



38  
209

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**"FORMACION Y DESARROLLO DE LOS  
ELEMENTOS FORMES DE LA SANGRE"**

**TRABAJO ESCRITO**

Que para obtener el Título de  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P r e s e n t a

**CECILIA ENRIQUETA GARCIA CASTILLO**

**FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1989



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

FORMACION Y DESARROLLO  
DE LOS ELEMENTOS FORMES DE LA SANGRE

INTRODUCCION

CAPITULO I

HEMATOPOYESIS

- 1.1 UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS.
- 1.2 COMPARTIMIENTOS CELULARES.
- 1.3 PROLIFERACION Y DIFERENCIACION DE CELULAS.
- 1.4 REGULACION DE LA PRODUCCION DE CELULAS MADRES.
- 1.5 FORMACION DE LA SANGRE EN EL EMBRION Y EN EL FETO.
- 1.6 HEMATOPOYESIS EXTRAMEDULAR.
- 1.7 HEMATOPOYESIS MEDULAR.
- 1.8 ANATOMIA DE LA MEDULA OSEA.
- 1.9 LIBERACION DE CELULAS DESDE LA MEDULA OSEA.

CAPITULO II

LINEA ERITROCITICA

- 2.1 ERITRON.
- 2.2 PROLIFERACION Y MADURACION DEL ERITRON.
- 2.3 PRECURSORES DEL ERITROCITO.
- 2.4 HEMOGLOBINA.
  - 2.4.1 METABOLISMO DEL HIERRO.
  - 2.4.2 SINTESIS DEL HEM.
  - 2.4.3 SINTESIS DE LA GLOBINA.
- 2.5 CONTROL DE LA ERITROPOYESIS.

CAPITULO III

LINEA GRANULOCITICA

- 3.1 SERIE MIELOIDE.
- 3.2 DIFERENCIACION DE LOS MIELOBLASTOS DE LOS LINFOBLASTOS Y DE OTROS BLASTOS.
- 3.3 COMPARTIMIENTOS MITOTICO Y DE MADURACION.
- 3.4 TIEMPO DE TRANSITO A TRAVES DEL "POOL" DE MADURACION NO DIVISIBLE.
- 3.5 MECANISMOS DE CONTROL QUE REGULAN LA GRANULOPOYESIS.

CAPITULO IV  
SERIE MONOCITICA

CAPITULO V  
SERIE LINFOCITICA

- 5.1 LINFOPOYESIS
- 5.2 CONTROL DE LA HEMATOPOYESIS

CAPITULO VI  
LINEA MEGACARIOCITICA

## INTRODUCCION.

La sangre es el vehículo líquido por medio del cuál los principales nutrientes orgánicos son transportados desde el intestino donde se absorben hasta el hígado donde se elaboran, y de ahí a otros órganos; es el vehículo por el cuál los productos orgánicos de desecho y el exceso de iones minerales se transportan a los riñones para su excreción, es el vehículo de transporte de oxígeno desde los pulmones a los tejidos, así cómo de la eliminación del CO<sub>2</sub> producido durante el metabolismo respiratorio. Además la sangre sirve para transportar hormonas y otros mensajeros químicos desde diversas glándulas endócrinas hasta sus órganos blanco específicos.

El sistema vascular humano contiene 75 ml/kg de peso de sangre, aproximadamente la mitad de su volumen son células.

Las células de la sangre (eritrocitos, plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos) se pierden constantemente y por lo tanto para mantener la homeostasis cada sistema debe tener la capacidad de la autorenovación y proliferación (a través de división celular). Durante la embriogénesis muchos sistemas dependen de la continúa renovación de estas células progenitoras primitivas, pero en la vida adulta pocos tejidos mantienen esta dependencia.

Estás células, aparte de los linfocitos y posiblemente los monocitos se diferencian hasta un punto en el cuál la división

celular no es posible o no se produce, por lo que en estos sistemas la renovación comprende la división de las células inmaduras junto con la diferenciación (maduración)

En ciertas células hematopoyéticas en desarrollo la proliferación y la maduración se producen concomitantemente durante determinado período. En este sistema las células hijas de la mitosis son más maduras que la célula madre al comienzo del ciclo generativo y la proliferación cesa después de un número variable de divisiones de duplicación aunque la maduración continúa.

En circunstancias normales los eritrocitos y los neutrofilos están maduros al momento de entrar en la sangre, pero otras células como los monocitos continúan el proceso de maduración después de atravesar la sangre y entrar en tejidos como el bazo, la cavidad peritoneal y el pulmón.

