritroide	30-500	300
Linfocitos B ⁺	-----	2000
Linfocitos T ⁺	1000	----

+ Frecuencia por 10^5 células de bazo.

' Frecuencia por 10^5 células de sangre periférica después-
de quitar polimorfonucleares.

bioensayo altamente sensibles para los factores reguladores es pecíficos, y pueden detectar concentraciones de 10^{-11} M de és-- tos factores. Los bioensayos están basados en la curva sigmoi-- de dosis-respuesta entre concentración de factor y número de-- colonias.

El análisis de las colonias hematopoyéticas ha indi-- cado que son clonas derivadas de células únicas formadoras de-- colonias. Así, la mayoría de las colonias tienen una pureza -- espectacular de la población cultivada, en cultivos que contie-- nen concentraciones adecuadas de los diferentes factores regu-- ladores. Esto, claramente, documenta el hecho de que dentro de cada familia hematopoyética, las células están genéticamente -- programadas a un solo camino de diferenciación, y que no se -- pueden forzar para transformarse en otro tipo de célula hemato-- poyética (Por ejemplo: una célula eritroide que no se puede -- forzar para transformarse en un granulocito o en un eosinófi-- lo).

De lo dicho anteriormente, se puede deducir que los-- cultivos semisólidos se pueden usar para dos propósitos clíni-- cos diferentes: identificar y enumerar varias subpoblaciones -- de células progenitoras hematopoyéticas, y para identificar y-- medir niveles de factores reguladores específicos (34).

A continuación se describe un método de crecimiento--

de colonias de médula ósea humana en gel de agar (35), en el-- que se utiliza como agente estimulador capas nutrientes de glóbulos blancos obtenidos de sangre periférica humana normal.

PREPARACION DE LA CAPA DE NUTRIENTES.

- 1.- Colectar sangre periférica de personas normales-- en tubos Vacutainer para cultivo de tejido (No.- 3208 NT Becton, Dickinson and Co. Rutherford N.- J.) conteniendo 2 gotas de heparina 1:1000.
- 2.- Dejar sedimentar, colocando el tubo verticalmen-- te, por 1 o 2 horas a temperatura ambiente.
- 3.- Separar con pipeta Pasteur el plasma conteniendo los glóbulos blancos y las plaquetas.
- 4.- Contar con hemocitómetro el número de glóbulos-- blancos en el plasma. El número usual es aproxi-- madamente de 20×10^6 por ml. con una proporción de un glóbulo blanco por un glóbulo rojo.
- 5.- Preparar medio McCoy 5A (Biogen Laboratories) al cual se le agrega 15% de suero de feto de terne-- ra y una variedad de otros elementos nutrientes.
- 6.- Calentar el medio a 37° antes de agregar el agar-- para prevenir gelificación.

- 7.- Agregar el agar al medio a la temperatura justo-abajo del punto de ebullición.
- 8.- Dejar enfriar la mezcla aproximadamente a 40°C.
- 9.- Agregar a la mezcla los glóbulos blancos de sangre periférica humana en plasma a una concentración final de 1×10^6 células/ml.
- 10.- Pipetear una alícuota de 1 ml. de la preparación anterior en cajas Petri de plástico de 35 mm.
- 11.- Dejar gelificar el medio de agar a temperatura ambiente. Las capas superficiales de médula ósea se pipetea directamente sobre las capas nutritivas inferiores una vez que hayan gelificado, o las cajas Petri se pueden almacenar a 37°C en un incubador húmedo por 14 días sin pérdida de actividad estimuladora de colonias.

PREPARACION DE CAPAS SUPERFICIALES DE MEDULA OSEA.

- 1.- Obtener por punción de cresta iliaca posterior-- una muestra de médula ósea humana, aspirando --- 5-10 ml. en una jeringa enjuagada con heparina - 1:1000 justo antes de usarla, con cuidado de no-dejar alguna cantidad de ésta en la jeringa.

- 2.- Transferir el aspirado a un tubo de ensayo y dejarlo en reposo a temperatura ambiente por una o dos horas.
- 3.- Separar con pipeta Pasteur el plasma conteniendo glóbulos blancos, plaquetas y pequeñas partículas de grasa.
- 4.- Centrifugar y lavar el plasma 3 veces en medio--McCoy 5A.
- 5.- Mezclar el medio McCoy 5A a una concentración --9:1 con agar hervido al 3%.
- 6.- Agregar las células de médula ósea lavadas a esta mezcla a una concentración de 2×10^5 células/ml y ponerlas sobre la superficie de las capas nutritivas inferiores previamente preparadas.
- 7.- Después de gelificación a temperatura ambiente,--incubar las placas a 37°C en un incubador húmedo con una corriente constante de 75% de CO₂ en --aire.

