

00361
6
2y



Universidad Nacional Autónoma
de México

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIOS SOBRE LA ERITROPOYESIS EN EL CONEJO
DURANTE LA RECUPERACION DE UNA ANEMIA CRONICA
INDUCIDA EXPERIMENTALMENTE

T E S I S

para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

p r e s e n t a

Héctor de Jesús Mayani Viveros

México, D. F.

TESIS CON
CALA DE ORIGEN

1986



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.

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS	1
ANTECEDENTES	2
INTRODUCCION	4
OBJETIVOS	20
MATERIALES Y METODOS	22
RESULTADOS	29
DISCUSION	68
CONCLUSIONES	81
REFERENCIAS	83

ABREVIATURAS

CFU-L-M	=	Unidad formadora de colonias linfoides y mieloides.
CFU - S	=	Unidad formadora de colonias en el bazo
CFU-M	=	Unidad formadora de colonias megacariocíticas
CFU-G-M	=	Unidad formadora de colonias de granulocitos y macrófagos
BFU-E	=	Unidad expansiva de colonias eritroides
CFU-E	=	Unidad formadora de colonias eritroides
Gr	=	Células de la serie granulocítica
Mn	=	Células Mononucleares
Nb	=	Normoblastos (eritroblastos)
PN	=	Pronormoblasto
NB	=	Normoblasto basófilo
NP	=	Normoblasto policromatófilo
NO	=	Normoblasto ortocromático
R	=	Reticulocito
E	=	Eritrocito
NCR	=	Número de células rojas circulantes
Hb	=	Hemoglobina
Htc	=	Hematocrito
HMC	=	Hb media corpuscular
CMHC	=	Concentración media de Hb corpuscular
VCM	=	Volumen corpuscular medio
CNMO	=	Células nucleadas de médula ósea
PRE	=	Población de reticulocitos y eritrocitos en médula ósea

ANTECEDENTES:

Es indudable que por su origen, su diversidad celular y las distintas funciones que lleva a cabo, la sangre es un tejido complejo, cuyo estudio, además de fascinante, es fundamental para la medicina y para muchas áreas de la biología.

En los vertebrados, la sangre es responsable del transporte de oxígeno hacia todos los órganos y tejidos del cuerpo (1); las células que intervienen directamente en este proceso son los eritrocitos, los cuales contienen en su interior a la hemoglobina, proteína que une a dicho gas en los sitios donde la presión parcial del mismo es alta y lo libera donde es baja, permitiendo así, la oxigenación de todas las células del organismo (2,3).

Los leucocitos participan activamente en el reconocimiento de agentes extraños al organismo: los linfocitos son los encargados de la síntesis de anticuerpos, mientras que los monocitos y los distintos tipos de granulocitos se encargan de fagocitar a dichos agentes (4).

Por otra parte, la sangre actúa como un tejido de comunicación entre diferentes órganos, transportando hormonas, metabolitos, nutrientes, etc., desde los sitios donde son producidos, liberados o absorbidos, hasta los órganos donde serán utilizados, almacenados o degradados (5).

Desde hace varios años se sabe que alteraciones en el tejido sanguíneo dan como resultado trastornos fisiológicos a distintos niveles, pudiendo llegar a ocasionar, en algunos casos, la muerte del individuo. Dichas alteraciones involucran, generalmente, al sistema hematopoyético; así, enfermedades como la policitemia vera, policitemia secundaria, anemia aplásica, anemia sideroblástica, talasemia, metaplasia mieloide, leucemia mieloide, etc., tienen su origen a nivel

de los precursores de las células circulantes (6,7), por lo que desde el punto de vista médico es absolutamente necesario el estudio del sistema generador de las células sanguíneas.

Ahora bien, desde el punto de vista de la diferenciación celular, la hematopoyesis constituye un modelo muy interesante, pues diversos estudios han demostrado que las plaquetas, los eritrocitos y los distintos tipos de leucocitos se originan a partir de un precursor común (8).

Actualmente, laboratorios de diversas partes del mundo realizan investigaciones sobre diferentes aspectos de la hematopoyesis, sin embargo, ésta continúa encerrando una gran cantidad de incógnitas, ya que son numerosos, variados y complejos los factores y mecanismos involucrados en la producción de todos los tipos celulares sanguíneos.

Desde hace más de 10 años, en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias, U.N.A.M., se realizan estudios encaminados a conocer los procesos bioquímicos y celulares involucrados en la formación de la sangre, particularmente en la producción de los eritrocitos, de tal forma que se ha logrado caracterizar el comportamiento del sistema eritropoyético del conejo durante un estado de anemia crónica inducida por sangrado.

Sin embargo, ¿cómo reacciona dicho sistema una vez que el estímulo del sangrado deja de presentarse?. Esta es la pregunta central que nos ha llevado a la realización del presente trabajo. En él hemos estudiado los cambios que ocurren tanto en sangre como en médula ósea, desde que el organismo deja de ser sangrado, hasta que alcanza las condiciones normales. Lo anterior nos ha permitido conocer más a fondo ciertos aspectos de la regulación y cinética de la eritropoyesis.

INTRODUCCION

Las células presentes en la circulación sanguínea han sido clasificadas en tres grandes grupos: células rojas o eritrocitos, plaquetas o trombocitos y células blancas o leucocitos (9). Estas últimas, a su vez, se dividen en cinco tipos diferentes: Eosinófilos, basófilos, neutrófilos, monocitos y linfocitos (10). Todas ellas tienen periodos de vida en circulación relativamente cortos y además son incapaces de dividirse y proliferar (a excepción de los linfocitos). Lo anterior hace necesaria la presencia de un mecanismo generador de dichas células, que lleve un aporte continuo hacia la circulación, de tal forma que se mantengan las cantidades adecuadas de los distintos tipos celulares. Dicho mecanismo se conoce con el nombre de hematopoyesis y los centros donde se lleva a cabo son los llamados órganos hematopoyéticos (11).

La hematopoyesis durante el desarrollo del mamífero

La hematopoyesis ha sido ampliamente estudiada en diversas especies de mamíferos, siendo particularmente abundantes los trabajos hechos en ratones, conejos, perros y en el hombre.

En todo mamífero la actividad hematopoyética se inicia antes del nacimiento y permanece hasta la muerte del organismo, existiendo distintos periodos hematopoyéticos durante el desarrollo (11).

La hematopoyesis prenatal comprende tres periodos. El primero de ellos es el llamado periodo Mesoblástico, que se presenta durante la etapa embrionaria. 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 (12).

De acuerdo con Maximow, las células de dichas islas pueden diferenciarse en dos direcciones: las células periféricas dan origen a las paredes de los primeros conductos sanguíneos, mientras que las células centrales se convierten en las células hematopoyéticas primitivas (13). Se ha propuesto que las células pluripotenciales de las islas sanguíneas del saco vitelino son las únicas células hematopoyéticas formadas de novo (14), teniendo la capacidad de migrar a través de la circulación y colonizar órganos específicos, haciéndolos, así, órganos hematopoyéticos.

El segundo periodo es el periodo hepático, el cual ocupa alrededor del 80% de la actividad hematopoyética durante la gestación en los ratones y especies afines (15). En los humanos es el principal centro hematopoyético del segundo al sexto mes. Al mismo tiempo que en el hígado, hay hematopoyesis en el bazo y en el timo, sin embargo, en ellos la actividad hematopoyética es de menor duración y magnitud (12).

El periodo final de la hematopoyesis prenatal es el periodo mielóide, que tiene lugar en la médula ósea. En el humano, este periodo se inicia alrededor del quinto mes y es el más importante durante los últimos tres meses de gestación (12).

Durante el desarrollo post-natal de los mamíferos, la actividad hematopoyética se localiza en dos tipos de tejidos, el linfático y el mielóide. El primero está constituido por los nódulos linfáticos no encapsulados, los ganglios linfáticos, el bazo y el timo, siendo todos ellos centros predominantemente linfopoyéticos (1). Por su parte, el tejido mielóide corresponde a la médula ósea, donde se producen eritrocitos, plaquetas, granulocitos, monocitos y linfocitos

(9).

Han sido descritos dos tipos de médula ósea, la médula ósea roja y la amarilla (1,9). El primero de ellos es también llamado médula ósea activa o hematopoyética, en ella se producen todas las células sanguíneas, y su color es debido al contenido de eritrocitos y sus precursores. La médula amarilla o inactiva está compuesta por células adiposas y no interviene, según parece, en la producción de las células de la sangre.

Al nacer, casi la totalidad de la médula ósea de los mamíferos es roja; conforme el organismo crece y se desarrolla, la médula amarilla se va extendiendo, de tal forma que la médula roja queda confinada a los huesos del esqueleto axial (esternón, costillas y vértebras) y a los extremos proximales de los huesos largos (16). Sin embargo, la médula roja puede reexpandirse cuando ciertas condiciones del organismo demandan un incremento en la producción de células sanguíneas (17,18,19).

Estructura de la Médula Osea

La médula ósea es el más complejo y, por diversas razones, el más importante de los órganos hematopoyéticos en el mamífero adulto (11). Está formada por dos componentes, el estroma medular y células hematopoyéticas.

Dentro de los elementos del estroma se encuentran tres tipos celulares: células osteógenas, células endoteliales y células perivasculares (reticulares). Todas ellas en conjunto, y apoyadas en una matriz extracelular constituida por colágena, proporcionan el armazón principal de sostén para la médula ósea (1). Dicho armazón consiste en una red, muy bien organizada, de conductos sanguíneos

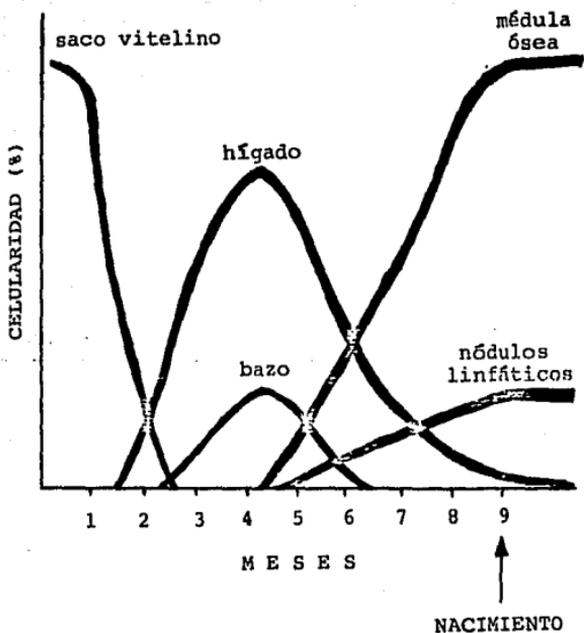


FIG. 1 ORGANOS HEMATOPOYETICOS EN EL HUMANO DURANTE EL DESARROLLO PRENATAL. (6)

(venas, arterias y sinusoides), los cuales dejan espacios en donde se desarrollan las células hematopoyéticas (20,21).

Los sinusoides actúan como medios de conexión ente los conductos arteriales y venosos. Son mucho más anchos que los capilares ordinarios, presentando una membrana basal muy delgada y discontinua, a través de la cual, salen las células sanguíneas maduras hacia la circulación (20). El estroma no sólo actúa como medio de soporte para la hematopoyesis, sino que desempeña un papel muy activo en la regulación de ésta.

La Hematopoyesis: Modelos y Regulación.

Desde finales del siglo pasado las células hematopoyéticas han sido objeto de diversos estudios, e incluso a principios del presente, se formularon modelos para explicar su origen (13). Algunos de ellos proponían que todas las células sanguíneas se forman apartir de un precursor común, mientras que otros establecen que cada una de ellas tiene su origen en un precursor diferente. Las respuestas a este problema comenzaron a surgir en 1961, con los trabajos de Till y McCulloch (22), los cuales, además, marcaron la pauta a seguir en las investigaciones modernas sobre la hematopoyesis.

Dichos trabajos tienen antecedentes fundamentales en los experimentos realizados por Jacobson y cols. (23,24) y Ford y cols. (25); Estos investigadores demostraron que el bazo desempeña un papel primordial en la recuperación y sobrevivencia de ratones que habían sido irradiados, y que lo anterior era debido a la actividad hematopoyética de dicho órgano.

Till y McCulloch establecieron una técnica que permite estudiar

in vivo, el origen de las células hematopoyéticas. La técnica consiste en lo siguiente: Cuando un ratón es expuesto a una dosis potencialmente letal de radiaciones ionizantes, los tejidos hematopoyéticos del mismo son suprimidos del todo. Si la operación anterior va seguida de la inyección de una suspensión de 10^5 células isogénicas normales de médula ósea, el animal sobrevive y, aproximadamente ocho días después, se encuentran nódulos independientes en el bazo. Cada nódulo consta de diversas clases de células hematopoyéticas reconocibles y de sus precursoras. Poco después fue demostrado que cada colonia surge de una sola célula (26).

Igualmente importante fue el hallazgo de que en dichas colonias estaban presentes células capaces de dar origen a nuevas colonias, al ser inyectadas a ratones irradiados (27).

Fue así como se dedujo la existencia de un tipo celular pluripotencial en la médula ósea de ratones, capaz de dar origen a las diversas clases de células hematopoyéticas y además, capaz de autoreplicarse; dicha célula fue denominada Unidad Formadora de Colonias en el Bazo (CFU-S, por sus siglas en inglés) (28). Quedó establecido entonces, que las células madre hematopoyéticas deben cumplir con dos funciones principales: 1) Diferenciarse en los elementos sanguíneos maduros y 2) autorrenovarse para mantener la población de células madre (29).

En circunstancias normales, la gran mayoría de las CFU-S se encuentran en médula ósea, de un 2% a un 4% están presentes en el bazo y sólo un pequeño número en la sangre periférica (28). Sin embargo, es bien sabido que bajo ciertas condiciones fisiológicas puede presentarse una migración masiva de CFU-S a través del torrente sanguíneo, de tal manera que dicha proporción cambie (30,31).

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 45000 CFU-S y 7000 en el bazo (11); otros estiman que por cada 10^5 células nucleadas de médula ósea hay entre 6 y 56 CFU-S (32). Por otra parte, se ha demostrado que la distribución de CFU-S en los huesos no es homogénea, sino que presenta un patrón determinado (33,34).

Con respecto a la caracterización morfológica de las CFU-S, los problemas han sido aún mayores, pues, como hemos visto, su frecuencia en los distintos órganos hematopoyéticos es muy baja, ente 0.2 y 0.75 (35). Sin embargo, se han establecido técnicas que han permitido obtener fracciones enriquecidas de CFU-S a partir de médula ósea de ratones (36,37), de tal manera que se sabe que son células mononucleares, muy semejantes a los linfocitos y con un diámetro de 6-7 . Existen también, trabajos llevados a cabo en el hombre, que sugieren que dichas células son parecidas a los linfocitos circulantes, aunque de mayor tamaño (38).

Los estudios referentes a la composición celular de las colonias formadas en el bazo, demostraron la total ausencia de células linfoides (39), lo que en un principio creó un gran desconcierto, pues el origen de estas células continuaba siendo una incógnita. Sin embargo, Abramson, Miller y Phillips en 1977 (40) y más recientemente Keller y Phillips (41) han demostrado la presencia, tanto in vivo como in vitro, de una población celular anterior a las CFU-S capaz de dar origen a éstas y a los precursores linfoides y que ha sido denominada CFU-L-M.

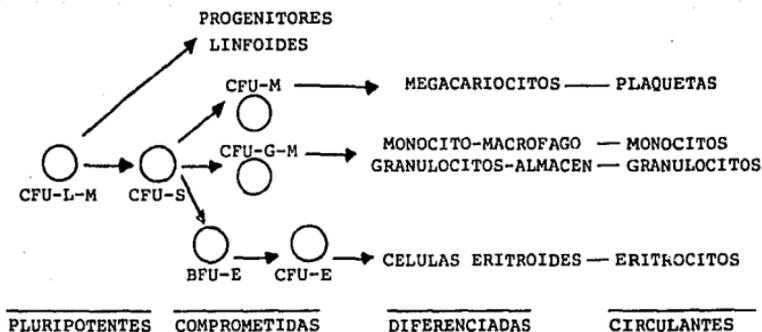
En los últimos quince años, el estudio de la hematopoyesis in

vitro, empleando distintos tipos de medios de cultivo, ha alcanzado gran relevancia (42), de tal forma que ha sido posible desarrollar modelos muy completos sobre las diferentes líneas de diferenciación.

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 realizando innumerables trabajos con el fin de conocer los mecanismos y factores reguladores de la hematopoyesis (43). Al respecto, han sido identificados y caracterizados diversos factores involucrados en la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas, sin embargo, es importante indicar que muchos de los estudios han sido hechos in vitro, por lo que no necesariamente reflejan de manera total lo que ocurre en el organismo.

Se sabe que la proliferación de las células hematopoyéticas pluripotenciales es regulada por factores tanto inhibidores como estimuladores (44,45), los cuales son producidos por células que forman parte de los que Curry y Trentin denominaron Microambiente Inductivo Hematopoyético (46). Ahora bien, para explicar la diferenciación de dichas células existen dos modelos: el primero de ellos establece que la diferenciación es un fenómeno estocástico, esto es, que al azar las CFU-S siguen una u otra línea hematopoyética. Por su parte, el segundo modelo propone que la diferenciación de las células pluripotentes es regulada por factores humorales (44).

Recientemente han sido publicados trabajos en los que se demuestra que el estroma medular juega un papel muy importante tanto en la proliferación como en la diferenciación de las células madre hematopoyéticas (47,48).



- 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
- BFU-E Unidad Expansiva de Colonias Eritroides
- CFU-E Unidad Formadora de Colonias Eritroides

FIG. 2: MODELO DE LA HEMATOPOYESIS (8)

Con respecto a la regulación a nivel de las células comprometidas y diferenciadas, el panorama es bastante complejo ya que existen diversos tipos de interacciones celulares que incluso, involucran a las células circulantes (49).

La regulación de la megacariocitopoyesis comprende la participación de factores humorales, trombopoyetinas, que actúan a nivel de las CFU-M. Son producidas en el riñón y probablemente también por las mismas plaquetas (50).