ESTUDIOS MICROSCOPICOS.

Utilizando un microscopio de disección con amplificación de 16X, contar el número de colonias que contengan 50 o --más células. Para estudios microscópicos, separar las colonias

de agar, usando una pipeta Pasteur de tallo largo, colocar la muestra en un portaobjetos y cubrirla con un cubreobjetos. Se puede teñir por flotación en aceto-orceína 0.45%.

Medula ósea normal preparada con 2×10^5 células, da lugar a 32 - 102 colonias con un promedio de 50.

CRECIMIENTO DE COLONIAS ERITROIDES EN AGAR SEMISOLIDO (36).

- 1.- Obtener médula ósea por aspiración de la cresta iliaca o sangre por punción venosa.
- 2.- Dejar sedimentar las muestras anticoaguladas por heparina, por 1-3h en un volúmen igual de metilcelulosa al 0.5%.
- 3.- Tomar las células nucleadas de la capa superior (no sedimentada) y hacer una suspensión en 15 ml de medio McCoy. Centrifugar a 80 rpm durante 10 min.
- 4.- Resuspender en un pequeño volúmen de medio McCoy (1-3 ml).
- 5.- Tomar una alícuota de 0.05 ml. para cuenta de células en hemocitómetro.

- 6.- Colocar, como capa inferior en la caja Petri, una suspensión en medio McCoy enriquecido con suero-fetal de ternera al 15%, de 10^6 leucocitos humanos normales en agar al 0.5%.
- 7.- Colocar en la misma caja Petri concentraciones - de 2×10^6 , 2×10^5 o 2×10^4 células nucleadas - en 1 ml. del mismo medio McCoy enriquecido y un medio semisólido de agar al 0.3%, conteniendo -- además 1 o 2 UI de eritropoyetina humana.
- 8.- Incubar las cajas Petri por 7 días a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO_2 .

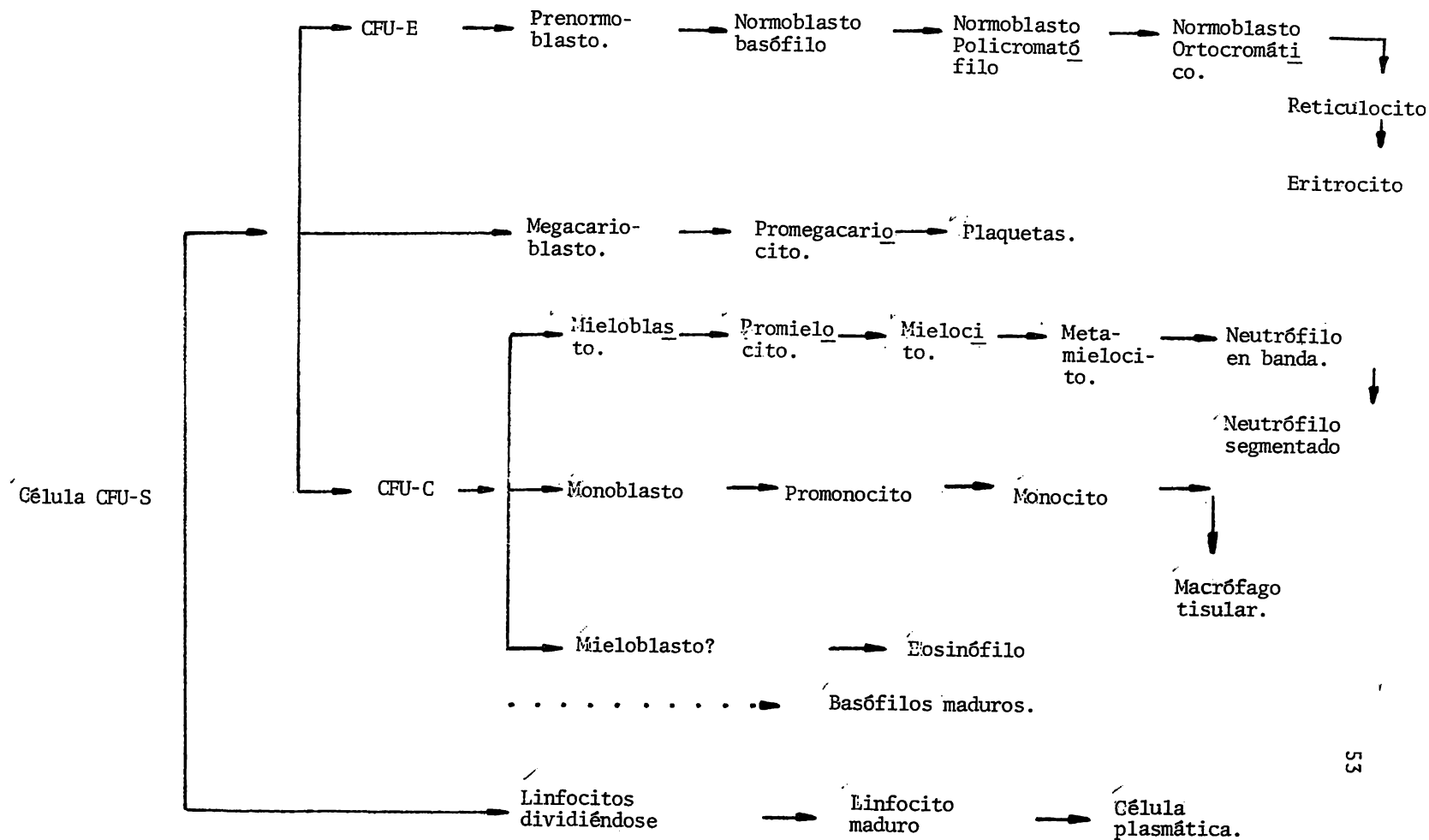
CONTEO Y TINCION.

- 1.- Directamente de las placas, contar los grupos -- (3-40 células) y colonias (más de 40 células) a un aumento de 100X.
- 2.- Teñir las colonias eritroides, cubriendo las placas de agar con 0.5 ml. de hidrocloruro de bendicidina acuosa al 1%.
- 3.- Inmediatamente después cubrir con 0.5 ml. de peróxido de hidrógeno al 3%.
Después de 1-2 min. las colonias y los grupos -- conteniendo hem, desarrollarán un color azul in-

tenso.

- 4.- Contar inmediatamente el número de colonias posi
tivas por placa y calcular el porcentaje de colo
nias positivas a bencidina, contando las placas-
de colonias azules como una proporción del núme-
ro total de colonias por placa.

VIII.- ASPECTOS MORFOLOGICOS DE LAS
CELULAS SANGUINEAS.



VIII.- ASPECTOS MORFOLOGICOS DE LAS CE
LULAS SANGUINEAS (37, 38).

Para poder identificar los diferentes tipos de células: eritrocitos, leucocitos y plaquetas, se han propuesto numerosos métodos incluyendo los microscópicos, bioquímicos o --histoquímicos, pero para fines clínicos, se siguen utilizando --métodos morfológicos que resultan relativamente más simples.

Aunque la morfología tiene limitaciones, las exten--siones de sangre o médula ósea cuidadosamente realizadas y teñidas, proporcionan una información indispensable para la solu--ción de gran número de problemas clínicos.

En cualquier serie celular, existe un número casi in--finito de grados de maduración entre la célula más inmadura --"blasto" hasta la célula madura definitiva. La célula madura--se describe e identifica por ciertos rasgos específicos que --desarrolla en el curso de la maduración. Esos rasgos aparecen--gradualmente conforme madura la célula, así que cada una debe--al desarrollarse hacerse semejante a algún estado de madura --ción. Puesto que ésto es normalmente un proceso ordenado, las--células de la sangre exhiben características repetidas que lle--van a la descripción de estados típicos.

Debe ser enfatizado, que el desarrollo celular no se lleva a cabo mediante transformaciones instantáneas de un grado de maduración a otro, sino por transición gradual y los estados descritos, por conveniencia, son meramente estructuras típicas de un proceso continuo.

La transformación de una célula inmadura a una madura siempre lleva consigo cambios en el citoplasma y en el núcleo. Así, los rasgos distintivos por los cuales las células sanguíneas pueden ser reconocidas son: diferenciación citoplasmática, presencia de gránulos en el citoplasma, maduración nuclear y reducción del tamaño de la célula.

DIFERENCIACION CITOPLASMATICA.

El citoplasma de células inmaduras es generalmente muy basófilo (la basofilia se refiere a la afinidad por los colorantes básicos como el azul de metileno que se encuentra en el colorante de Wright). Conforme madura la célula pierde la basofilia.