En la regulación de la granulomonopoyesis está involucrado un grupo de sustancias al que se le ha llamado Actividad Estimuladora de Colonias, el cual es producido tanto por los linfocitos T como por los macrófagos y monocitos; dichas sustancias actúan sobre las CFU-GM estimulando su proliferación (49,51). Se sabe también, de la presencia de factores que tienen efectos negativos en la producción de granulocitos y monocitos, algunos de ellos son calonas, producidas por los neutrófilos circulantes (49).

La linfopoyesis también ha sido objeto de numerosos estudios. En ella participan diversos factores, algunos de los cuales todavía no han sido bien caracterizados. El esquema general de esta línea hematopoyética parece indicar que existen, a su vez, dos vías de diferenciación, una de los linfocitos T y otra de los linfocitos B (40,41,52).

La Eritropoyesis

La eritropoyesis es, sin duda, la línea de diferenciación hematopoyética mejor conocida. Comprende todo un conjunto de procesos bioquímicos y celulares que dan por resultado la producción adecuada de eritrocitos (53). El estudio de esta vía tiene sus orígenes en el

siglo pasado, cuando en 1868 Neumann publicó sus resultados en los que establecía que los eritrocitos humanos se originan de células precursoras nucleadas presentes en la médula ósea (54).

Desde la primera mitad de este siglo se sabe que existen cinco estadios anteriores al eritrocito circulante, todos ellos son morfológicamente reconocibles, lo que ha permitido su completa caracterización (12); sin embargo, gracias a las técnicas desarrolladas en los últimos 15 años para el estudio de la eritropoyesis, se ha logrado detectar y caracterizar funcionalmente un grupo de precursores eritroides anterior a los ya mencionados, pero no identificable morfológicamente (55).

Los trabajos de Axelrad y cols. (56,57) a mediados de los 70's demostraron que este último grupo de precursores está formado por, al menos, dos poblaciones celulares diferentes: las Unidades Expansivas de Colonias Eritroides (BFU-E) y las Unidades Formadoras de Colonias Eritroides (CFU-E). Ambas poblaciones son sensibles a la eritropoyetina, hormona involucrada en la regulación eritropoyética (58).

Las BFU-E tienen características físicas y funcionales que las sitúan cerca de las CFU-S. Se ha demostrado que su tamaño y densidad es muy similar a lo reportado para estas últimas (59). Por otra parte, la correlación entre el análisis del contenido de CFU-S y el de BFU-E en las colonias particulares del bazo, indica la existencia de una relación íntima entre ambas (55). Todo parece indicar que las BFU-E son descendientes de las CFU-S, las cuales, como es sabido, no son sensibles a la eritropoyetina (60).

Las CFU-E por su parte, se originan de las BFU-E. Esta población

está separada de las células eritroides reconocibles por solo 2 ó 3 generaciones celulares (61), y, a diferencia de las BFU-E, no presentan correlación alguna con las cifras de CFU-S. El tamaño de la población de CFU-E es muy sensible a cambios fisiológicos; en ratones hechos policitémicos a través de hipertransfusiones, los niveles de CFU-E descienden hasta a un 90%, mientras que en ratones anémicos la población aumenta al doble o triple (62). En ambas situaciones la población de BFU-E no cambia significativamente.

A pesar de la caracterización bioquímica y cinética que de ambas poblaciones se ha hecho, su morfología no ha sido claramente establecida. Se ha propuesto que son células de 8 a 12 μ de diámetro con un núcleo irregular y de cromatina dispersa, su citoplasma contiene numerosos ribosomas libres y poco retículo endoplásmico (63).

Las CFU-E directamente originan a los precursores eritroides identificables morfológicamente. Estos han sido caracterizados en el humano (7,9,12,53,54) y en otros mamíferos. En orden creciente de maduración los estadios son: pronormoblasto (PN), normoblasto basófilo (NB), normoblasto policromatófilo (NP), normoblasto ortocromático (NO) y reticulocito. Los cuatro primeros son estadios nucleados, mientras que el último carece de núcleo; el eritrocito de los mamíferos es, por consiguiente una célula anucleada (54).

A lo largo de esta secuencia de maduración se presentan una serie de cambios bioquímicos y morfológicos, como son: a) disminución en el diámetro celular, condensación del núcleo hasta ser expulsado en el estadio de normoblasto ortocromático, incremento en la síntesis y acumulación citoplásmica de hemoglobina, etc. (54,64). Actualmente se han desarrollado técnicas que permiten separar a cada uno de estos estadios y poder, así, realizar una caracterización muy fina de ellos

a nivel molecular (65-69).

Con respecto a la expulsión del núcleo, se ha demostrado que dicho organelo sale completo de la célula, rodeado de un anillo delgado de citoplasma y membrana, sin sufrir ruptura alguna (70). Algunos autores proponen que cuando la acumulación de hemoglobina en el citoplasma llega a una concentración crítica, el núcleo es expulsado (71); por su parte, Tavassoli y Crosby (72) 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, no, produciéndose una ruptura que origina la pérdida del núcleo y la salida del reticulocito a la circulación. Sin embargo, existen datos de que en condiciones de anemia experimental inducida hay una salida masiva de normoblastos a la circulación (73) e incluso de que la expulsión del núcleo puede ocurrir ahí mismo (74).

En el humano, la vida promedio del eritrocito en la circulación es de 120 días. A medida que envejece, su superficie membranal va sufriendo alteraciones, de tal forma que al pasar por órganos como el bazo, es removido de la circulación (1,5,9).

En la figura 3 se presenta el modelo general de la eritropoyesis en el humano, de acuerdo a Lessin y Bessis (54) y a John Paul (63).

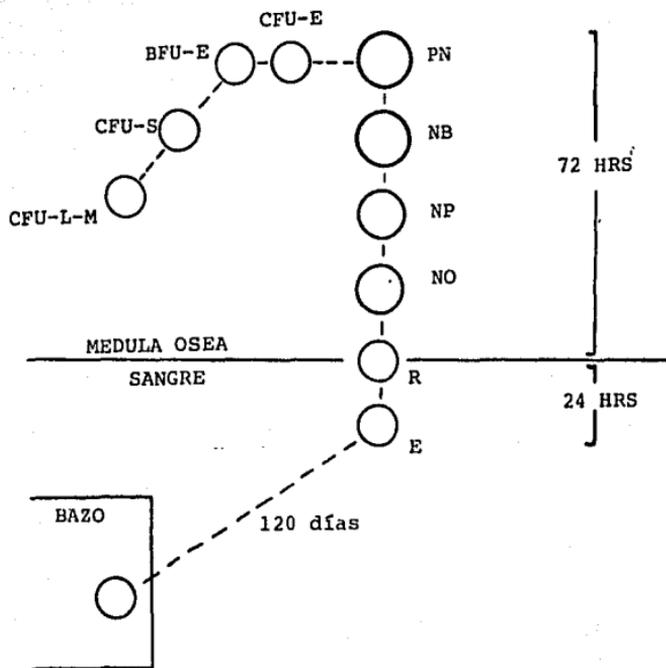


FIG. 3: Modelo de la Eritropoyesis (63)

Regulación de la eritropoyesis:

La presencia de un factor humoral que regula la eritropoyesis fue propuesta por primera vez a principios de siglo y demostrada plenamente en la década de los 50's (55,64,75); dicho factor fue denominado eritropoyetina. Es producido principalmente por el riñón, en respuesta a un contenido bajo de oxígeno en la sangre en relación a la demanda del mismo; se encuentra en el plasma y se elimina por la orina (64).

La eritropoyetina es una glucoproteína de peso molecular aproximado a 34,000 (76). Existen dos formas α y β , ambas con actividad biológica, difiriendo solamente en su composición de carbohidratos (77). Se sabe que las principales células blanco de la eritropoyetina son las CFU-E, aunque se ha demostrado también, que actúa a nivel de algunos de los precursores reconocibles morfológicamente (78). A nivel molecular, la eritropoyetina induce y acelera tanto la transcripción como la traducción de las globinas (77), e interviene en la regulación de la síntesis de hemo (79).

En la década pasada fue descrito otro factor humoral que interviene también en la regulación de la eritropoyesis, sin embargo, éste actúa a nivel de los precursores más inmaduros, esto es, las BFU-E. Este factor es denominado Actividad Promotora de Estallidos (BPA) (80) y parece ser que en realidad la BPA es una familia de factores que actúan conjuntamente induciendo la proliferación de las BFU-E (55). Ha sido demostrado que tanto las células T, como los monocitos son fuentes productoras de BPA (81,82).

Además de la eritropoyetina y la BPA, existen diversos factores involucrados en la regulación eritropoyética, como por ejemplo: el factor estimulador de eritroblastos y las prostaglandinas (77), el

propio hemo (83) y la transferrina (84), aunque se ignora el modo de acción de algunos de ellos.

Los grupos de Zucker, en Nueva York y de Jacobs en Gales, han demostrado que en pacientes con cáncer la eritropoyesis se ve grandemente afectada, debido, probablemente, a la presencia de factores producidos o activados en tales condiciones (85,86).

OBJETIVOS

Desde hace aproximadamente 13 años, en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias, UNAM, se realizan estudios, tanto a nivel bioquímico como celular, sobre los mecanismos de formación de la sangre y de manera particular, sobre las vías metabólicas del hierro para su incorporación en la biosíntesis de la hemoglobina.

Para tales estudios, se ha desarrollado un sistema in vivo en el conejo, al cual, se le induce una anemia crónica por sangrado diario, de tal forma que la eritropoyesis se amplifica considerablemente (87). Ante el estímulo del sangrado, se presenta una respuesta bastante compleja en la que están involucrados cambios en la actividad y concentración de algunas proteínas séricas (88,89), así como en la cinética y producción de células nucleadas tanto en la sangre (73) como en la médula ósea (90). Además, se ha demostrado que la máxima respuesta, en cuanto a producción de células rojas se refiere, se alcanza cuando son extraídos diariamente de 9 a 12 ml de sangre por kg de peso del animal (84). Después de 10 días de sangrado, el sistema llega a una nueva etapa de equilibrio, en la que permanece mientras esté presente el estímulo.

Ahora bien, buscando ampliar nuestro conocimiento sobre el sistema hematopoyético del conejo, he decidido estudiar su comportamiento durante el período de recuperación. Si se deja de sangrar al animal, es de esperarse que regrese a las condiciones normales, sin embargo, ¿en cuánto tiempo lo hace?, ¿qué cinética siguen los distintos parámetros hematológicos?, ¿qué ocurre a nivel de las poblaciones celulares hematopoyéticas de la médula ósea?, estas son algunas de las preguntas que busco contestar por medio del presente trabajo. En él, he estudiado los cambios que se presentan

tanto en la sangre como en la médula ósea, desde que el conejo deja de ser sangrado, hasta que alcanza las condiciones normales, enfocando mi atención de manera especial, a la eritropoyesis.

a) CARACTERISTICAS DE LOS CONEJOS

Para todos los experimentos se utilizaron conejos Nueva Zelanda blancos, cuyas edades fluctuaban entre los 4 y 10 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 ANEMIA

Los conejos fueron sangrados diariamente por punción cardíaca. 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. La sangre se colectó en jeringas de vidrio de 30 y 50 ml, previamente enjuagadas con ácido etilendinitrilo tetraacético,, sal disódica (Tritriplex III, Merck) al 20% p/v, en 0.15 M NaCl, pH=7.3 como anticoagulante. La sangre extraída se transfirió a probetas de vidrio mantenidas en hielo.

c) MEDICION DE PARAMETROS HEMATOLOGICOS

El número de células rojas por mm^3 (NCR), hematocrito (Htc), volúmen corpuscular medio (VCM) y número de células nucleadas por mm^3 (CN) fueron obtenidos directamente en un Coulter Counter Model Zf (Coulter Electronics, Inc.); la concentración de hemoglobina fue obtenida en un Coulter Hemoglobinometer (Coulter Electronics, Inc.)

El porcentaje de reticulocitos fue obtenido mediante la tinción con el colorante azul de cresilo brillante (Merck), de acuerdo a la

técnica descrita por Atwaster y Erslev (91). A partir de este parámetro, se pudo cuantificar el número de reticulocitos circulantes de la siguiente manera:

$$\frac{\% \text{ Reticulocitos} \cdot \text{NCR}}{100} = \text{Reticulocitos/mm}^3$$

La cantidad de hemoglobina que contiene, en promedio, cada célula (CMH) se obtuvo mediante la siguiente relación:

$$\frac{\text{Hemoglobina (gr/100 ml)}}{\text{NCR}} = \text{HMC (pg)}$$

La concentración media de hemoglobina corpuscular (CMHC) se obtuvo empleando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Hemoglobina (gr/100 ml)}}{\text{Hemactocrito}} = \text{CMHC (gr/100 ml)}$$

d) EXTRACCION DE LA MEDULA OSEA

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

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

e) PROCESAMIENTO DE LA MEDULA OSEA

Inmediatamente después de extraída, la médula ósea suspendida en SSG-BSA, fue filtrada a través de cuatro capas de gasa para eliminar

restos de tejido graso, músculo y fragmentos de hueso. Luego se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min a 6°C, en una centrífuga Beckman Modelo 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 fue centrifugada durante 10 min. a 1200 rpm en una centrífuga clínica Adams-Dynac con cabezal de columpio CT-1350 a temperatura ambiente. El sobrenadante fue 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 esto se efectuó el conteo de células y por último se hicieron frótis.

f) 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, haciéndose una dilución 1:800. De ésta, se tomaron a su vez 100 μ l y se llevaron a un volumen de 10 ml, lo que representó una dilución 1:80000. Fue 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.

g) PREPARACION DE LOS FROTIS

Los frotis fueron hechos en cubreobjetos de 22 x 22 mm de tamaño (92); en uno de ellos, sosteniendo solo por los bordes, se depositó una gota de la muestra de médula ósea con pipeta Pasteur. Otro cubreobjetos fue 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.

h) TINCION DE LOS FROTIS

Una vez secos, los frotis se tiñeron 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 (92), posteriormente se hizo una dilución 1:2 con metanol (12) 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 este 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).

i) 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 conejo.

j) MEDICION DEL DIAMETRO CELULAR

Se hizo en un fotomicroscopio II Carl Zeiss, empleando el objetivo de inmersión (100x), y un ocular con rejilla graduada. Se midieron aproximadamente 60 células de cada estadio de maduración, por conejo.

k) SISTEMA EXPERIMENTAL

En nuestro laboratorio se ha demostrado que al inducir una anemia crónica por sangrado diario en el conejo, el sistema eritropoyético de éste se amplifica, de tal forma, que se presentan cambios notables tanto en la circulación sanguínea como en la médula ósea (73,84,90). La máxima respuesta de dicho sistema se alcanza cuando son removidos diariamente de 9 a 12 ml de sangre/kg de peso corporal del animal.

A lo largo del sangrado se presentan distintas etapas: la primera de ellas corresponde al día 0, en el que el conejo se encuentra en condiciones normales, esto es, no se ha iniciado la anemia. La segunda etapa comprende los siguientes seis días, en los que se presentan descensos muy marcados en cuanto a NCR, Htc y Hb; entre el cuarto y sexto día de sangrado dichos parámetros llegan a sus valores más bajos. A partir del día 6 y hasta el día 10 se presenta una etapa de

recuperación y finalmente, del día 11 en adelante las condiciones hematológicas del conejo permanecen constantes (etapa de equilibrio), aunque son diferentes de las condiciones normales.

En médula ósea se observa un aumento absoluto en las poblaciones de granulocitos (Gr), células mononucleares (Mn) y normoblastos (Nb), siendo estos últimos, los que logran el mayor incremento. La población de Mn se estabiliza alrededor del día 4, la de Gr en el día 8 y la de Nb en el día 12. Con respecto al porcentaje de cada uno de los precursores eritroides, éstos se mantienen prácticamente sin cambios importantes; por otra parte, en cada uno de ellos se observa un aumento en el diámetro celular.

Para la realización del presente trabajo, los conejos empleados fueron sangrados durante catorce días consecutivos, hasta alcanzar la etapa en la que tanto sus parámetros sanguíneos como los de médula ósea se encontraban en equilibrio. A partir del 14avo día de sangrado, los conejos se dejaron recuperar de la anemia un número de días indicado en las gráficas, al cabo de los cuales se les extrajo una muestra de sangre y fueron sacrificados. El número de conejos analizado fue de tres para los días 2, 3 y 4 de recuperación y de dos para los restantes días.

Como se mencionó anteriormente, los huesos utilizados 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 sanguíneas a estímulos como la hipoxia (12); en segundo lugar, porque son estos huesos los que permiten obtener mayor número de células en cada extracción de médula ósea; en tercer lugar, porque debido a su tamaño y localización son fáciles de extraer y manipular.

Al igual que nuestro estudio anterior (90), las células nucleadas

de médula ósea fueron clasificadas, de acuerdo a su morfología, en tres poblaciones.

Granulocitos: Incluyen basófilos, eosinófilos neutrófilos y las formas inmaduras de cada uno de ellos.

Células Mononucleares: Comprenden a linfocitos y sus precursores, monocitos, células plasmáticas, blastos mononucleares y células no identificables morfológicamente pero de aspecto semejante a las anteriores.

Normoblastos: Células reconocibles, de acuerdo a lo reportado (7,64), como precursores eritroides nucleados.

La distinción entre reticulocitos y eritrocitos, tanto en sangre como en médula ósea, se hizo con base en la tinción con azul de cresilo brillante (91).

RESULTADOS

Los resultados de este trabajo serán presentados en dos secciones, la primera de ellas corresponde al estudio de la sangre periférica, mientras que la segunda al de la médula ósea.

Para una mejor comprensión de los resultados referentes al periodo de recuperación, en las figuras que se presentan más adelante he incluido los datos correspondientes al periodo de sangrado. En el caso de sangre periférica, dichos datos fueron obtenidos durante la inducción de la anemia para la realización de este trabajo. Por su parte, la mayoría de los datos de médula ósea corresponden a un estudio hecho con anterioridad en este mismo laboratorio (90); el resto corresponden a experimentos realizados recientemente.

I- Estudio de la sangre periférica

a) Cinética de los parámetros hematológicos.