GRANULOS CITOPLASMATICOS.

En las células mieloides, la diferenciación citoplasmática se caracteriza por la aparición de gránulos. Cuando éstos aparecen, son escasos, gruesos y de color rojo vino. En

el caso de los granulocitos, el citoplasma contiene dos tipos de gránulos: los gránulos específicos se caracterizan por ser grandes; gruesos y azurófilos, aparecen en los promielocitos-- y son más numerosos en los mielocitos. Los gránulos secunda -- rios (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) aparecen primero-- en los mielocitos y caracterizan a metamielocitos, bandas y -- segmentados.

MADURACION NUCLEAR.

La maduración nuclear se produce con cambios en la-- condensación de la cromatina nuclear, en algunos casos con --- grandes cambios en la forma nuclear, desaparición de los nu -- cléolos y reducción de tamaño. El núcleo inmaduro es redondo-- u oval. La relación núcleo-citoplasma (N/C) es grande y la red de cromatina nuclear es muy fina, mientras que en las células-- maduras, la cromatina se hace gruesa y agrupada.

Particularmente en los granulocitos, la maduración - nuclear produce cambios en la forma, dando como resultado fi - nal un núcleo que tiene dos o más lóbulos conectados por finos filamentos.

REDUCCION EN EL TAMAÑO DE LA CELULA.

La reducción del tamaño celular es una característi-

ca de todas las células conforme maduran, excepto las de la serie megacariocítica, en la cual, la célula más joven es más -- pequeña que el megacariocito completamente maduro.

Tomando en cuenta los conceptos anteriores, se des--cribirán a continuación las características de las células que se encuentran normalmente en sangre periférica.

NEUTROFILO EN BANDA.

Citoplasma: Abundante de color rosa o azul pálido. - La relación N/C es 1:2.

Núcleo: En forma de banda. La cromatina es gruesa de color azul púrpura intenso. La paracromatina es escasa; los nucléolos no son visibles.

Granulaciones: Contiene finos gránulos color vino y otros gruesos azul intenso o rojos.

Tamaño: 10 a 15 4.

NEUTROFILO SEGMENTADO.

Citoplasma: Abundante, la relación N/C es 1:3, pre--senta color rosa o azul.

Núcleo: Cromatina gruesa y densa de color azul púrpura con escasa paracromatina.

Granulaciones: Gránulos finos de color lila o rosa.

Tamaño: 10 a 15 μ.

EOSINOFILOS Y BASOFILOS.

Tienen las mismas características morfológicas generales y secuencia de desarrollo que los neutrófilos.

Sus características: gránulos rojo claro (eosinófilos) y azul oscuro (basófilos).

LINFOCITO.

Citoplasma: Típicamente azul cielo claro y homogéneo. Escaso en linfocitos pequeños y abundante en linfocitos grandes.

Núcleo: Redondo u oval, puede tener una indentación. La membrana nuclear es densa. La cromatina está en grandes y gruesos acúmulos. Los nucléolos sólo pueden verse ocasionalmente en células grandes pero generalmente no se ve ninguno.

Granulaciones: Contiene moderado número de gránulos azurófilos.

Tamaño: 6 a 18 μ . Puede variar desde el de un eritrocito hasta más grande que el de un monocito.

MONOCITO.

Citoplasma: Color gris claro o azul-gris opaco.

Núcleo: Identado o con pliegues encimados, color pálido. La cromatina está en finos filamentos. No tiene nucléolos.

Tamaño: 12 a 18 μ .

RETICULOCITO.

Como resultado de la expulsión del núcleo, el normoblasto ortocromático se transforma en reticulocito, debido a que una pequeña cantidad de RNA queda en el citoplasma. Este vestigio toma forma granular o de filamentos reticulares cuando se tiñen con colorantes como el azul de cresil brillante o nuevo azul de metileno.

ERITROCITO.

La forma del eritrocito maduro es la de un disco biconcavo. Tiene diámetro que varía de 7.2 a 7.9 $m\mu$ con diferencias no mayores de media micra. El volumen promedio del eritrocito normal es de 87 fl (80-96).

PLAQUETAS.

Tamaño 2 a 3 $m\mu$ de diámetro

Se pueden observar 2 zonas: la central granular, denominada "granulómero" y periférica llamada "hialómero".

Con la tinción de Wright, el granulómero toma un color morado.

IX.- APLICACIONES CLINICAS DE LAS TECNI-
CAS DE CULTIVO DE CELULAS HEMATOPO-
YETICAS IN-VITRO.

IX.- APLICACIONES CLINICAS

LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA.

Los cultivos de células de médula o sangre periférica de pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC), antes del tratamiento, producen colonias y grupos de células constituidos por neutrófilos y monocitos de un tamaño y proporción normales. Las células de la colonia se diferencian a metamielocitos y leucocitos polimorfonucleares. A través del tiempo, aparecen los monocitos y macrófagos, quizá un poco antes comparado con colonias normales.

Hay algunas anormalidades características de las células formadoras de colonias en estos pacientes: a) la presencia de las células formadoras de colonias es muy alta, particularmente en la sangre donde los niveles son 2000 veces mayores que en sujetos normales, b) las células formadoras de colonias son de baja densidad, c) sólo una pequeña proporción de células formadoras de colonias está en ciclo celular, o los tiempos de ciclo celular de tales células son anormalmente largos, d) las colonias de células dividiéndose tienen el cromosoma Filadelfia positivo. Estudios han demostrado que los "mielo

blastos", en LMC, son capaces de formar colonias y pueden representar el progenitor celular de la población leucémica.

Después de terapia, los niveles de células formadoras de colonias disminuyen rápidamente a valores normales en sangre periférica, y en menor grado en la médula ósea, pero permanece positivo el cromosoma Filadelfia.

La transformación blástica, es señalada en cultivos de médula por el desarrollo de maduración anormal en colonias y grupos de células, una elevación en la relación grupo-colonia y en casos extremos por pérdida de células formadoras de colonias y algunas veces por la ausencia de crecimiento de todas las células cultivadas. Esos cambios preceden al inicio de transformación blástica, clínicamente aparente por un promedio de 2 a 6 meses.

LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.

El patrón de crecimiento de células de sangre periférica o médula ósea de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda -- (LMA) o Leucemia Mielomonoblástica (LMM) no tratadas, no está relacionado con el tipo celular morfológico predominante en la población leucémica. In vitro, las células de médula o sangre de pacientes no tratados son incapaces de formar una única colonia granulocítica. En su lugar las células leucémicas pueden

formar pequeños grupos (3 a 20 células), grupos grandes (3 a 40 células), o permanecer sin proliferar como células dispersas solas en el medio de agar. La eficiencia clonal o la frecuencia de células proliferando varía ampliamente entre poblaciones leucémicas de diferentes pacientes. Al igual que las células de pacientes con LMC, las células de pacientes con LMA, que proliferan in vitro son de baja densidad y con un ciclo celular anormal.

Muchos investigadores están de acuerdo en que las células de pacientes con LMA, que crecen in vitro, son incapaces de diferenciarse normalmente, siendo la anormalidad más común el arresto en la maduración, pero también se pueden observar patrones o bizarros de diferenciación. Las células de médula ósea de pacientes con LMA en remisión clínica completa produce un patrón normal de colonias y grupos en medios de cultivo.

Una observación interesante es que las células leucémicas de pacientes con LMC o aguda, son dependientes de factor estimulante de colonias granulocito-macrófago para proliferar. En la ausencia de una concentración adecuada de este factor en el medio de cultivo, las células son incapaces de proliferar; la dependencia persiste a lo largo de la duración de la enfermedad.

Existe evidencia que los niveles de factor estimulan

te de colonias macrófago-granulocito están elevados en el suero y orina en pacientes con LMC y LMA. Se encuentran particularmente más elevados en pacientes con LMC en fase blástica.

Una interesante correlación se ha observado en el patrón de crecimiento in vitro de células de pacientes con LMA y la respuesta a la inducción de la remisión por quimioterapia. En general, pacientes cuyas células forman grupos pequeños tienen una más alta probabilidad de conseguir una remisión, que aquellos cuyas células forman grupos grandes o no presentan -- formación de colonias con una alta relación grupo-colonia.

ENFERMEDADES MIELOPROLIFERATIVAS.

En un gran número de estudios se ha examinado el crecimiento característico de células de médula y sangre periférica de pacientes con anemia aplástica, hemoglobinuria paroxística nocturna y policitemia vera. En general, las células de tales pacientes muestran uno o más defectos en el patrón de crecimiento. Las células formadoras de colonias pueden ser de baja densidad, los cultivos se pueden desarrollar con un número reducido de colonias y elevada relación grupo-colonia o en --- ejemplos extremos, las células formadoras de colonias pueden -- estar ausentes de la médula. También pueden existir anomalías en la diferenciación de las células que proliferan in vitro.