Como puede verse en las figuras 4,5 y 6, la recuperación del conejo ocurrió en forma bastante rápida, pues entre los días 6 y 8 después del último sangrado alcanzó los valores normales en cuanto a NCR, Hb y Htc. Ahora bien, dicha recuperación no se llevó a cabo en forma paulatina, pudiéndose observar lo que nosotros consideramos cuatro fases, desde que el conejo deja de ser sangrado hasta que llega a los valores normales. La primera fase, que abarca los dos primeros días de recuperación, corresponde al incremento inmediato en los tres parámetros; la segunda, es una fase estacionaria que va del segundo al cuarto día; la tercera fase corresponde al periodo entre el cuarto y sexto día, siendo muy claro el aumento en dichos parámetros; por último, la fase cuatro constituye el equilibrio definitivo.

b) Reticulocitos en circulación.

Desde el inicio del periodo de recuperación el porcentaje de reticulocitos (R) circulantes descendió en forma paulatina (fig. 7), hasta el día 11, en el que regresa a la normalidad. Sin embargo, al analizar su número en circulación, observamos que en realidad, el descenso se presenta en forma más drástica, sobre todo en los primeros días. Incluso podría pensarse en la existencia de tres fases: la primera de ellas correspondería a los días 2, 3 y 4, entre los que se presenta un decremento muy marcado, de hecho el número de R disminuye a la mitad; la segunda sería el corto equilibrio entre los días 4 y 6 y la tercera, el descenso hasta llevar al valor normal en el día 11 (fig. 8).

Es interesante destacar dos hechos que se desprenden de lo anterior: en primer lugar, una vez que se suspendió el sangrado podría esperarse que el número de R aumentara, pues su producción en ese momento se encuentra incrementada, sin embargo, esto no ocurre, ya que, como se puede ver, entre el día 14 de sangrado y el día 2 de recuperación su número es prácticamente el mismo, lo que nos sugiere que, o muy rápidamente se suspende la producción de R, o bien, se bloquea su salida a la circulación. En segundo lugar, la drástica disminución de su número entre los días 2 y 4 es, seguramente, una de las causas de que se presente la fase estacionaria en el NCR.

c) Tamaño celular.

Considerando que las células rojas circulantes, particularmente los eritrocitos, deben cumplir un cierto periodo de tiempo en la sangre, nosotros pensábamos que el VCM no descendería, al menos en

forma significativa, durante los primeros días del periodo de recuperación; sin embargo, lo que se observa en la fig. 9 es que de manera prácticamente inmediata, dicho parámetro disminuye considerablemente. Lo anterior plantea la existencia de dos mecanismos que estarían actuando conjuntamente: el primero de ellos sería un cambio rápido en la producción de células rojas, esto es, dejan de producirse macrocitos, reiniciándose la producción de normocitos; el segundo sería una remoción extraordinariamente masiva de macrocitos circulantes.

Ambos mecanismos se ponen de manifiesto al observar las figuras 10, 11 12 y 13. Por un lado, es claro el regreso a los valores normales en el diámetro promedio tanto en eritrocitos (E) como de R, siendo en estos últimos, muy inmediato, pues en el día 4 tienen ya el diámetro normal, lo que demuestra que las células que se están produciendo son normocíticas. Por otro lado, al analizar la distribución de los diámetros en ambas poblaciones, es evidente la desaparición de la circulación de las células de mayor tamaño; en el caso de E, esto último indica que los macrocitos son eliminados de la circulación.

d) Hemoglobina intracelular.

La rápida respuesta del sistema eritropoyético ante la suspensión del sangrado vuelve a ponerse de manifiesto al analizar la cantidad media de Hb corpuscular (HMC), pues dicho parámetro desciende en forma inmediata y paulatina desde el inicio del periodo de recuperación, hasta regresar a los valores normales alrededor del día 8 (fig. 14).

En el caso de la concentración media de Hb corpuscular, no ocurre

lo mismo, pues durante el periodo de recuperación permanece prácticamente en el mismo valor que durante la etapa de equilibrio del periodo de anemia; ahora bien, cabe mencionar que la disminución en este parámetro durante el sangrado, no fue tan marcada como el incremento en HMC.

e) Células nucleadas circulantes

Si bien, es evidente que la eritropoyesis respondió en forma clara e inmediata a la desaparición del sangrado, la leucopoyesis presentó una cinética realmente sorprendente, pues en el día 3 el número de células nucleadas circulantes corresponde al de un conejo no anémico. Lo anterior demuestra que las respuestas de los sistemas eritropoyético y leucopoyético son diferentes y por lo tanto, apoya el hecho de que ambos sistemas son regulados de manera independiente.

Estudios realizados en este laboratorio (73) han demostrado que dentro de la población de células nucleadas circulantes en conejos anémicos, se encuentran normoblastos, por lo que no podemos atribuir dicha respuesta solamente a las células blancas, aunque éstas constituyen la gran mayoría.

II - Estudio de la médula ósea

Aún cuando los resultados observados en la sangre periférica ponen de manifiesto la complejidad del sistema hematopoyético y reflejan, de una manera general, la respuesta de éste ante la suspensión del sangrado, es un hecho que para poder obtener una información más completa y comprender mejor la dinámica de producción de las células sanguíneas en nuestro sistema experimental, es necesario el estudio de

lo que ocurre con las diferentes poblaciones celulares de la médula ósea, pues es ahí donde tienen su origen la mayor parte de los cambios que se presentan en la circulación.

a) Actividad hematopoyética de la médula ósea.

Durante los primeros días del periodo de recuperación, el número total de células obtenidas en la extracción de la médula ósea (NTC) siguió una cinética muy irregular, alcanzando proporciones superiores a las de la etapa de equilibrio durante los días de sangrado (fig. 16).

Ahora bien, al seguir únicamente a las células nucleadas de médula ósea (CNMO), observamos que su cinética de recuperación fue más clara, regresando a los valores normales en el día 15. Por lo tanto, es evidente que la cinética que presentó el NTC es debida, en gran medida, a la población de R y E (PRE) presentes en médula ósea, población que, como puede verse, incrementó enormemente su número.

Es importante destacar que mientras en sangre las células rojas regresan a su número normal alrededor del día 8 y las blancas en el 3, la población total de células hematopoyéticas lo hace hasta el día 15, lo que resultó, hasta cierto punto sorprendente, pues antes de iniciar este proyecto nosotros pensábamos en la posibilidad de que los valores normales se alcanzaran primero a nivel de las células de médula ósea, o bien, que independientemente de cual fuera el sitio en el que se llegara primero a la normalidad, la diferencia en tiempo sería pequeña, sin embargo, no resultó así.

Para continuar la presentación de los resultados, enfocaremos primero nuestra atención a las CNMO y a los precursores eritroides, dejando para el final a la población de R y E.

b) Células nucleadas de médula ósea.

Al estudiar a cada una de las poblaciones hematopoyéticas por separado, observamos que, tal y como había sido sugerido por los resultados en sangre periférica, la eritropoyesis y la leucopoyesis presentaron comportamientos claramente distintos. El porcentaje de Nb se incrementó durante los primeros cuatro días, mientras que el de Gr disminuyó; por su parte, Mn se mantuvieron más o menos constantes. A partir del cuarto día, las tres poblaciones iniciaron su regreso a los valores normales. (fig. 17).

Por otra parte, el estudio cuantitativo de dichas poblaciones demostró que mientras Nb y Mn tuvieron una recuperación paulatina, Gr regresó a su número normal al segundo día (fig. 18), hecho que llama la atención, pues durante la inducción del anemia fueron necesarios ocho días para que esta población llegara al equilibrio. Tal parece que ese marcado descenso se debe a que muy rápidamente se inhibe la producción de Gr y además, a que hay una salida masiva de éstos a la circulación, lo que se podría ver reflejado en el ligero incremento de células nucleadas circulantes en el día 2 (fig. 15).

En el caso de Mn, ocurrió lo contrario, mientras que durante el sangrado llegaron al equilibrio en sólo cuatro días, su cinética de recuperación fue más lenta e irregular, lo que indica que aún ante la suspensión del sangrado, su actividad proliferativa no disminuye significativamente.

c) Cinética de los Normoblastos.

La población total de células eritroides nucleadas (Nb) presentó

una recuperación paulatina, alcanzando su número normal en el día 15 (fig. 18). Ahora bien, el análisis de cada estadio de diferenciación nos permitió encontrar eventos particularmente interesantes.

Contrariamente a lo observado durante la anemia, en la recuperación se presentaron cambios notables en los porcentajes de dichas subpoblaciones (fig. 19); lo anterior es especialmente notorio al observar los porcentajes de N. policromatófilos y N. ortocromáticos en el día 3, en el cual, es superior el de estos últimos.

Por otra parte, el análisis cuantitativo de las subpoblaciones mostró dos hechos que debemos mencionar: el primero de ellos es que aún cuando en el día 8 de recuperación el NCR es el normal, los cuatro estadios eritroides regresaron a su valor original en el día 15. Con respecto al segundo, es interesante que durante la anemia los cuatro estadios tuvieron una respuesta similar, esto es, incrementaron sus números en proporciones más o menos semejantes, en cambio, en los primeros días de recuperación dos de ellos, pronormoblastos (PN) y N. ortocromáticos (NO), incrementaron todavía más sus números. Los N. basófilos (NB) se mantuvieron constantes y los N. poliocromatófilos (NP) disminuyeron (figuras 20-23). Lo anterior sugiere que la dinámica de maduración eritroide es distinta en cada uno de los estados fisiológicos a los que es sometido el conejo y que, probablemente, no son exactamente los mismos los factores involucrados en ella bajo ambas condiciones.

d) Morfología de los normoblastos.

El análisis de los precursores eritroides comprendió también, el estudio morfológico de cada uno de ellos. En la figura 24 se muestran células representativas de cada estadio.

Al igual que durante el sangrado, los cambios más notables en cuanto a la morfología de los Nb durante la recuperación fueron en el diámetro celular; en los cuatro estadios se observó un descenso paulatino hasta alcanzar, alrededor del día 8, los diámetros normales (fig. 25-28). Analizando de manera particular a los PN, es claro que el cambio hacia la producción de células de menor tamaño es muy rápido (fig. 25), lo que indica que la señal debe ser recibida en forma inmediata a nivel de las BFU-E y/o las CFU-E.

e) Población de Reticulocitos y Eritrocitos.

Como lo habíamos mencionado anteriormente, durante el periodo de recuperación el número de dicha población (PRE) en médula ósea se incrementó considerablemente (fig. 29); el fenómeno anterior puede deberse a un aumento en alguna de las dos subpoblaciones, o bien, en las dos simultáneamente.

Cuantificando el número de R nos dimos cuenta que hay, efectivamente, un aumento muy grande en ambas subpoblaciones. En la fig. 30 puede verse que durante la anemia se elevó significativamente el número de R, sin embargo, una vez suspendido el sangrado se presentan aumentos todavía mayores. Ahora bien, comparando el número de PRE y de R, es evidente que el número de E también se elevó en gran forma.

Lo anterior nos indica, por un lado, que hay un almacenamiento de R en médula ósea, lo que se corrobora en la fig. 31, pues la relación $\frac{ZR}{R}$ en médula/ $\frac{ZR}{R}$ en sangre es mayor en la recuperación que durante la anemia. Tal parece que una vez suspendido el sangrado, se bloquea la salida de reticulocitos a la circulación, provocándose el descenso en

el número de reticulocitos en circulación. Por otro lado, el incremento en el número de E en médula ósea podría ser debido a la remoción masiva de macrocitos por parte del sistema reticulo-endotelial, el cual es abundante en dicho órgano.

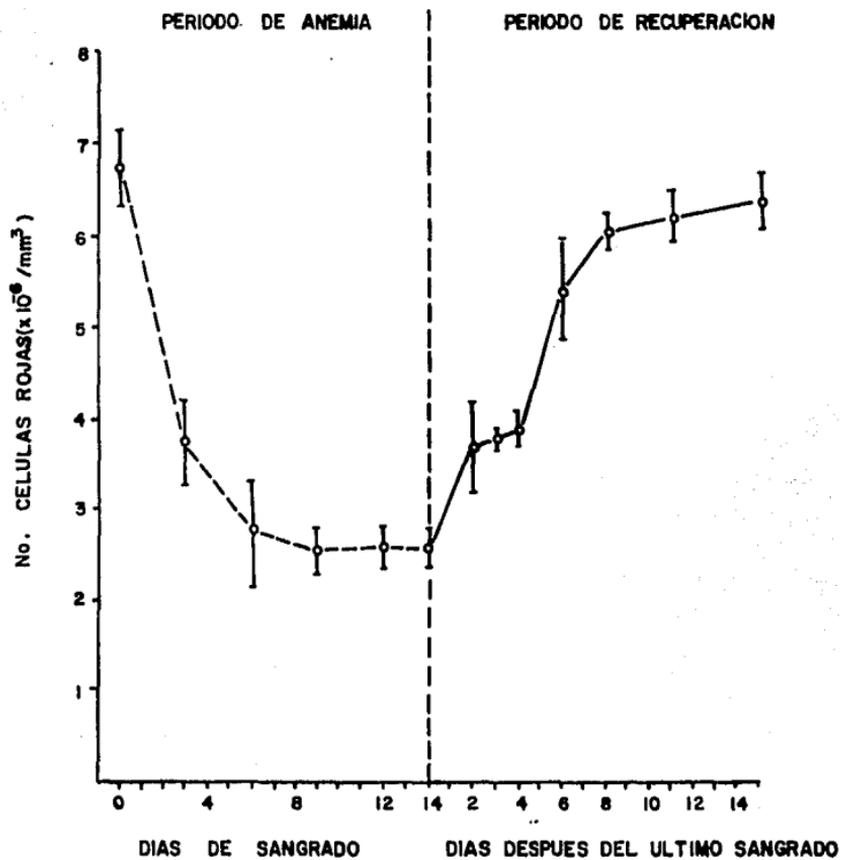


FIG. 4: Número de células rojas circulantes durante los períodos de anemia y recuperación. Se muestra la media y la desviación estándar.

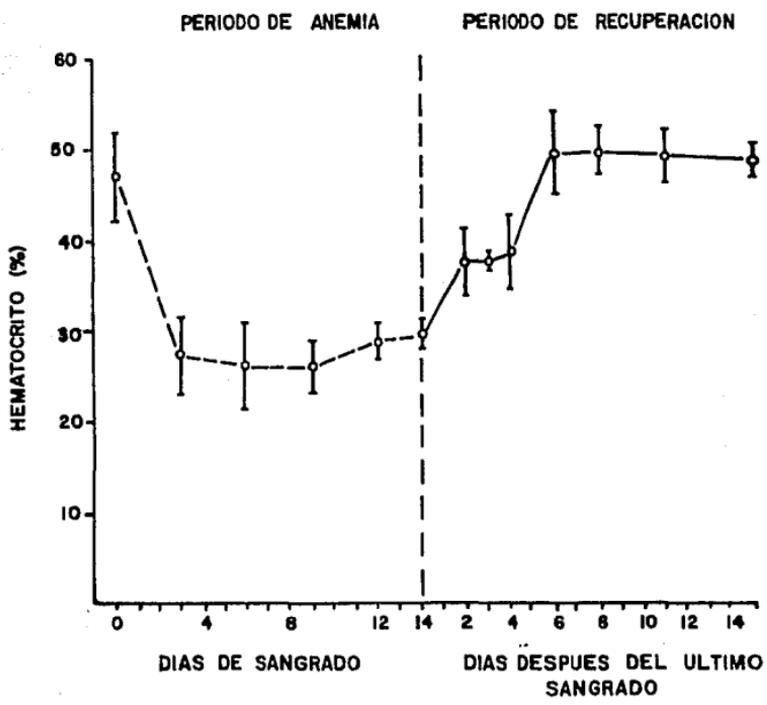


FIG. 5: Variación del Hematocrito durante los períodos de anemia y recuperación. Se muestra la media y la desviación estándar.

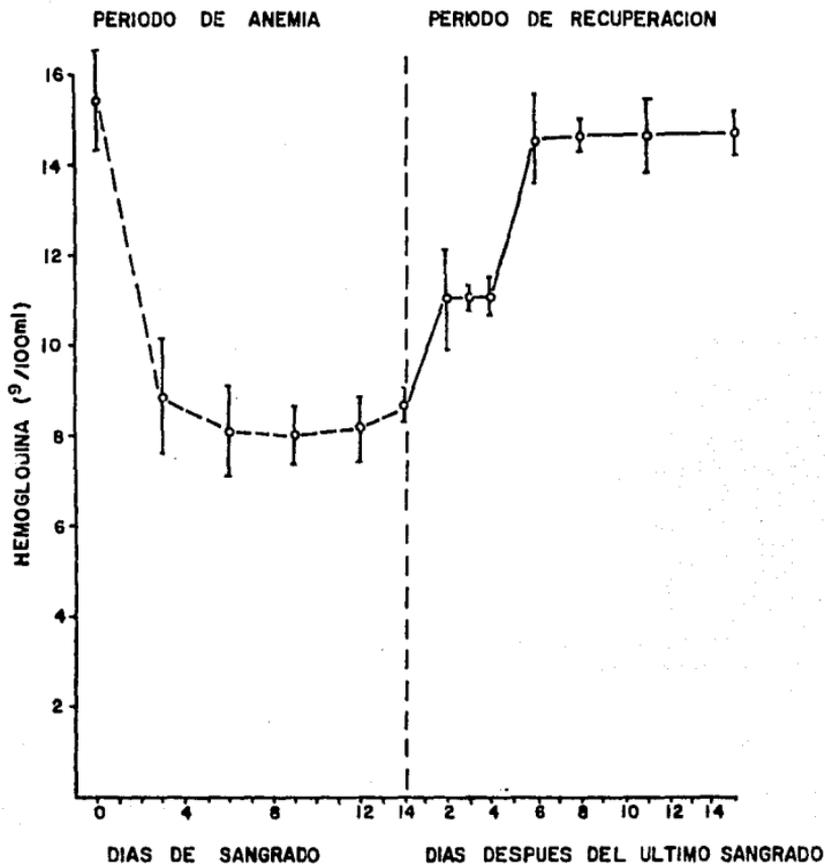


FIG. 6: Concentración de hemoglobina en sangre durante los períodos de anemia y recuperación. Se muestra la media y la desviación estándar.

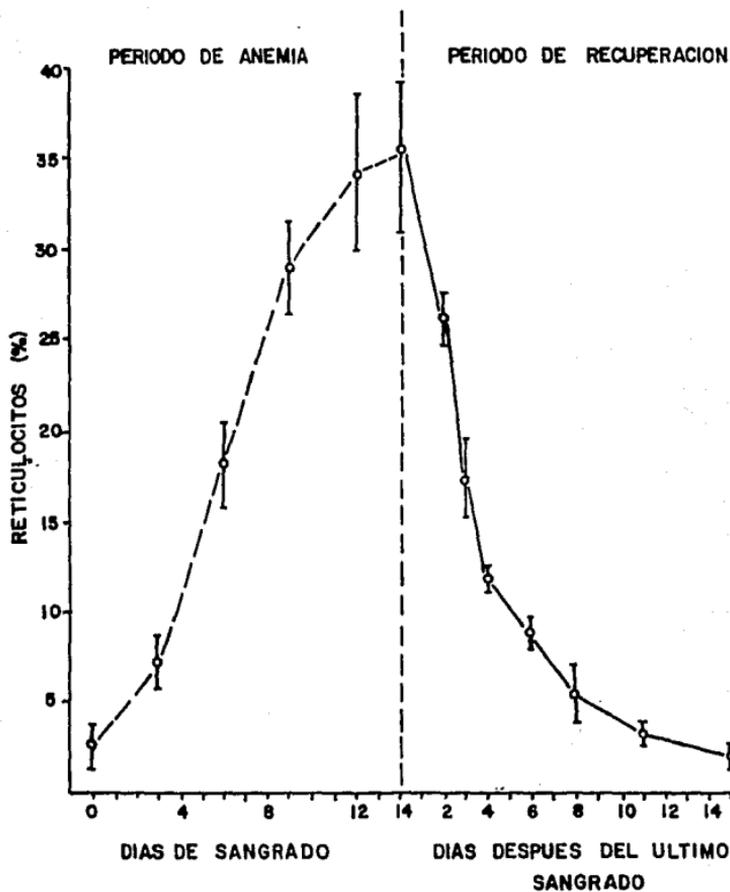


FIG. 7: Porcentaje de reticulocitos en circulación durante los períodos de anemia y recuperación. Se muestra la media y la desviación estándar.

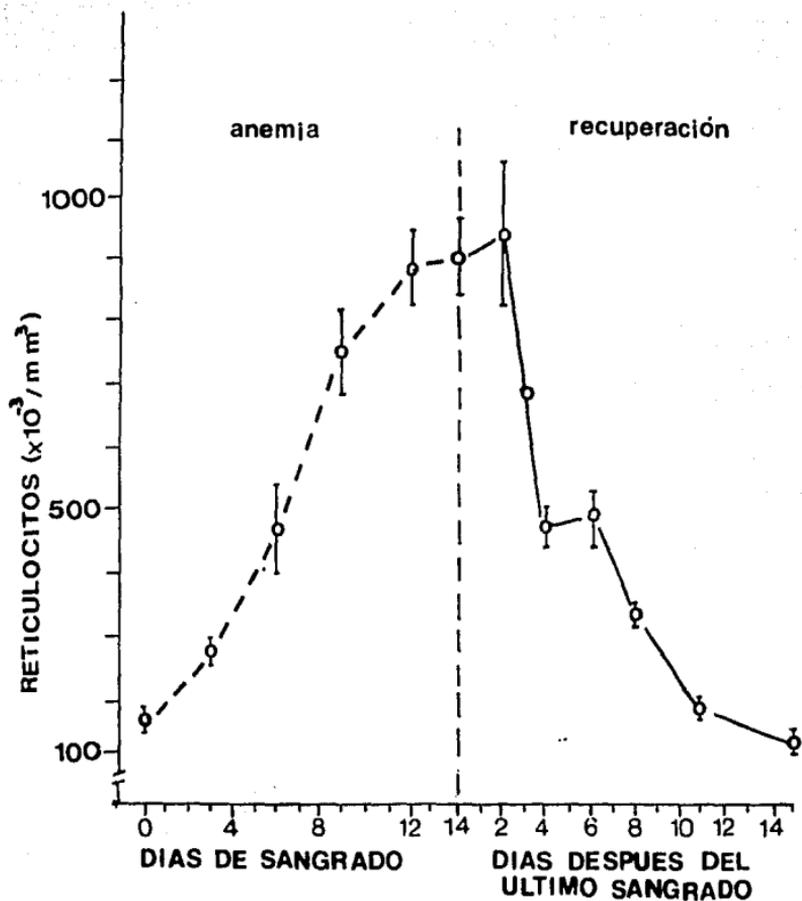


FIG. 8: Número de reticulocitos en circulación durante los períodos de anemia y recuperación. Se muestra la media y la desviación estándar.

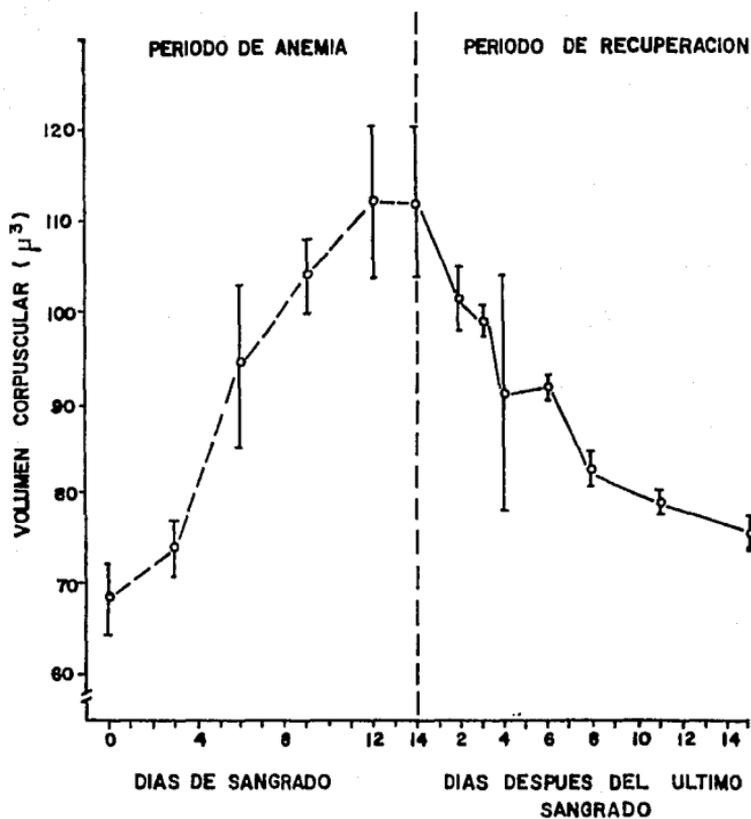


FIG. 9: Volúmen corpuscular medio de las células rojas circulantes, durante los períodos de anemia y recuperación. Se muestra la media y la desviación estándar.

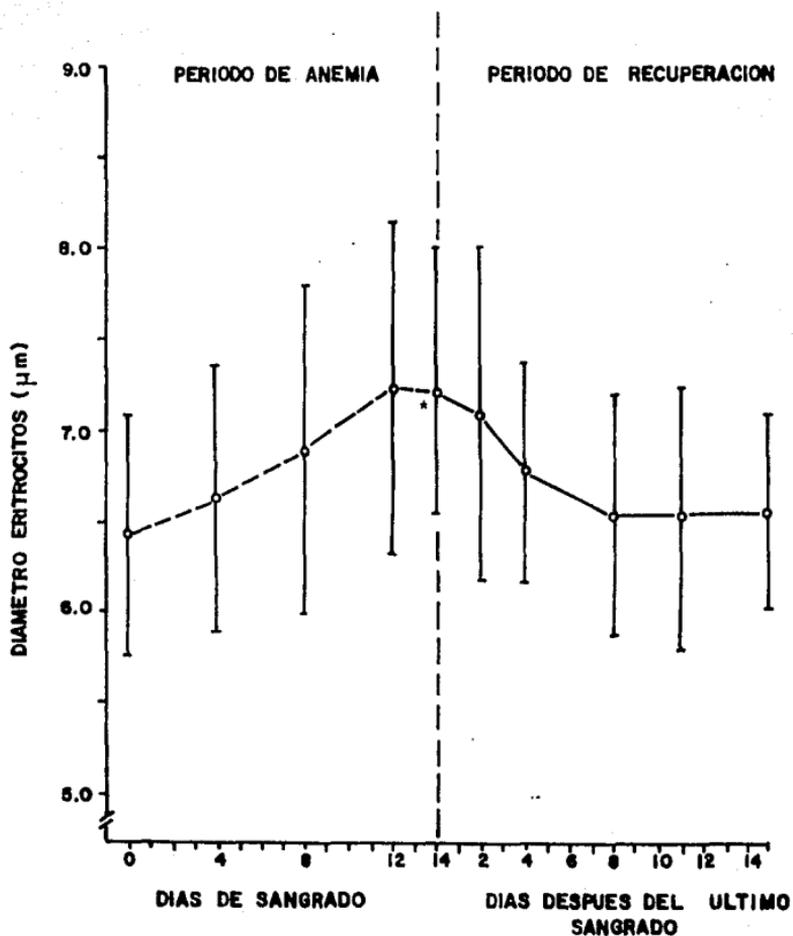


FIG. 10: Diámetro de Eritrocitos durante los periodos de anemia y recuperación. Se muestran la media y la desviación estándar.

* $p < 0.01$ (con respecto al día 0).

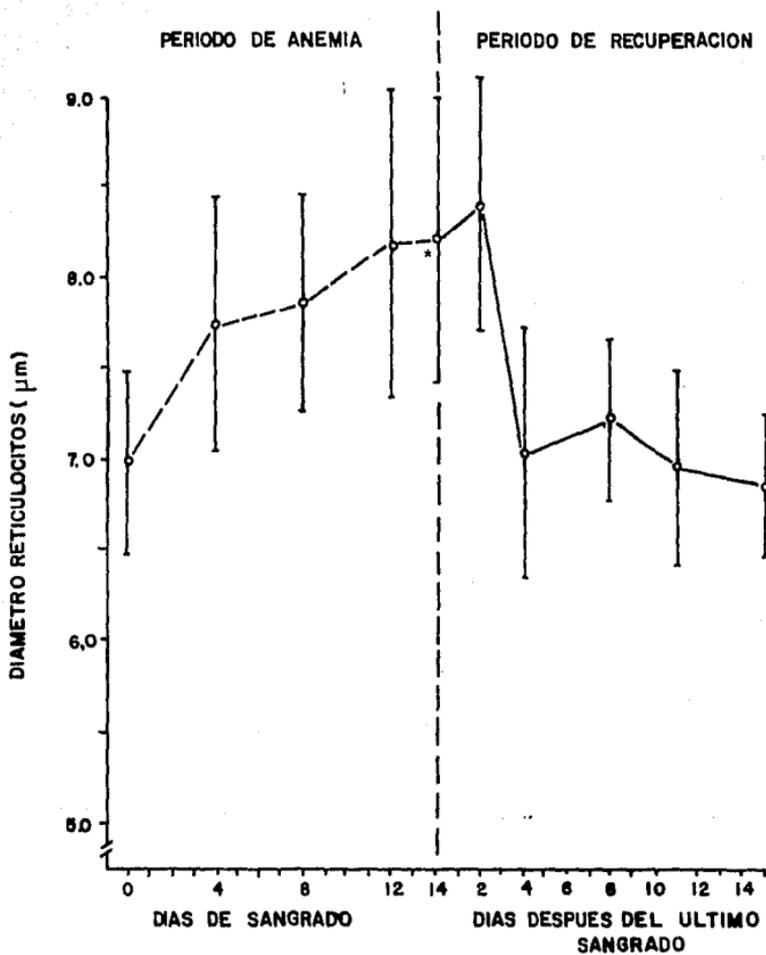


FIG. 11: Diámetro de reticulocitos durante los periodos de anemia y recuperación. Se muestran la media y la desviación estandar.

* $p < 0.001$ (con respecto al día 0).

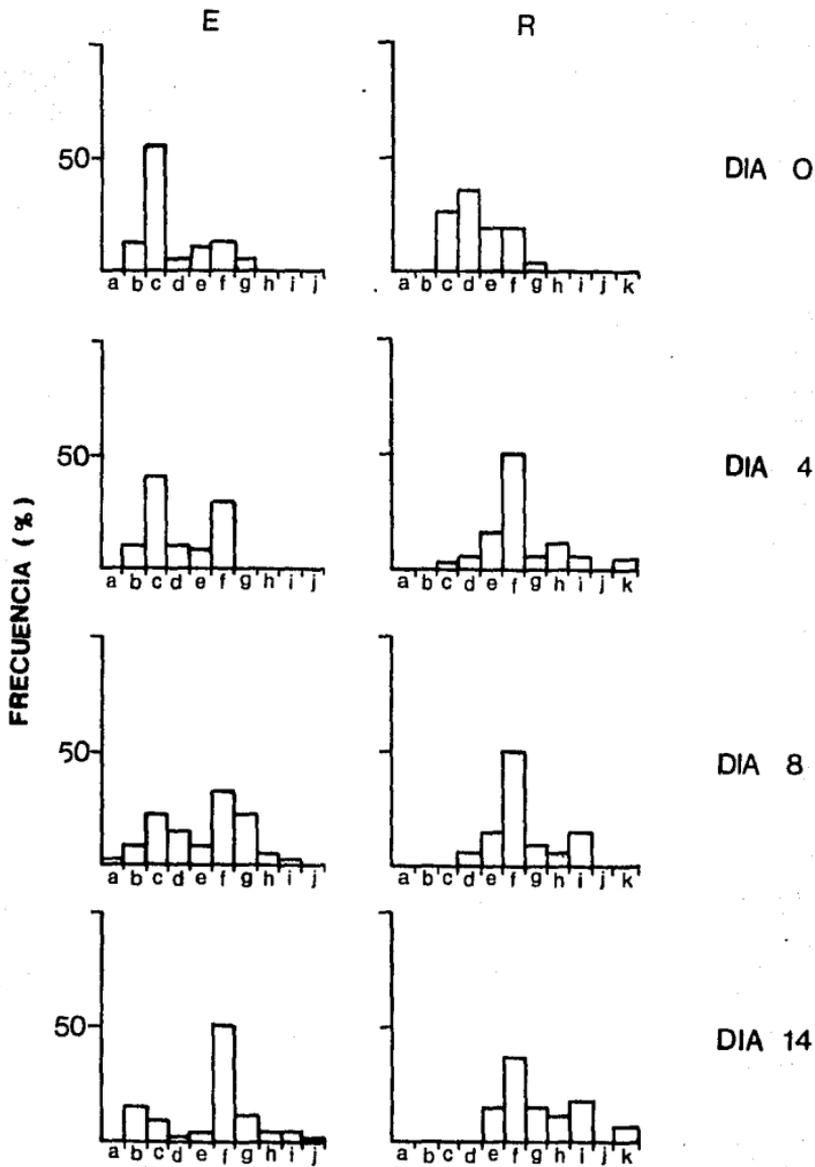


FIG. 12: Distribución relativa de los diámetros de eritrocitos (E) y reticulocitos (R), durante el período de anemia.

a = 5.0 - 5.4 μ m

b = 5.5 - 5.9 "

c = 6.0 - 6.4 "

d = 6.5 - 6.9 "

e = 7.0 - 7.4 "

f = 7.5 - 7.9 "

g = 8.0 - 8.4 "

h = 8.5 - 8.9 "

i = 9.0 - 9.4 "

j = 9.5 - 9.9 "

k = 10.0 - 10.4 "

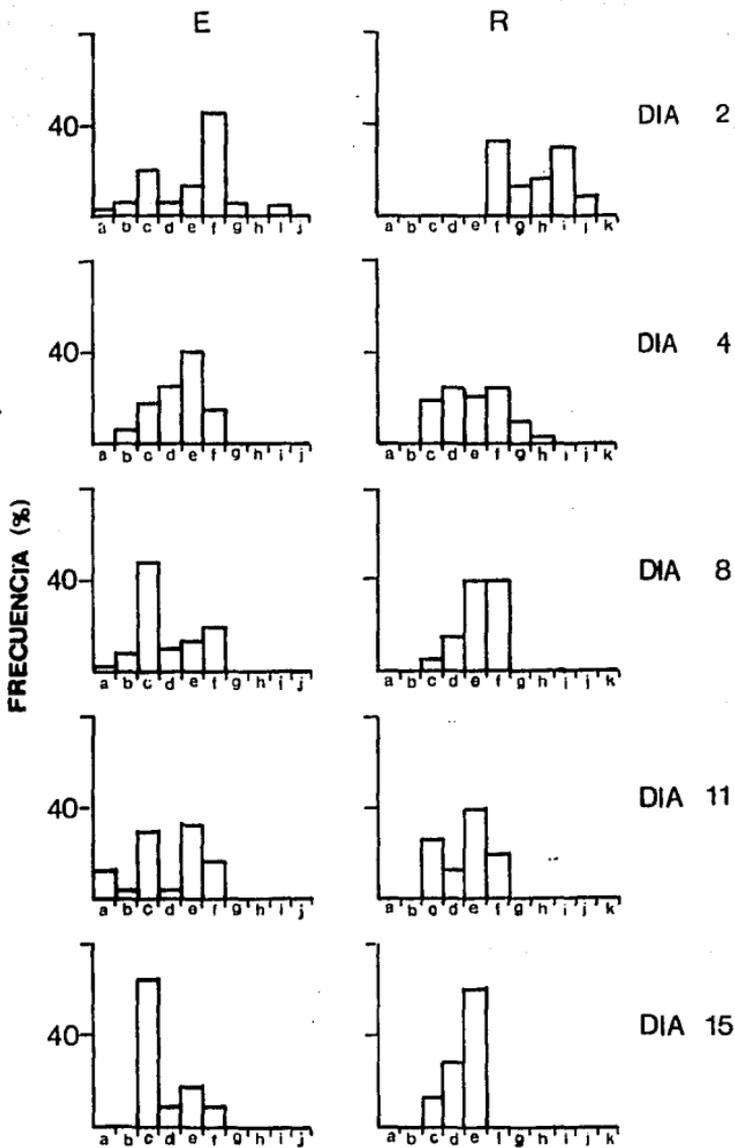


FIG. 13: Distribución relativa de los diámetros de eritrocitos (E) y reticulocitos (R) durante el periodo de recuperación.

a = 5.0 - 5.4 μ m

b = 5.5 - 5.9 "

c = 6.0 - 6.4 "

d = 6.5 - 6.9 "

e = 7.0 - 7.4 "

f = 7.5 - 7.9 "

g = 8.0 - 8.4 "

h = 8.5 - 8.9 "

i = 9.0 - 9.4 "

j = 9.5 - 9.9 "

k = 10.0 - 10.4 "