Los patrones de crecimiento de las células de pacientes quienes subsecuentemente desarrollan LMA entre los siguientes 2 a 6 meses, sugieren la aparición de sucesiones clonales en poblaciones granulopoyéticas medulares con más poblaciones progresivamente anormales suplantando o suprimiendo poblaciones preexistentes, hasta que finalmente una clona leucémica -- surge. El desarrollo de dos o más de las anormalidades parecen ser un signo desfavorable y usualmente es seguido de LMA entre 2 a 6 meses.

FORMACION DE COLONIAS EOSINOFILAS.

Aún cuando las colonias eosinófilas se desarrollan - en cultivos de médula humana o sangre periférica, estimuladas - una u otra con sangre periférica o con medio condicionado con placenta, las colonias eosinófilas se desarrollan más lentamente que las colonias de neutrófilos y monocitos y tienen su alcance máximo aproximadamente al día 14 de incubación.

Las colonias eosinófilas se caracterizan por su morfología compacta, no se pueden distinguir de otras colonias -- en la caja de cultivo. Para contarlas separadamente, las colonias eosinófilas deben ser removidas una por una y teñidas o - se debe teñir el cultivo completo en la caja. Esos procedimientos son laboriosos y como consecuencia, no se ha trabajado mucho sobre niveles de células formadoras de colonias eosinófi -

las en médula ósea.

Partiendo de observaciones en el laboratorio, dos -- puntos son de interés: a) los mieloblastos normales de baja -- densidad en LMC, son capaces de generar algunas colonias eosinófilas además de las nuerosas colonias neutrófilas y monocí-- ticas. Esto sugiere que eosinófilos pueden también ser miem -- bros de la clona cromosoma Filadelfia positivo, pero esto nece -- sita nuevas investigaciones, b) las células formadoras de colo -- nias eosinófilas no son detectables en la médula de pacientes -- con LMA, sin tratamiento o en recaída. Así, la supresión de po -- blaciones hematopoyéticas normales por la clona leucémica in -- cluye también poblaciones eosinófilas. Por otro lado, las célu -- las formadoras de grupos de eosinófilos están presentes y una -- pregunta debe ser planteada, si esas células podrían pertene -- cer a la clona leucémica. En remisión clínica, los niveles de -- células formadoras de colonias eosinófilas son normales o ele -- vadas.

FORMACION DE COLONIAS ERITROIDES.

Hasta ahora, la capacidad de crecimiento de colonias de células eritropoyéticas a partir de células progenitoras -- en la médula, se ha aplicado en estudios sobre la naturaleza -- de las anormalidades en poblaciones eritropoyéticas, en pacien -- tes con anemia aplástica, anemia hemolítica o anemia por defi --

ciencias. Claramente las técnicas pueden tener muchas aplicaciones en la investigación de esas enfermedades.

En la actualidad, una de las aplicaciones clínicas-- está basada en la interesante observación de que el crecimiento in vitro de colonias eritroides, de médula de pacientes con policitemia vera es aparentemente autónomo y no requiere estimulación por eritropoyetina. Esto ha sido usado como una prueba discriminatoria entre policitemia vera y policitemia secundaria, ya que en ésta última, la proliferación eritropoyética depende de eritropoyetina exógena al igual que en poblaciones normales.

La situación de la policitemia vera es de considerable interés. Un número de observaciones plantean la probabilidad que la policitemia vera sea una neoplasia de células eritropoyéticas, aunque de un tipo lentamente progresivo.

COLONIAS LINFOIDES.

Existen relativamente pocos estudios que muestran -- las potenciales aplicaciones de técnicas de clonas para linfocitos T o B en pacientes. En una de ellas, se reportó, que las células formadoras de colonias de linfocitos T eran anormalmente bajas en la sangre de pacientes con cáncer y en otro estudio,-- se demostró que la adición de suero de pacientes con enferme--

dad de Hodgkin, linfomasarcoma o linfomahistiocítico, aumentó -- grandemente la formación de colonias en cultivos de linfocitos B de ratón donde la adición de suero normal actuaba como inhibidor. Hay posibilidad que esos experimentos puedan detectar -- algún regulador circulante de proliferación linfocítica análogo al factor estimulante de colonias granulocito-macrófago.