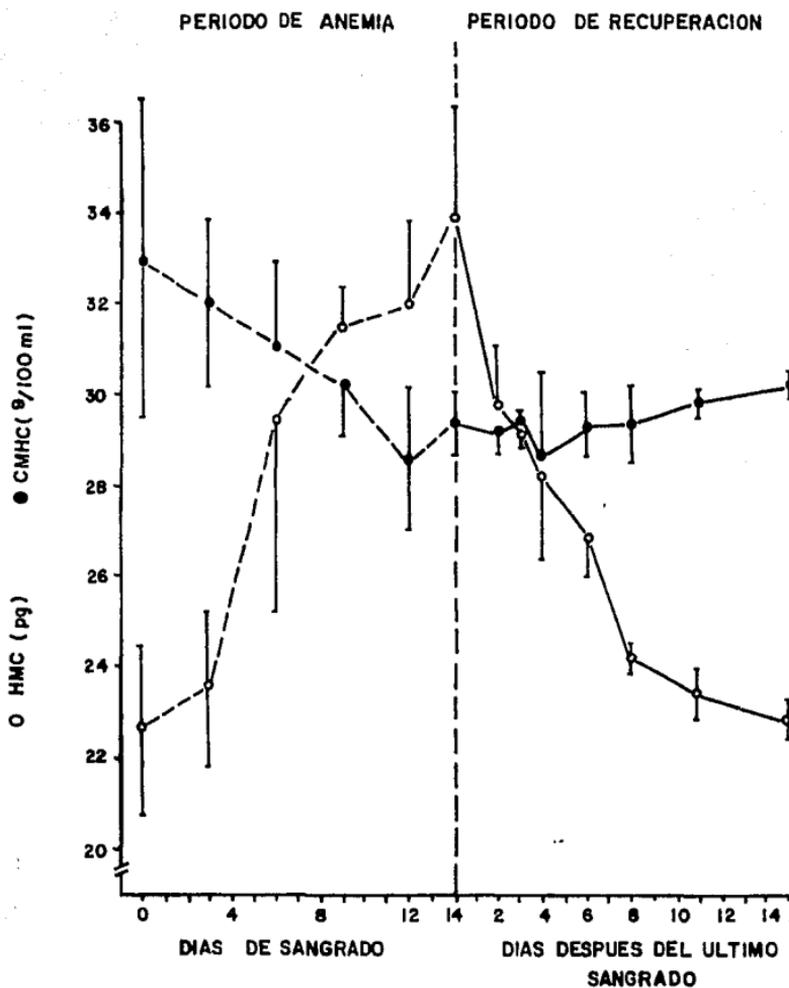


FIG. 14: Hemoglobina corpuscular media (HMC) y concentración media de hemoglobina corpuscular durante los periodos de anemia y recuperación. Se muestra la media y la desviación estándar.

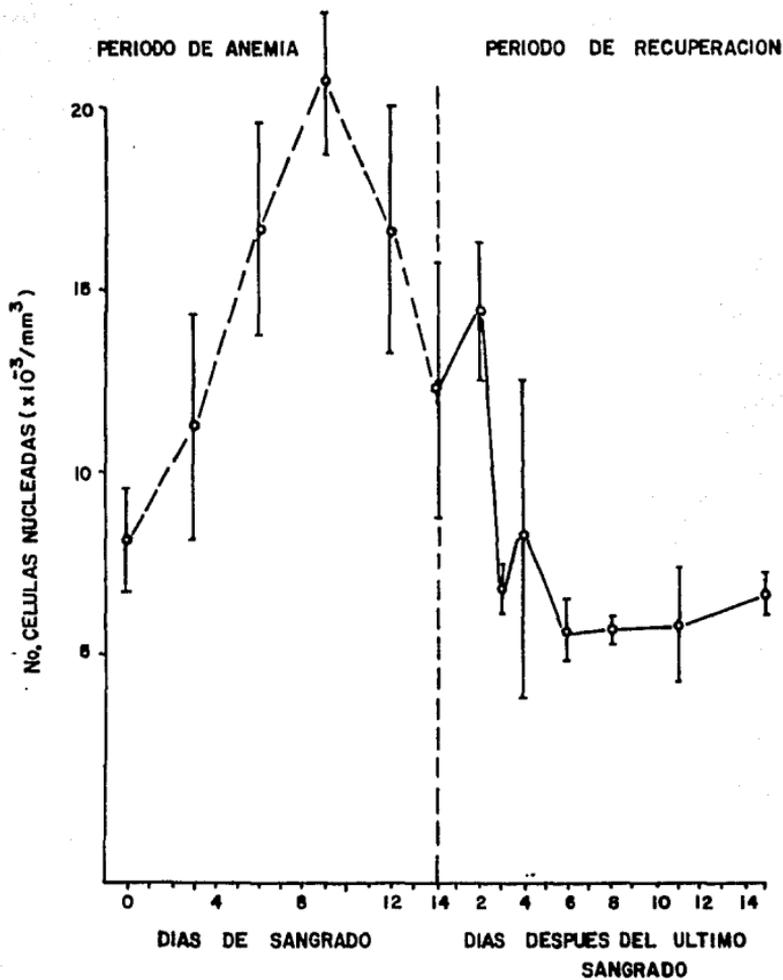


FIG. 15: Número de células nucleadas circulantes durante los periodos de anemia y recuperación. Se muestra la media y la desviación estándar.

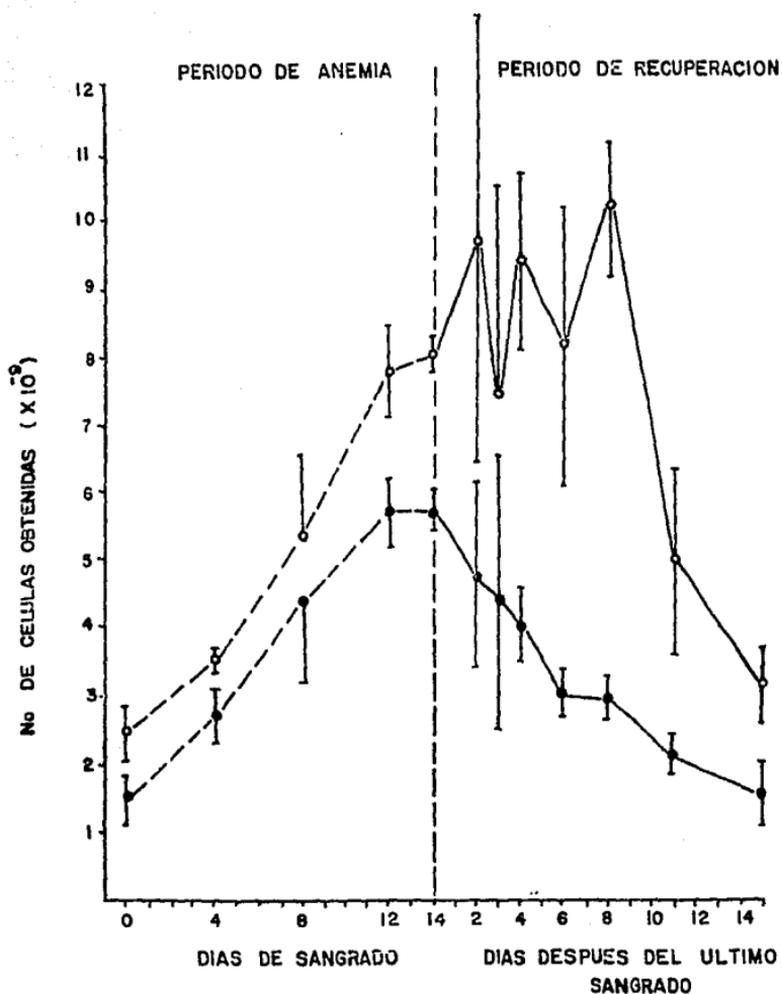


FIG. 16: Número de células obtenidas en la extracción de la médula ósea, durante los periodos de anemia y recuperación. Se muestra la media y la desviación estándar. O, No. total de células obtenidas; ● células nucleadas.

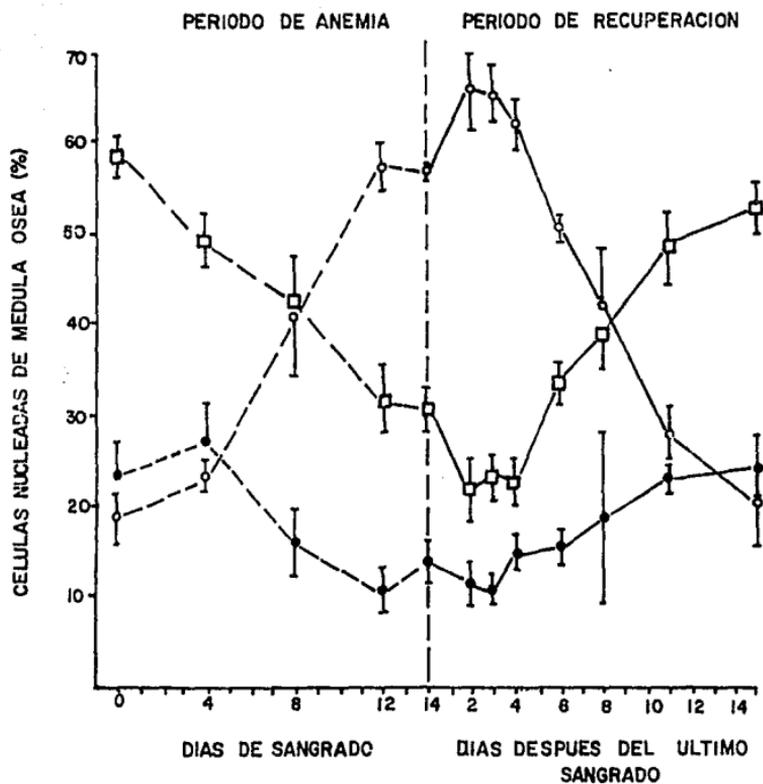


FIG. 17: Porcentaje relativo de las poblaciones celulares hematopoyéticas durante los periodos de anemia y recuperación. Se muestra la media y la desviación estándar. O, normoblastos; ● mononucleares; □ granulocitos.

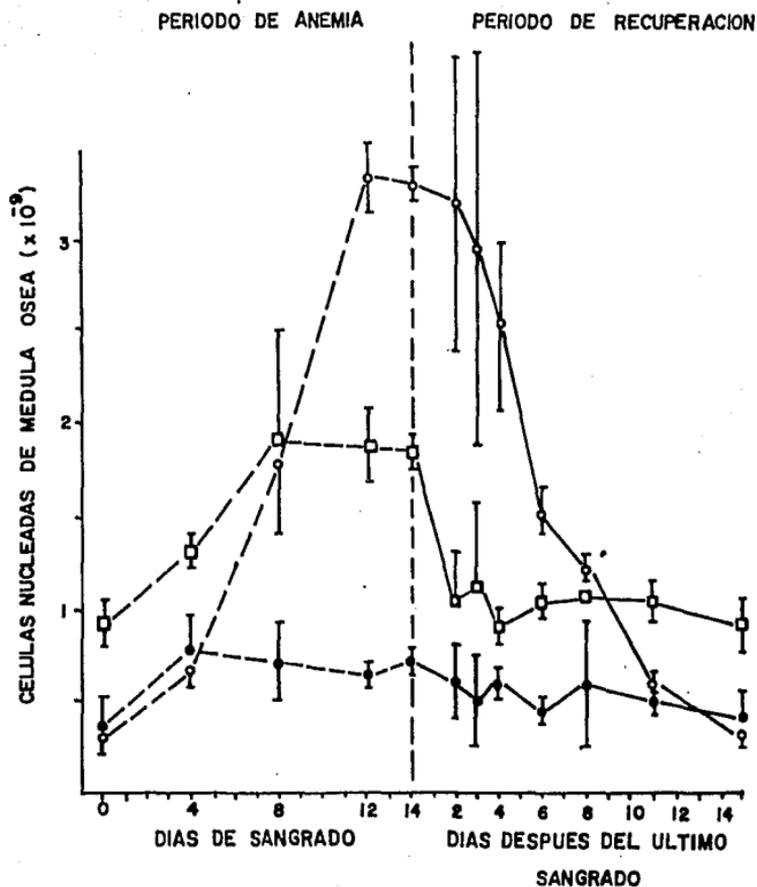


FIG. 18: Número absoluto de cada una de las poblaciones celulares hematopoyéticas, durante los periodos de anemia y recuperación. Se muestra la media y la desviación estándar. O, normoblastos; ● mononucleares; □ granulocitos.

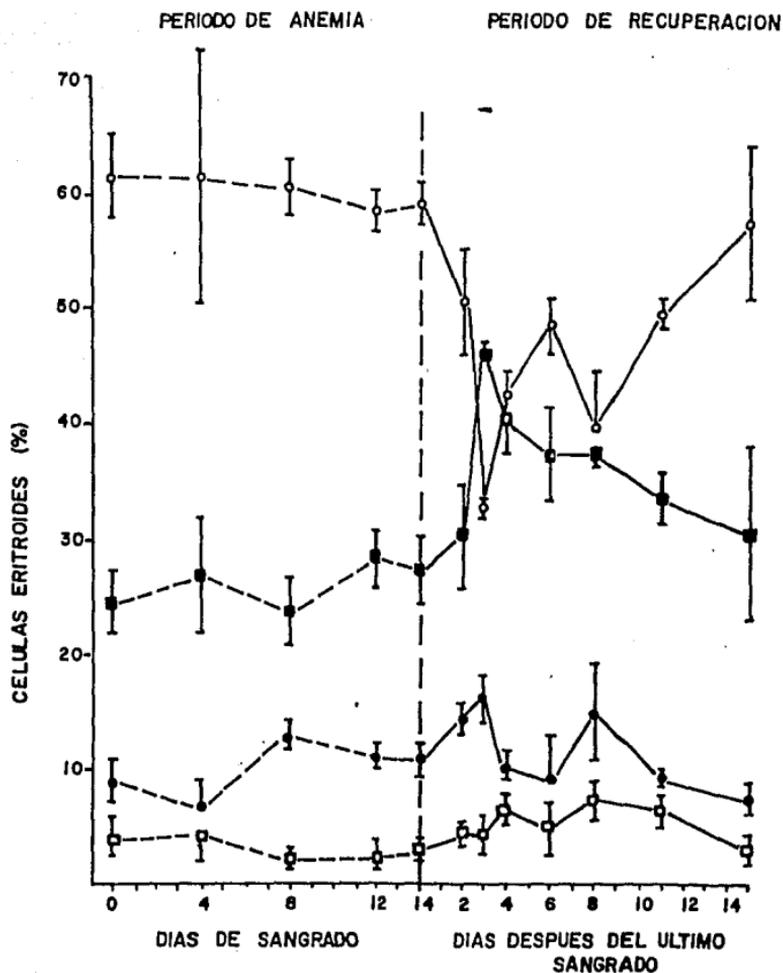


FIG. 19: Porcentaje relativo de cada uno de los estadios eritroides nucleados durante los períodos de anemia y recuperación. Se muestra la media y la desviación estándar, □ , PN; ●, NB; ○, NP; ■ , NO.

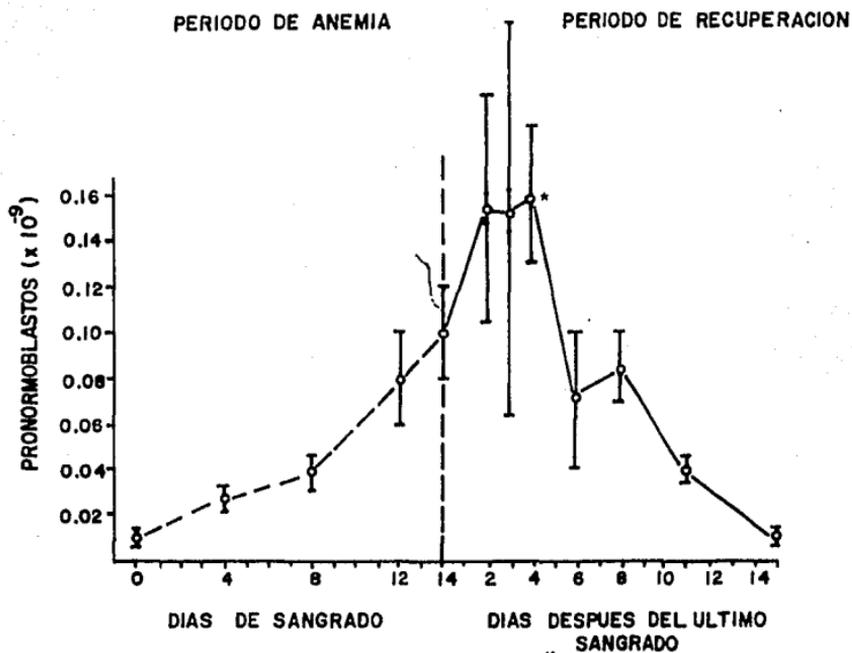


FIG. 20: Número de pronormoblastos presentes en médula ósea durante los periodos de anemia y recuperación. Se muestra la media y la desviación estándar.

* $p < 0.025$ (con respecto al día 14 de sangrado).

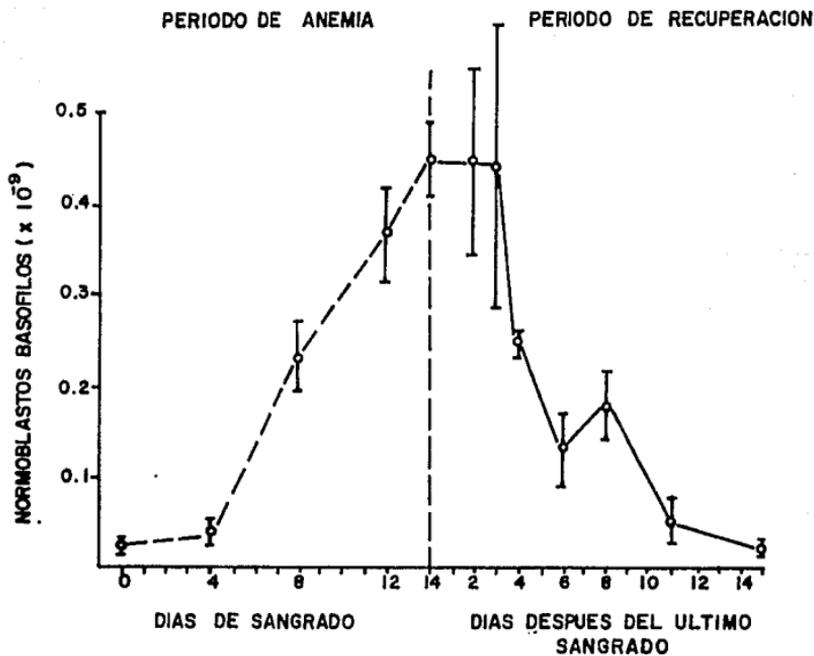


FIG. 21: Número de normoblastos basófilos presentes en médula ósea, durante los periodos de anemia y recuperación. Se muestra la media y la desviación estándar.

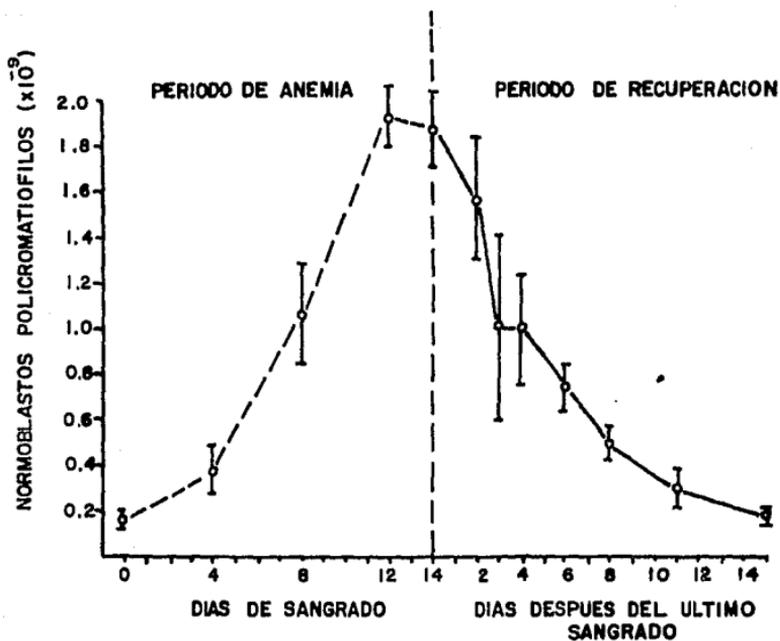


FIG. 22: Número de normoblastos policromatófilos presentes en médula ósea, durante los periodos de anemia y recuperación. Se muestra la media y la desviación estándar.

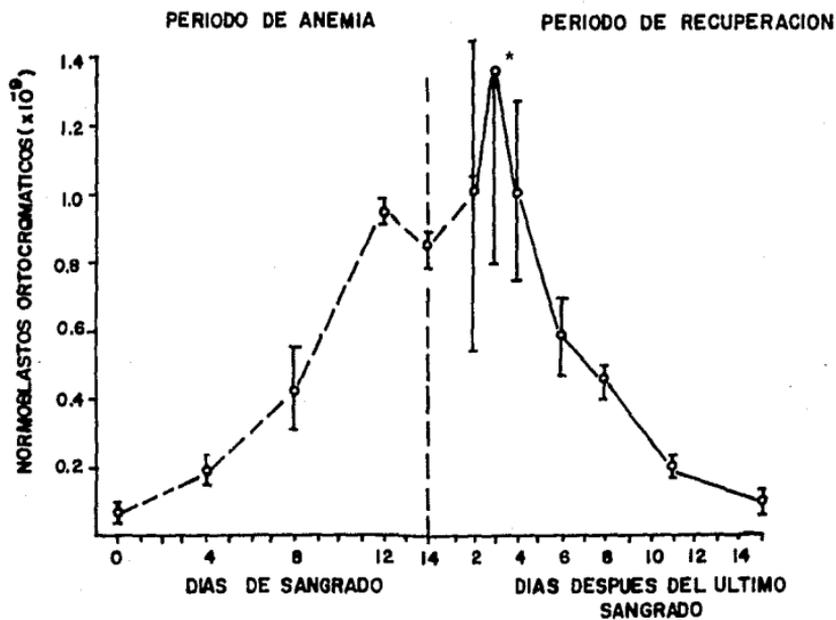


FIG. 23: Número de normoblastos ortocromáticos presentes en médula ósea, durante los períodos de anemia y recuperación. Se muestra la media y la desviación estándar.

* $p < 0.05$ (con respecto al día 14 de sangrado)

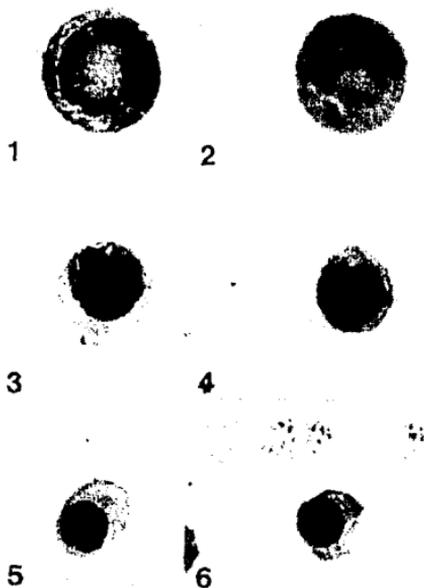


FIG. 24: Células representativas de cada uno de los estadios eritroides nucleados. 1, PN; 2, NB; 3, NP; 4, NP; 5, NO; 6, NO expulsando el núcleo.

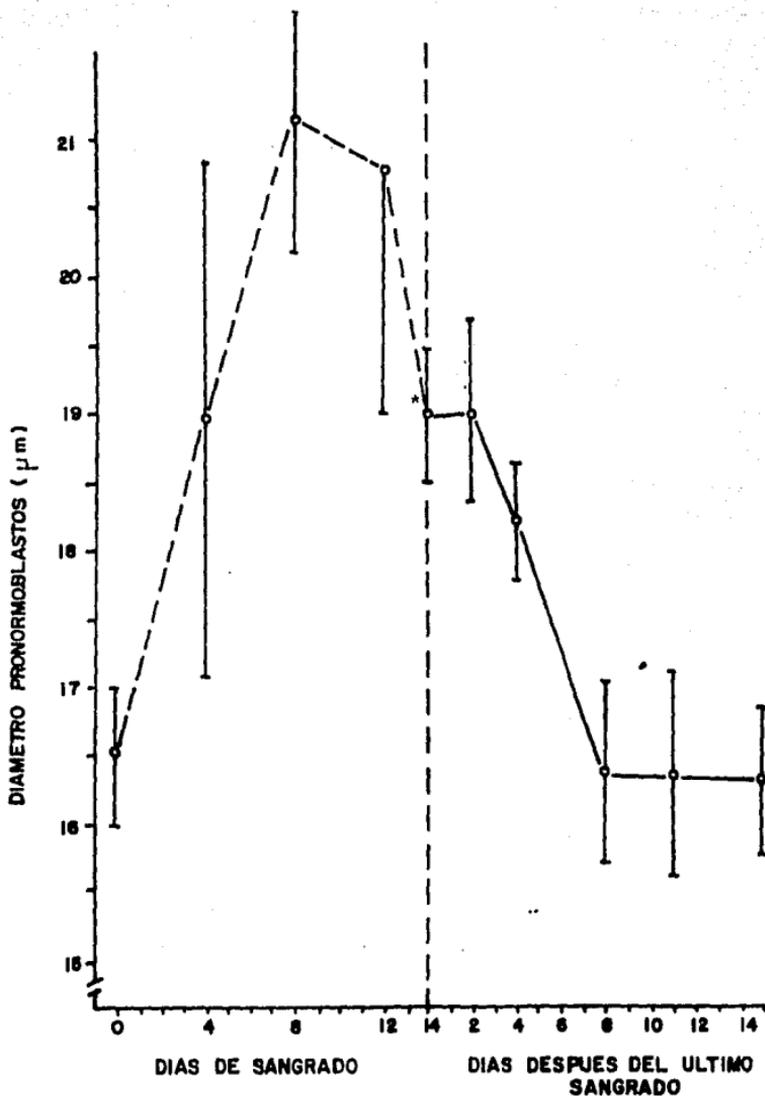


FIG. 25: Diámetro de los pronormoblastos presentes en la médula ósea, durante los periodos de anemia y recuperación. Se muestra la media y la desviación estándar.

* $p < 0.001$ (con respecto al día 0 de sangrado).

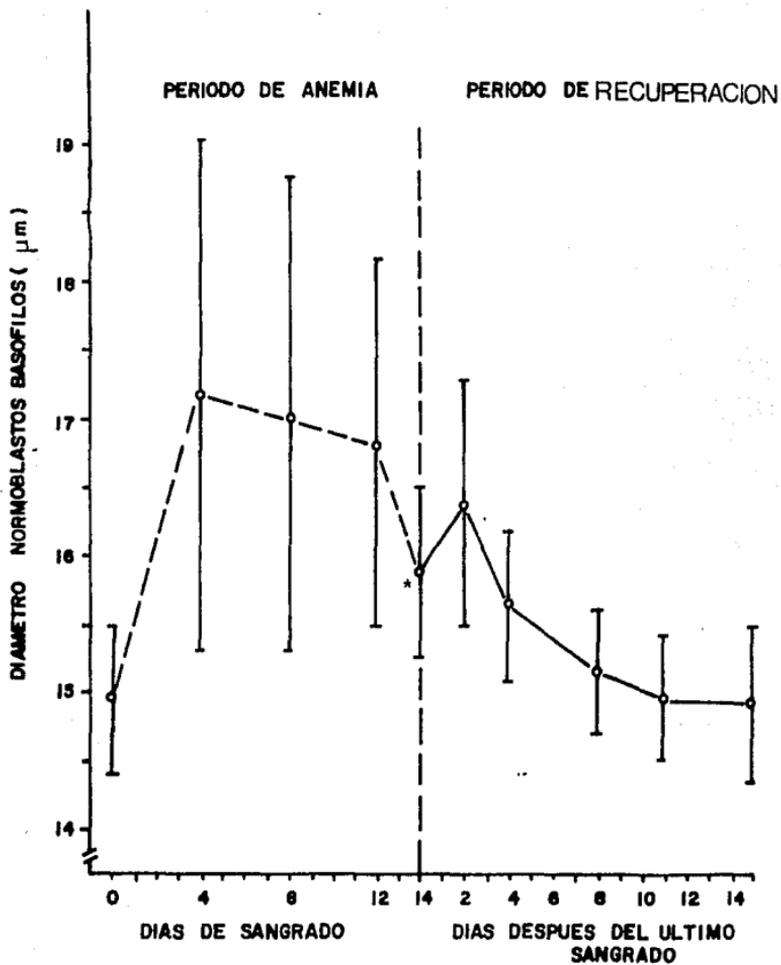


FIG. 26: Diámetro de los normoblastos basófilos presentes en médula ósea, durante los períodos de anemia y recuperación. Se muestra la media y la desviación estándar.

* $p < 0.001$ (con respecto al día 0 de sangrado).

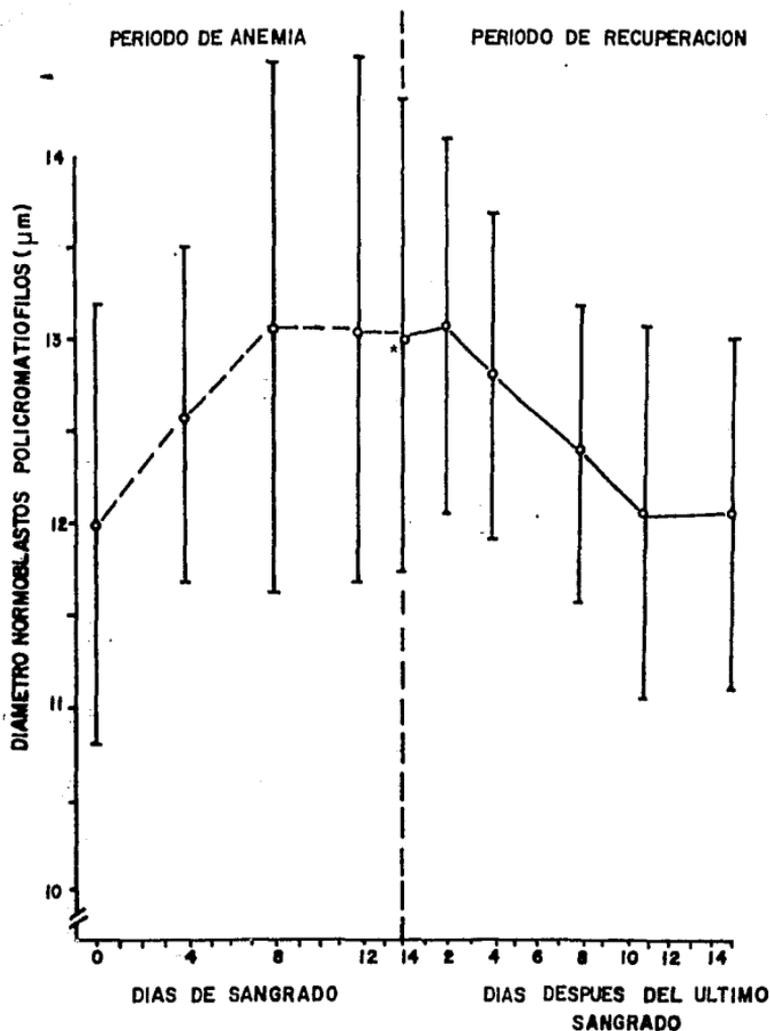


FIG. 27: Diámetro de los normoblastos policromatófilos presentes en médula ósea, durante los periodos de anemia y recuperación. Se muestra la media y la desviación estándar.

* $p < 0.01$ (con respecto al día 0 de sangrado)

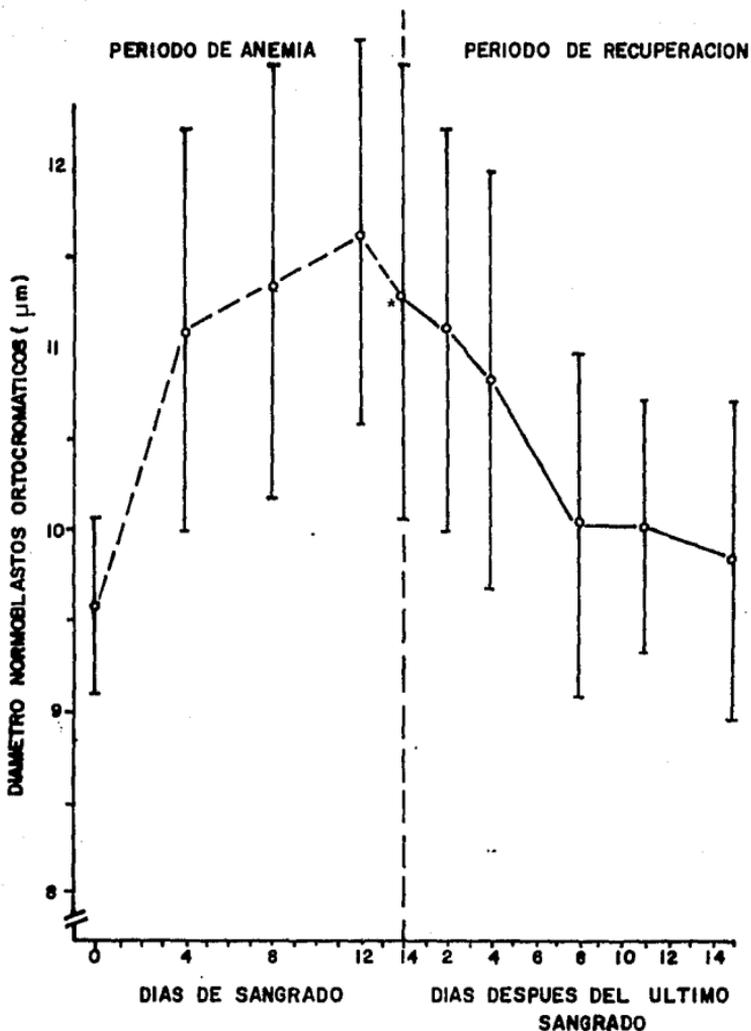


FIG. 28: Diámetro de normoblastos ortocromáticos presentes en médula ósea, durante los períodos de anemia y recuperación. Se muestra la media y la desviación estándar.

* $p < 0.001$ (con respecto al día 0 de sangrado).

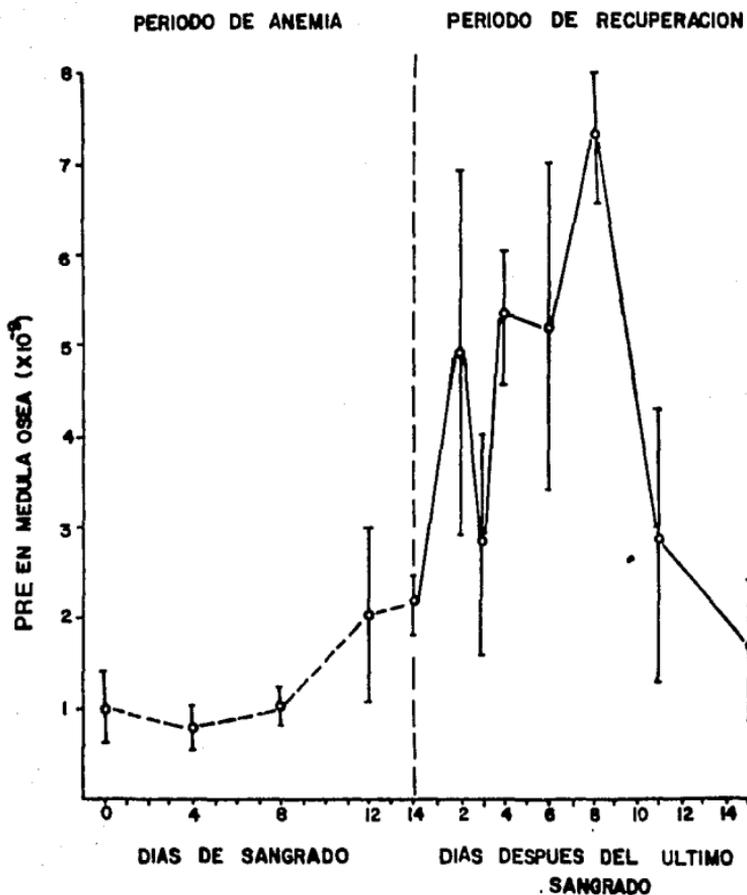


Fig. 29: Cuantificación de la población de reticulocitos y eritrocitos (PRE) en médula ósea, durante los periodos de anemia y recuperación. Se muestra la media y la desviación estándar.