FUTURAS APLICACIONES CLINICAS.

Las técnicas de clonas in vitro, pueden ser usadas - para analizar poblaciones hematopoyéticas en cualquier padecimiento en el cual esté involucrada una población particular. -- Además, las técnicas pueden ser usadas para controlar la viabilidad de las células almacenadas para subsecuente transfusión. Puesto que los sistemas de cultivo pueden también usarse para detectar y medir niveles de varios reguladores específicos que controlan la hematopoyesis, se usarán en futuros estudios.

En el presente, no existen técnicas satisfactorias - para crecimiento de colonias humanas de megacariocitos, linfocitos B o células tronculares, pero este campo se está desarrollando tan rápidamente que estarán disponibles en un futuro próximo.

X.- R E S U M E N

X.- R E S U M E N

La producción de las células sanguíneas se lleva a cabo a partir de las células tronculares, y éstas, para mantener la homeostasis tiene la capacidad de auto-renovación.

Para obtener información sobre las células tronculares se han ideado métodos de cultivo in vivo e in vitro, basados en la formación de colonias.

Se considera como la célula hematopoyética más primitiva a la célula troncular pluripotente "S", ya que de ella se derivan la célula que da origen a colonias granulopoyéticas-monocíticas, la célula progenitora de células eritroides formando colonias dependientes de eritropoyetina y la célula comprometida a originar colonias de megacariocitos dependientes de trombopoyetina.

Un microambiente hematopoyético es esencial para la función normal de las células tronculares hematopoyéticas.

Con los métodos actuales, es posible identificar y enumerar las subpoblaciones de células progenitoras hematopoyéticas y medir niveles de factores reguladores específicos.

Los métodos de cultivo de células in vitro, se pueden usar para analizar poblaciones hematopoyéticas en padecimientos tales como leucemia granulocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, anemia aplástica, hemoglobinuria paroxística nocturna y policitemia vera o cualquier padecimiento en el cual esté involucrada una población particular así como medir niveles de reguladores específicos que controlan la hematopoyésis.

XI.- B I B L I O G R A F I A

XI.- B I B L I O G R A F I A

- 1.- DONIACH, J. & PELE, S.R.
Autorradiograph Technique
J. Radiol. 23: 184, (1950).
- 2.- HOWARD, A. & PELE, S.R.
Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and --
irradiated cells and ITC relation to cromosome brea-
kage.
Heredity (Supp) 6: 261, (1953).
- 3.- MUELLER, G.C.
Biochemical perspectives of the G₁ and S intervals--
in the replication cycle of animal cells: a study in
the control of cell growth in Baserga, R. ed. The --
cycle and cancer.
New York, Marcel Dekker, 1971, p. 269.
- 4.- ALPEN, E.L. & JOHNSON, M.E.
DNA synthetic rate and content of nucleated erythroid
cells.
Exper. Cell Research. 47: 177, (1967).
- 5.- QUASTLER, H.S. & SHERMAN, F.G.
Cell population kinetics in intestal epithelium of -
mouse.
Exper. Cell Research. 17:420, (1959).

- 6.- WIMBER, D.E.
Methods of studying cell proliferation with emphasis on DNA labels. In Lamerton, L.F. & Fry R.M. eds. --- Cell Proliferation. Philadelphia, F.A. Davis, 1963, - p. 1.
- 7.- LAJTHA, L.G.
On the concept of the cell cycle.
J. Cell Comp. Physiol. 60 (Supp.1): 143, (1963).
- 8.- QUASTLER, H.
The análisis of cell population kinetics. In Lamer-- ton L. F. & Fry R.J.M., eds.: Cell Proliferation. -- Philadelphia F.A. Davis, 1963. p. 18.
- 9.- LIPKIN, M.
The proliferative cycle of mammalian cells. In Baser ga, R. ed.: The cycle and cancer. New York, Marcel-- Dekker, 1971, p. 6.
- 10.- BURNS, F.J. & TANNOCH, I.F.
On the existence of a Go phase in the cell cycle.
Cell Tiss Kinet. 3: 321, (1970).
- 11.- GREENBERG, M.L. CHANANA, A.D. CRONKITE, E.P. et. al.
The generation time of human leukemic mieloblasts.
J. Lab. Invest. 26: 245, (1972).
- 12.- BLOOM, W. & BARTELMEZ, G.W.
Hemopoiesis in young human embryos.
Am. J. Anat. 67: 21, (1940).