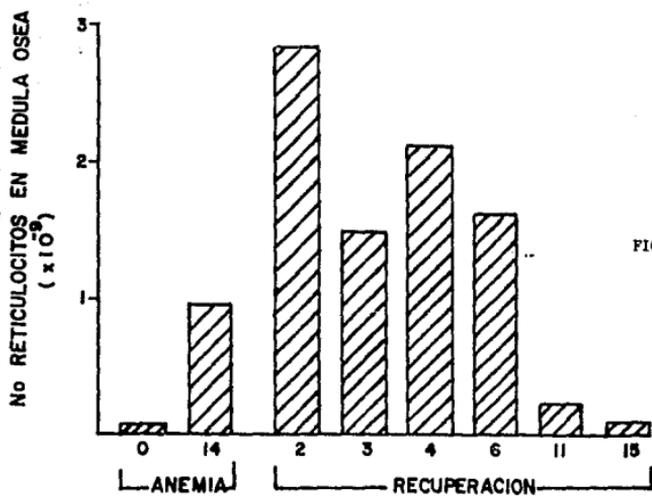
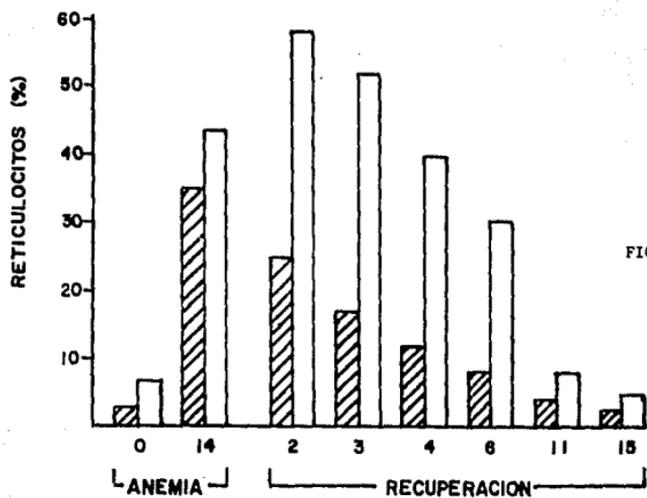


FIG. 31: Porcentaje de reticulocitos en sangre y médula ósea
durante los períodos de anemia y recuperación.

FIG. 30: Número de reticulocitos presentes en médula ósea durante los
períodos de anemia y recuperación.

DISCUSION.

La eritropoyesis, considerando todos los aspectos que ésta encierra, ha sido extensamente estudiada desde muy diversos puntos de vista. Muchas aportaciones al conocimiento que sobre ella se tiene, han surgido de estudios realizados en sistemas experimentales que involucran a mamíferos como ratones, conejos, perros y monos. Dichos sistemas pueden proporcionar grandes ventajas sobre los estudios a nivel clínico.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un sistema de estudio en el que se emplea como animal experimental al conejo. A través de diversos trabajos se ha logrado caracterizar los cambios que ocurren, tanto en la sangre como en la médula ósea de éste, durante un proceso de anemia inducido por sangrado.

Aún cuando queda mucho por conocer sobre el período de anemia, hemos decidido iniciar el estudio y la caracterización de la dinámica de formación de la sangre durante la etapa de recuperación, esto es, desde que el conejo deja de ser sangrado hasta que recupera las condiciones normales, buscando, de esta forma, conocer más a fondo la naturaleza del sistema hematopoyético del conejo.

Durante la inducción del anemia para la realización de este trabajo, la cinética que presentaron los diversos parámetros hematológicos es prácticamente la misma que ha sido observada en trabajos anteriores de este laboratorio (73,84,89). Cabe mencionar, que cinéticas de NCR y Htc más o menos similares han sido reportadas por otros laboratorios, en los que se induce el estado de anemia inyectando al animal experimental fenilhidrazina (94).

Refiriéndonos ya a los resultados obtenidos en este estudio, comenzaremos por mencionar la rapidez con que el conejo inicia su

regreso a los valores normales; entre seis y ocho días después del último sangrado su sistema de transporte de oxígeno ha recuperado las condiciones originales, presentándose los niveles adecuados de NCR y Hb. Estos resultados coinciden, en cierta forma, con los reportados por Lord en 1967 (95), quien estudiando la recuperación del sistema eritropoyético en ratones, encontró que después de una anemia aguda inducida por sangrado, se llega a los valores normales alrededor del día 7 de recuperación.

Sin embargo, por la cinética de NCR, Htc y Hb es evidente que dicha recuperación no es un proceso paulatino y gradual, sino que a lo largo de él se presentan cambios en la dinámica de producción de las células sanguíneas, lo que se ve reflejado en la presencia de las cuatro etapas que hemos mencionado anteriormente (fig. 4, 5 6).

Todavía más rápida es la recuperación en el número de células nucleadas circulantes, las cuales alcanzaron los valores normales en el día 3. Lo anterior pone de manifiesto que, tal y como ha sido demostrado en otros sistemas experimentales, la eritropoyesis y la leucopoyesis, aún cuando están íntimamente relacionadas, son reguladas en forma independiente.

Observando la cinética de los distintos parámetros hematológicos, todo parece indicar que el lapso de tiempo entre el segundo y cuarto día es crucial en la recuperación del conejo, pues es durante éste cuando se presenta un abatimiento drástico en la producción y/o liberación de reticulocitos, se reanuda la producción de normocitos y, aparentemente, es durante esos días cuando ocurre la mayor remoción de macrocitos de la circulación (fig. 8, 11 13).

Con relación a la disminución del número de reticulocitos que

ocurre entre esos días, la transferrina (Tf) pudiera ser uno de los factores involucrados. Esta proteína sérica es la encargada de transportar el hierro en la circulación hacia los sitios eritropoyéticos para su incorporación en la biosíntesis de la hemoglobina (96) y aparentemente, su concentración en el plasma sanguíneo puede influir enormemente en el número de reticulocitos circulantes, tal y como fue demostrado por Martínez Medellín y cols. (97), quienes trabajando en el mismo sistema experimental que el de este estudio, inyectaron Tf exógena a conejos que se encontraban en la etapa de equilibrio (día 11 de sangrado) y observaron, al día siguiente, un drástico decremento en el número de reticulocitos en la sangre.

Ahora bien, con respecto a la remoción masiva de macrocitos, no sabemos si se debe a que la vida promedio de éstos es considerablemente menor a la de los normocitos, lo que coincidiría con los reportado por F. Stohlman Jr. (98), quien demostró que los eritrocitos de rata producidos en respuesta a una anemia aguda y a eritropoyetina, presentan una vida promedio menor que los grupos controles, o bien, si lo que ocurre es que al suspenderse el sangrado se activan o producen factores que provocan la eliminación de las células macrocíticas circulantes.

Un hecho que nos llamó mucho la atención es el siguiente: cuando el conejo deja de ser sangrado, podría decirse que su sistema hematopoyético tiene dos tareas por efectuar, recuperar los niveles normales en cuanto a sus parámetros hematológicos y regresar a la producción de normocitos. Nosotros pensábamos que la primera de ellas sería la tarea prioritaria, considerando las condiciones fisiológicas del animal, sin embargo, nuestros resultados demuestran que no es así;

la producción de normocitos parece ser el fenómeno prioritario. Lo anterior indicaría que el conejo está tan bien adaptado a las condiciones fisiológicas experimentales, que puede permanecer en ellas durante los primeros días de la recuperación. Por otra parte, ignoramos cual pudiera ser el factor que actúe como señal para que se detenga la producción de macrocitos y se reinicie la de normocitos.

La rapidez con que el sistema hematopoyético tiende a regresar a las condiciones normales y su complejidad, vuelven a ponerse de manifiesto al observar la cinética de las células nucleadas de médula ósea. Por un lado, es clara la drástica disminución en la producción de Gr, mientras que Mn presenta una cinética irregular, aunque regresa también a su valor original. Con respecto a esta última población, hay que destacar que es muy heterogénea ya que en ella se encuentran, además de las células morfológicamente reconocibles, células con CFU-L-M, CFU-S, CFU-M, CFU-G-M, BFU-E y CFU-E, todas las cuales son indistinguibles a nivel de microscopía óptica. Por lo anterior, es realmente difícil el comprender totalmente el comportamiento de dicha población.

Tanto Gr com Mn han sido extensamente estudiadas en el humano y en otros mamíferos en condiciones normales y de trastornos hematológicos como leucemias (99,100), sin embargo, es poca la información que se tiene sobre su cinética in vivo durante estados de anemia, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo aportan datos que pueden ser de gran valor.

Con respecto a los estadios eritroides (Nb), es interesante el que cada uno de ellos haya seguido una cinética distinta, cuando en el periodo de anemia todos tuvieron un comportamiento similar. Pudiera

ser, como ya se ha mencionado, que los factores reguladores de la maduración eritroide sean distintos en ambos periodos.

Una vez suspendido el sangrado, la producción de PN no se detiene ni disminuye, sino que se incrementa (fig. 20), lo que de manera indirecta nos indica la alta actividad proliferativa y de maduración de las CFU-E. Por otra parte, hacia el final de la secuencia de maduración encontramos que hay un almacenamiento de NO (fig. 23); algo semejante fue observado por Lord (95), quien analizando la respuesta en la proliferación eritroide en el ratón durante la recuperación de una anemia aguda, encontró una acumulación de normoblastos tardíos (NO) en la médula ósea. Los resultados anteriores sugieren que, de alguna manera, ocurre un bloqueo en el paso de NO a R; dicho bloqueo se presenta, probablemente, a nivel de los mecanismos de expulsión del núcleo.

Ahora bien, durante la recuperación, y sobre todo en los primeros días de ella, no sólo ocurre una acumulación de NO, sino también de R en médula (figs. 30 y 31). Dicha acumulación es, seguramente, la principal razón del decremento en el número de R circulantes. En este caso, parece ser que existe un bloqueo en la salida de R a la circulación.

Por otra parte, al analizar comparativamente los porcentajes de R circulantes y de médula ósea, encontramos que en un conejo normal, el porcentaje de R en médula ósea es alrededor de 2.5 veces mayor que el de sangre; en un animal anémico en la etapa de equilibrio dicha relación se reduce drásticamente, lo que, de manera indirecta nos dice que el tiempo de tránsito de los R en médula ósea disminuye notablemente en condiciones de anemia. Algo muy parecido fue observado por Hillman y Finch (101). Durante la recuperación, dicha relación

aumenta, de tal forma que el porcentaje de R en médula ósea llega a ser 3.2 veces mayor que en sangre, lo que indica que el tiempo de tránsito se incrementó, produciéndose así la acumulación observada.

Todos los resultados anteriores nos llevan a proponer la existencia de, cuando menos, cuatro sitios específicos de regulación en la secuencia de maduración eritroide presentes durante el periodo de recuperación. El primero de ellos se encuentra entre PN y NB; el segundo entre NB y NP; el tercero entre NO y R y el cuarto a nivel de la liberación de R a la circulación (fig. 32).

Tal parece que al ser suspendido el sangrado los cuatro sitios son bloqueados, provocándose el almacenamiento de PN, el equilibrio en NB y la acumulación de NO; aparentemente, el paso de NO a R no es bloqueado totalmente, por lo que ocurre un incremento muy marcado de estos últimos en médula ósea. Poco después del día 2 hay una liberación parcial de R a la circulación. En el día 3, los que hemos denominado sitios 2 y 3 sufren modificaciones de tal forma que disminuyen los números de NB y NO. Alrededor del día 4, se quita el bloqueo en el paso de PN a NB y finalmente, después del día 6, el bloqueo en el sitio 4 desaparece totalmente.

Es importante considerar en este momento el periodo de vida del reticulocito en la circulación. En 1967, Hillman y Finch (101) demostraron que el tiempo de maduración del reticulocito en la sangre está en relación directa con el hematocrito; en el humano, cuando el Htc es de 45%, el tiempo de maduración del reticulocito circulante es de un día; cuando el Htc es de 35% el tiempo de maduración es de 1.5 días; a 25% de Htc corresponde un periodo de vida de 2 días y a 15% de Htc corresponden 2.5 días.

Es probable que en el conejo ocurra algo semejante, esto es, que en condiciones de anemia, el tiempo de tránsito del reticulocito en circulación se incremente. Sin embargo, si lo que ocurre en el humano también se presentara en nuestro sistema, cabría esperar que durante la etapa de recuperación los reticulocitos liberados a la circulación tuvieran un período de vida corto (como en condiciones normales); esto explicaría en cierta forma, el que aunque a partir del día 6 la liberación de reticulocitos a la circulación se normaliza, su número decae notablemente hasta el rango normal.

En relación al diámetro de los precursores eritroides nucleados, el regreso a los valores normales se inicia a partir del día 2, lo que indica que es rápido el cambio en la producción hacia las células normocíticas. En realidad, el decremento en cada uno de ellos es reflejo del cambio en su precursor inmediato, lo que una vez más, nos hace pensar que la señal que provoca dicho cambio debe ser recibida en, por lo menos, una población celular anterior a los PN, esto es, la población de CFU-E. Debido a que estas últimas no han sido plenamente caracterizadas en cuanto a su morfología, no existen datos referentes a alteraciones morfológicas en ellos, sin embargo, nuestros resultados pudieran plantear tal posibilidad.

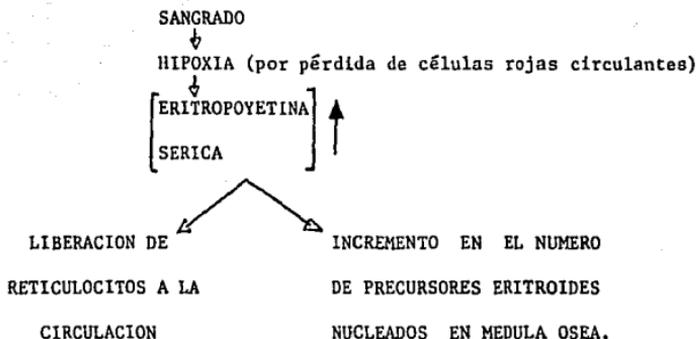
Los cambios a los que nos hemos enfocado en este trabajo, se refieren fundamentalmente a la cinética y morfología de las poblaciones celulares hematopoyéticas, así como a los diversos parámetros hematológicos. En dichos cambios, seguramente están involucrados distintos factores, los cuales, pudieran intervenir de manera directa o indirecta en la regulación de la hematopoyesis.

Dentro de los factores que, pensamos, deben estar jugando papeles importantes en la dinámica de producción de células sanguíneas bajo

las condiciones de nuestro estudio, se encuentran los siguientes:

En primer lugar, la eritropoyetina, cuyo efecto como estimulador de la eritropoyesis ha sido plenamente demostrado (75,77). Trabajos llevados a cabo en la década de los 60's, comprobaron que existe una relación inversamente proporcional entre la concentración de eritropoyetina sérica y el Htc., lo que implica que en sujetos anémicos, los niveles de eritropoyetina están incrementados (102); incluso se ha relacionado dicho incremento con una salida masiva de reticulocitos y células eritroides nucleadas a la circulación (103); esto último, como sabemos, ocurre en nuestro sistema de estudio durante la inducción de la anemia (73,84). Por otro lado, se ha observado que durante la recuperación de la anemia por deficiencia en hierro, los niveles de eritropoyetina sérica disminuyen, alcanzando la normalidad seis días después del inicio del tratamiento (104). Con base en lo anterior, pensamos que los niveles de eritropoyetina en circulación determinan en gran medida la dinámica de formación de células rojas en este sistema, es decir, que durante la inducción de la anemia, seguramente los niveles de eritropoyetina se incrementan, de tal forma que se estimula la salida de reticulocitos a la circulación, así como el incremento de las poblaciones de Nb en médula ósea.

De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, y considerando el modelo presentado por Fisher (105) sobre la regulación de la producción de eritropoyetina, creemos que durante la anemia inducida ocurre lo siguiente:



Ahora bien, una vez que se deja de sangrar al conejo, si bien el estímulo ya no está presente, el animal se encuentra todavía en un estado fisiológico de anemia, y sin embargo, desde el día 2 del periodo de recuperación, se abate la salida de reticulocitos a la circulación y se inicia la disminución, aunque lentamente, en el número de normoblastos en médula ósea.

Si es invariablemente cierto que mientras haya hipoxia los niveles de eritropoyetina estarán incrementados, esto significaría que durante la recuperación, hay otros factores que actúan a nivel de los precursores eritroides desplazando la acción de la eritropoyetina, e incluso se podría pensar en la presencia de algún inhibidor de esta última.

Otro factor sérico a considerar, es la transferrina. En nuestro laboratorio, ha sido demostrado que los niveles de esta proteína se incrementan aproximadamente al doble durante el periodo de anemia (84,89). Por otra parte, y como lo mencionamos anteriormente, al inyectar transferrina exógena en conejos anémicos, el número de reticulocitos circulantes se abate a la mitad en sólo 24 horas (97). Si relacionamos esto último con lo que ocurre entre los días 2 y 4 de

recuperación, implicaría que los niveles de transferrina se incrementan en forma considerable, una vez suspendido el sangrado, impidiendo la liberación de los reticulocitos. Sin embargo, no sabemos de qué manera actúa la transferrina, si es que está involucrada en dicho fenómeno.

El hierro, fundamental para la síntesis de la hemoglobina, es otro factor involucrado en la eritropoyesis. Sin embargo, a este respecto existen trabajos que difieren en cuanto al posible papel de dicho metal en la producción de células rojas. Por una parte, Hillman y Henderson demostraron que en sujetos con anemia crónica inducida por sangrado, el hierro administrado oralmente incrementa la producción celular de la médula ósea (106). Por otro lado, Martínez Medellín y colaboradores han demostrado que el hierro inyectado I.P. en conejos anémicos, no provoca cambios en el número de células rojas circulantes (97), aunque no sabemos en forma directa lo que ocurre en médula ósea. Aún cuando se antoja la posibilidad de que el hierro sea una de las señales que regulan la eritropoyesis en la recuperación, no sabemos cuál, específicamente, sería su papel.

Recientemente, Barnes y Frieden (107) han demostrado que los eritrocitos presentan receptores para ceruloplasma, proteína que, como se ha visto en este y otros laboratorios, está relacionada con el metabolismo del hierro. Dichos autores proponen que la ceruloplasmina desempeña un papel de protección del eritrocito, esto es, que al unirse a su membrana plasmática impide que sean destruidos. Si esto es cierto, podría ser que una de las particularidades de los macrocitos fuera el poseer menos (o no poseer) receptores para ceruloplasmina en su superficie, lo que contribuiría a hacer menor su vida promedio;

otra posibilidad es que los niveles de ceruloplasmina sérica disminuyan notablemente, sobre todo entre los días 2 y 4 de recuperación, provocándose así, la remoción masiva de macrocitos.

Otros factores que, muy probablemente, están también involucrados en la regulación de nuestro sistema experimental son: la Actividad Estimuladora de Colonias (CSA), la cual, como sabemos, tiene acción sobre la granulo-monopoyesis (49), vía de diferenciación hematopoyética que muestra grandes cambios durante el sangrado y la recuperación. Y, por otra parte, la Actividad Promotora de Estallidos (BPA), factor que regula la eritropoyesis en sus estadios más inmaduros (80).

Por último, haremos referencia al fenómeno denominado hematopoyesis extramedular, que consiste en la producción de células sanguíneas en sitios ajenos a la médula ósea. Diversos trabajos han demostrado que en el mamífero adulto bajo condiciones de anemia, el bazo es el principal sitio de hematopoyesis extramedular (95,108), contribuyendo, prácticamente en la misma proporción que la médula ósea, a la producción de células rojas. Su papel, sin embargo, no ha sido estudiado en nuestro sistema.

Si bien, el presente trabajo arroja una gran cantidad de información referente a la dinámica de la eritropoyesis en el conejo, bajo ciertas condiciones fisiológicas, es evidente que a partir de él surgen una serie de preguntas que habrá que tratar de contestar en el futuro. La mayoría de ellas, se refieren a la identificación y caracterización de los factores reguladores de la hematopoyesis.

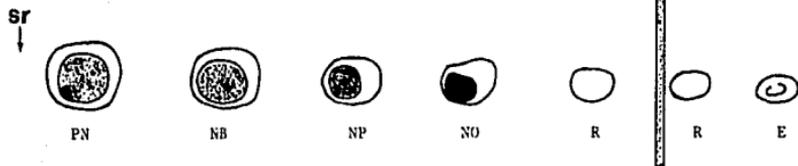
La transferrina, el hierro y la ceruloplasmina han sido objeto de estudio, por parte de nuestro laboratorio, durante el período de anemia (88,89,97) y actualmente se planea, ya, su estudio en la etapa

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

de recuperación. La dinámica de las células nucleadas circulantes debe ser, también, analizada a lo largo de esta etapa, pues ayudaría a comprender más a fondo la hematopoyesis. Será necesario, por otra parte, el realizar experimentos encaminados a conocer el periodo de vida de las células rojas en circulación, durante el sangrado y la recuperación. La hematopoyesis extramedular, principalmente en bazo, es otro de los aspectos que deberán ser caracterizados en nuestro sistema experimental.

Finalmente, recalcaremos la gran relevancia que tiene, en la investigación hematológica moderna, la purificación de los precursores hematopoyéticos y su estudio in vitro. Actualmente, en nuestro laboratorio hemos enfocado nuestra atención a los precursores eritroides y hemos desarrollado una metodología sencilla que nos ha permitido obtener, a partir de conejos anémicos, fracciones de sange con un 90% de reticulocitos, y de médula ósea, con un 80% de células eritroides nucleadas (109), lo anterior nos ayudará a la realización de futuros proyectos tanto in vivo como in vitro.

PERIODO DE ANEMIA



PERIODO DE RECUPERACION

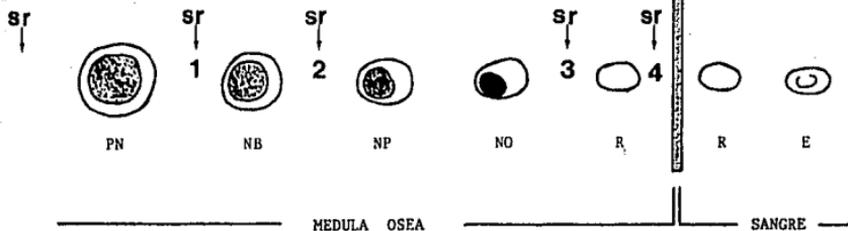


FIG. 32: Posibles sitios de regulación en la secuencia de maduración eritroide.

PN = Pronormoblasto, NB = Normoblasto Basófilo,

NP = Normoblasto Policromatófilo, NO = Normoblasto Ortocromático,

R = Reticulocito, E = Eritrocito, Sr = Sitio de regulación.

CONCLUSIONES

La hematopoyesis en general y la eritropoyesis en particular, constituyen procesos muy complejos, en los que están involucrados diversos factores y mecanismos, por lo que su estudio no resulta sencillo. Desde hace muchos años, se han desarrollado distintos sistemas experimentales, tanto in vivo como in vitro, de tal forma que el conocimiento alcanzado hoy en día en este campo de la investigación es realmente sorprendente.

En el presente trabajo, hemos estudiado la dinámica de producción de las células sanguíneas, básicamente de las células rojas, en el conejo, durante la recuperación de una anemia crónica inducida experimentalmente por sangrado. Los resultados más relevantes quedan expuestos en los siguientes puntos:

- a) La recuperación en sangre se inicia en forma inmediata, alcanzándose los valores normales de la mayoría de los parámetros hematológicos, alrededor del octavo día de recuperación.
- b) A lo largo de este período, se presentan, aparentemente, cuatro fases, lo que refleja los cambios en la dinámica de producción de células rojas.
- c) Tanto en sangre como en médula ósea, las células blancas siguen cinéticas muy distintas con respecto a las de la línea eritroide, lo que demuestra que, en nuestro sistema experimental, la leucopoyesis y la eritropoyesis, son reguladas de manera independiente.
- d) Una vez suspendido el sangrado, el sistema eritropoyético del conejo regresa rápidamente a la normocitosis, aún cuando, aparentemente eso retarda su llegada a los valores normales. A este

respecto, se observa que el conejo muy rápidamente deja de producir macrocitos, substituyéndolos por normocitos, y por otra parte, que ocurre una gran remoción de macrocitos de la circulación.

- e) A nivel de médula ósea, la población de granulocitos es la primera en regresar a los valores normales, llegando a ellos en el segundo día de recuperación; por su parte, las células mononucleares y los precursores eritroides nucleados lo hacen más lentamente, alcanzando la normalidad alrededor del día 15.
- f) Tal parece que a lo largo de la secuencia de maduración eritropoyética, se presentan, al menos, cuatro sitios de regulación: Tres de ellos actúan en el paso de un estadio celular a otro (PN-NB, NB-NP, NO-R), mientras que el cuarto, actúa a nivel de la liberación de los reticulocitos a la circulación.
- g) Aún cuando no sabemos con exactitud, cuales son los factores involucrados en la regulación de la hematopoyesis en el conejo durante la etapa de recuperación, y de qué manera actúan, es evidente que la respuesta ante la supresión del sangrado es más rápida que cuando éste se inicia.

REFERENCIAS

- 1) Ham, A. (1975) "Tratado de Histología". Ed. Interamericana, México p. 279
- 2) Perutz, M.F. (1978) Sci. Am. 239 (6):92
- 3) MacLean, N. (1979) "Hemoglobina", Ed. Omega, Barcelona, España.
- 4) Boggs, D. and Winklestein, A. (1975) White Cell Manual. 3rd. Edition, F.A. Davis Co.
- 5) Gordon, A. (1976) Fisiología de las Células Sanguíneas. C.E.C.S.A. México.
- 6) Erslev, A.J. and Gabazuda, T.G. (1979) Pathophysiology of blood, W.B. Saunders Company, U.S.A.
- 7) Kapff, C. and Jandi, J. (1984) Blood: Atlas and Sourcebook of Hematology. Little, Brown and Co., U.S.A.
- 8) Quesenberry, P. and Levit, L. (1979) New Engl. J. Med. 301 (15):819-
- 9) Krause, W. and Cutts, J.H. (1981) Concise Text of Histology. Williams and Wilkins Baltimore, U.S.A.
- 10) Orfanakis, et al. (1970) Am. J. Clin. Path. 53:647.
- 11) Metcalf, D. and Moore, M.A.S. (1971) Haemopoietic Cells. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- 12) Wintrobe, M. (1962) Clinical Hematology. Lea and Febiger, 5th Edition, U.S.A.
- 13) Maximow (1924) Physiol. Rev. 4(4):533
- 14) Moore, M.A.S. and Metcalf, D. (1970) Brith. J. Haematol. 18:279
- 15) Nessi, B. (1979) J. Embryol. Exp. Morph. 52:13
- 16) Van Dyke, D. et al (1972) en Hematology, Williams, J. et al. McGraw-Hill Co. U.S.A.

- 17) Van Dyke, D. and Harris, N. (1969) Blood 34(3):257
- 18) Huggins, C. and B.H. Blocksom, Jr. (1936) J. Exp. Med. 64: 253
- 19) Huggins, C. and Noonan, W.J. (1936) J. Exp. Med. 64:275
- 20) Weiss, L. (1966) J. Morph. 117:467-538.
- 21) Hillman, R. and Finch, C. (1974) Red Cell Manual 4th Ed. F.A. Davis Co.
- 22) Till, J.E. and McCulloch, E.A. (1961) Radiation Research 14:213-222.
- 23) Jacobson, L.O., et al. (1949) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 70:740-742.
- 24) Jacobson, L.O. et al (1951) J. Lab. Clin. Med. 37: 683-697.
- 25) Ford, C.E. et al (1956) Nature, 177: 452-454.
- 26) Becker, A.J., McCulloch, E.A. and Till, J.E. (1963) Nature, 197:452-454.
- 27) Siminovitch, L., McCulloch, E.A. and till, J.E. (1963) Journal of Cellular and Comparating Physiology, 62: 327-336
- 28) Schoefield, R. (1979) in Clinics in Haematology, 8(2): 1-18.
- 29) Lewis, J.P. and Trobaugh, F.E. (1964) Nature, 204:589-590.
- 30) Hanks, G.E. (1964) Nature, 203:1393-1395
- 31) Rencricca, N.J. et al (1970) Blood 36:764-771
- 32) Boggs, D. et al (1982) J. Clin. Invest. 70:242
- 33) Lord, B.I. and Hendry, J.H. (1972) Brit. J. Radiol. 45:110-115
- 34) Lord, B.I. (1978) in Differentiation of normal and neoplastic hematopoietic cells. Cold Spring Harbor Symposium Proceedings.
- 35) Van Bekkum, D.W., et al (1979) Blood Cells 5:143
- 36) Van Bekkum, D.W. et al (1971) Blood 38:547
- 37) Van Bekkum, D.W. et al (1985) Ann N.Y. Acad. Sci. 459: 143-149

- 38) Barr, R. D., Whang-Peng, J. and Perry, S. (1975) Science 190:284-285
- 39) Fowler, A. et al (1967) J. Cell. Physiol. 69:65.
- 40) Abramson, S., Miller, R.G. and Phillips, R. A. (1977) J. Exp. Med. 145:1567-1579
- 41) Keller, G.M. and Phillips, R.A. (1982) J. Cell. Physiol. 1:31-36.
- 42) Till, J.E. and McCulloch, E.A. (1980) Biochem. Biophys. Acta 605:431-459
- 43) Till, J.E. et al (1975) Fed. Proc. 34: 2279-2284
- 44) Tubiana, M. and Frindel, E. (1982) J. Cell. Physiol, 1: 13-21
- 45) Lord, B.I. (1979) in Clinics in Haematology 8(2): 223-241
- 46) Curry, J. et al. (1967) J. Exp. Med. 125:703
- 47) Dexter, T.M. (1982) J. Cell Physiol 1: 87-94
- 48) Sorrell, J.M. and Weiss, L. (1980) Amt. Rec. 197:1-19
- 49) Cline, M.J. and Golde, D.W. (1979) Nature 277:177-181
- 50) Ebbe, S. (1979) in Clinics in Haematology 8(2): 156-181
- 51) Moore, M.A.S. (1979) in Clinics in Haematology, 8(2):70-94
- 52) Micklem, H.S. (1979) in Clinics in Haematology 8(2):182-207
- 53) Rifkind, A.R, et al (1974) in Red Blood Cell I. 2nd. Ed. Acad. Press, Inc. USA
- 54) Lessin, L. and Bessis, M. (1972) in Hematology, J. Williams, et al., Ed. McGraw-Hill Company. N.Y. p. 62
- 55) Tsta, N.G. (1979) in Clinics in Haematology 8(2): 95-117
- 56) McLeod, D.L. et al (1974) Blood, 44:517
- 57) Heath, D.S. et al (1976) Blood, 47(5):777
- 58) Goldwasser, E. (1975) Fed. Proc. 34: 2285-2292
- 59) Worton, R.G., McCulloch, E.A. and Till, J.E. (1969) J. Cell. Physiol. 74:171-182

- 60) Bruce, W. and McCulloch, E.A. (1964) Blood, 23 (2):216-232
- 61) Cormack, D. (1976) Exp. Haematol 4:319-327
- 62) Gregory, C.J., McCulloch, E.A. and Till, J.E. (1973) J. Cell. Physiol. 81: 411-420
- 63) Paul, J. (1976) Br. Med. Bull 32 (3):277
- 64) Erslev, A. (1972) in Haematology J. Williams, et al. Ed. McGraw-Hill Co. N.Y . USA
- 65) Setchenska, M.S. et al (1981) Biochem. J. 196: 893-897
- 66) Setchenska, M.S. and Arnstein, H.R.V. (1983) biochem. J. 210: 559-566
- 67) Langstaff, J.M. and Arnstein, H.R.V. (1985) Biochem. Biophys. Acta 825:316-325
- 68) Denton, M. et al (1975) Biochem. J. 146: 205-211
- 69) Núñez, M.T. et al (1977) Brit. J. Haematol. 36:519
- 70) Skutelsky and Danon (1967) J. Cell. Biol. 33:625
- 71) Harris, J. and Kelkemeyer, R. (1970) The Red Ccell Harvard University Press, USA
- 72) Travassoli, and Crosby (1973) Science 179:912
- 73) Mainero del Paso, A. (1982) Tesis de Maestría. Fac. de Química, UNAM
- 74) Simpson and Kling (1967) J. Cell. Biol 35:237
- 75) Erslev, A. (1953) Blood 8:349-357
- 76) Migake, t., Kung, C.K.H. and goldwiser, E. (1977) J. Biol. Chem. 252:5558
- 77) Goldwasser, E. (1984) in Long-Term Bone Marrow Culture. Alan R. Liss, Inc. p. 355-362

- 78) Goldwasser, E. (1985) in Mediators in Cell Growth and Differentiation Raven Press N.Y. p. 103-107.
- 79) Beru, N. and goldwasser, E. (1985) J. Biol. Chem. 260(16):9251-9257
- 80) Iscove, N.N. (1977) Exp. Hematol 5:6
- 81) Linch, D.C. and Nathan, D.G. (1984) Nature 312(20)775-777
- 82) Lynch, D.C. et al (1985) J. Clin Invest. 75: 1278-1284
- 83) Bonanov-Tzechki, S.A. et al (1981) Cell Differentiation 10:267-279
- 84) Martínez-Medellín, J. et al (1982) in biochemistry and Physiology of Iron. Elsevier North Holland, Inc. p 239
- 85) Zucker, S. et al (1980) J. Lab Clin Med 96(5):770-782
- 86) Kaaba, S.A. et al (1984) Exp. Hematol 12:641-644
- 87) Valdéz López, V.M. (1977) Tesis Profesional. Fac. Ciencias, UNAM
- 88) Pulido Cejudo, G. (1982) Tesis Profesional. Fac. Ciencias, UNAM
- 90) Mayani Viveros, H. (1984) Tesis Profesional. Fac. Ciencias, UNAM
- 91) Atwater, J. and Erslev, A.J. (1972) in Williams, W.J. et al. Eds. Haematology McGraw-Hill book Co., N.Y. p. 1361
- 92) Williams, W.J. (1972) in Williams, W.J. et al. Eds. Haematology McGraw-Hill book Co. N.Y.
- 93) Mayani H. y Martínez-Medellín, J. (1985) en Memorias de la IV Reunión de Alumnos de Maestría y Doctorado en Biomedicina. Fac. Medicina, UNAM, p. 11
- 94) Vedrick, T. S. and H.A. Itano (1980) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 163:177-180
- 95) Lord, B.I. (1967) Brit. J. Haematol 13:160
- 96) Aisen, P. and Listowsky, I. (1980) Ann Rev biochem 49:357
- 97) Martínez-Medellín, J. et al. (1982) in biochemistry and Physiology of Iron. Elsevier North Holland Inc. p. 233

- 98) Stohman, F. (1961) Proc. Soc. Exp. Biol. Med 107:884-887
- 99) Finch, C. et al. (1977) Blood 50(4):699-707
- 100) Craddock, Ch (1972) in Haematology. Ed. by J. Williams et al.
McGraw-Hill Book, Co.
- 101) Hillman, R.S. and Finch, C. (1967) Seminars in Haematology 4:327
- 102) Adamson, J.W. (1968) Blood 32(4):597-609
- 103) Fisher, J.W. et al. (1965) Brit. J. Haematol. 11:342
- 104) Jansson, L.T. et al (1985) Blood 65(4)" 959-963
- 105) Fisher, J.W. (1983) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 173:289-305
- 106) Hillman, R.S. and Henderson, P.A. (1969) J. Clin. Invest 48: 454-460
- 107) Barnes, G. and Frieden, E. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun 125(1):157-162
- 108) Bruce, W.R. and McCulloch, E.A. (1964) Blood 23(2):216-231
- 109) Martínez-Medellín, J. y Mayani Viveros, H. (1986) en Memorias del XVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, Jalapa, Ver. p. 66.