- 13.- MAXIMOV, A.A.
Relation of blood cells to connective tissue and endothelium.
Physiol. Rev. 4: 533, (1924).
- 14.- KNOLL, W. & PINGEL, E.
Der gang der erythropoese beim menscheichen embryo.
Acta Haemat. (Basel) 2: 369, (1949).
- 15.- HECHT, F.
Predominance of haemoglobin gower in early human embryonic development.
Science 152: 91, (1966).
- 16.- THOMAS, D.B. & YOFFEY, J.M.
Human foetal haematopoiesis. 1.- The cellular composition of foetal blood.
Br. J. Haematol. 8: 290, (1962).
- 17.- PLAYFAIR, J.H.L., WOLFENDALE, M.R. & KAY, H.E.M.
The leucocytes of peripheral blood in the human foetus.
Br. J. Haematol 9: 336, (1963).
- 18.- FINNE, P.H.
Erythropoietin production in fetal hypoxia and in anemic uremic patients.
Am. N.Y. Acad. SCL. 149: 497, (1968).
- 19.- BOGGS, D. R.
The hematopoietic microenvironment.
N. Engl. J. Med.: 302, 1359, (1980).

- 20.- SABIN, F.R.
Changes in the bone marrow and blood cells of developing rabbits.
J. Exp. Med. 64: 97, (1936).
- 21.- DOWNER, H,
Handbook of hematology.
New York. P.B. Hoerber, Inc. (1938).
- 22.- LEWIS, J.P. & TROUBAUGH, F.E. Jr.
Hematopoietic Stem Cells.
Nature 204: 589, (1964).
- 23.- FOWLER, J.H., WU, A.M., TILL, J.E., McCULLOCH E.A., &
SIMINOVITCH, L. The cellular composition of hemopoietic J. Cell. Physiol. 69: 65, (1967)
- 24.- BECKER, A.J., McCULLOCH, E.A. & TILL, J.E.
Cytological demonstration of the clonal nature of --
spleen colonies derived from mouse marrow cells.
Nature 197: 452, (1963).
- 25.- WU, A.M., TILL, J.E., SIMINOVITCH, L. & McCULLOCH, E.
A.
A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells.
J. Cell. Physiol. 69; 177, (1967).
- 26.- LAJTHA, L.G.
Haematopoietic stem cells.
Br. J. Haematol. 29: 529, (1975).
- 27.- QUESENBERRY, M.D. & LEE LEVITT, M.D.
Hematopoietic stem cells.
N. ENGL. J. Med. 301:15, (1979)

- 28.- ODELL, T.T. & JACKSON C.W.
Effects of thrombocytopenia on megacariocitopoyesis.
Br. J. Haematol. 17: 91, (1969).
- 29.- WAINCHENKER, W., BOUGUET J., GUICHARD J. & BRETON-
GORITUS.
Megakaryocyte colony formation from human bone ma --
rrow precursors.
Blood 54: 4, (1979)
- 30.- JACKSON, C.W.
Cholinesterase as a possible marker for early cells-
of the megakaryocytic series.
Blood, 42: 413, (1973).
- 31.- TILL, J.E. & McCULLOCH, E.A.
A direct measurement of the radiation sensitivity of
normal mouse bone marrow cells.
Rad. Research, 14: 213, (1961).
- 32.- SIMINOVITCH, L., McCULLOCH, E.A. & TILL, J.E.
The distribution of colony-forming cells among spleen
colonies.
J. Cell. and Comp. Physiol. 62: 327 ().
- 33.- SCHOFIELD, R.
The pluripotent Stem Cell.
Clin. Haemat. 8 (2): 221, (1979).
- 34.- DONALD METCALF, D.
In-vitro techniques for hemopoietic cells: clinical--
applications.
Ann. Int. Med. 87: 483, (1977).

- 35.- PIKE, B.L. & ROBINSON W.A.
Human bone marrow colony growth in agar gel.
Cell physiol. 76: 77, (1970).
- 36.- HORLAND, S.R., WOLMAN, J.J., MURPHY, Jr. MOORE.
Proliferation of erythroid colonies in semi-solid --
agar.
Br. Haematol. 36: 495, (1977)
- 37.- MIALE, J.B.
Laboratory Medicine Hematology.
Ed. Mosby.
15a. ed.
Saint Louis, 1977.
- 38.- WINTROBE, M.M.
Clinical Hematology.
Ed. Lea & Febiger.
7a. ed.
Philadelphia, 1975.