Estas células progenitoras son también llamadas células madres y están definidas como células con la capacidad de autorrenovación duplicación y diferenciación.

Existen diferentes argumentos y experimentos que confirman la existencia de una célula madre común para los eritrocitos, plaquetas y leucocitos, así como también se ha visto que la célula madre primitiva es pluripotencial, con gran capacidad de autorrenovación y sus progenies más diferenciadas son unipotenciales para cada una de las líneas eritroide,

granulocítica y megacariocítica con una limitada capacidad de autorrenovación.

Se ha sugerido también la existencia de células madres bipotenciales para megacariopoyesis y eritropoyesis ó tripotenciales para las 3 líneas.

Existen sustancias humorales así como la influencia de factores ambientales que actúan en varios sitios de la proliferación y diferenciación de estos sistemas.

## CAPITULO I

### HEMATOPOYESIS

#### 1.1 UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS.

Las bases celulares para la hematopoyesis fueron establecidas en 1960 por Till y McCulloch, en estudios con ratones irradiados letalmente. Demostraron que hay una relación lineal entre el número de células medulares inyectadas en ratones letalmente irradiados y el número de nódulos macroscópicos de tejido hematopoyético presentes sobre la superficie del bazo del receptor, 16 días después de la inyección. Al inyectarles por vía intravenosa células de médula, eran capaces de formar nódulos discretos de células de la médula en el bazo. Estos nódulos llamados colonias del bazo o esplénicas tenían células eritrocíticas, granulocíticas, megacariocíticas y células indiferenciadas, en poblaciones puras ó formando mezclas. Se observó que predominaron las colonias eritroides con proporciones variables de las demás y, después del crecimiento extendido, la mayoría de las colonias se mezcló.

A estas células se les llamó unidades formadoras de colonias (UFC).

Para demostrar que las UFC derivan de una sola célula (célula madre pluripotencial) se inyectó a ratones irradiados células de médula con cromosomas marcados por radiación, las colonias resultantes mostraron cariotipos anormales en el 90 a

95% de las metafases.

Estudios utilizando un modelo similar mostraron que marcadores cariotípicos únicos se presentan tanto en el fierro marcado presente en el eritrocito cómo en las células granulocíticas peroxidasa positiva.

El origen de estas células aisladas de las colonias esplénicas se confirmó también inyectando a animales irradiados una mezcla de células normales y singénicas con cromosomas translocados marcados. Las colonias resultantes contenían metafases que eran normales ó bien presentaban el marcador. No se observaron cariotipos mezclados.

Estudios citogenéticos subsecuentes demostraron que estas colonias eran clonales, es decir se originaban de una célula única. Estas colonias pueden contener eritrocitos, neutrófilos, megacariocitos y eosinófilos, lo que indica que la UFC es pluripotencial para las líneas celulares eritroide, neutrófila, eosinófila y megacariocítica. Los datos citogenéticos que provienen de pacientes con leucemia mielocítica crónica (LMC) son compatibles con la existencia de esa célula en el hombre.

La existencia de una célula madre pluripotencial en la médula humana se infiere por diferentes observaciones que derivan de diversas enfermedades hematológicas. La leucemia mielocítica crónica ( LMC) se caracteriza en el 90% de los casos por la presencia de un cromosoma anormal denominado Philadelphia (Ph'), eso se presenta en las células eritroides, granulocíticas y

megacariocíticas, lo que supone que una célula común a estas líneas es la primeramente afectada.

Ninguno de estos estudios responde al interrogante de un origen común ó separado de los basófilos a partir de los neutrófilos, eosinófilos ú otras células. Sin embargo, colonias cultivadas en medios semisólidos y provenientes de médula humana ó de sangre humana contienen neutrófilos, eosinófilos y monocitos. Puesto que estas colonias son de naturaleza clonal, al menos en el hombre, estas observaciones y las mezclas mieloblasto-monoblasto que se encuentran en pacientes con leucemia aguda sugieren un origen común para los neutrófilos, eosinófilos y monocitos.

En ninguno de los estudios mencionados anteriormente se indica que los linfocitos comparten un precursor común con otras células de la sangre. Sin embargo y en condiciones de extrema deprivación celular en el ratón, hay pruebas citogenéticas de que esa célula existe. En los ratones que se recuperan de una grave depresión de los depósitos de las células madres, se observó una aberración cromosómica similar en las colonias hematopoyéticas del bazo y en los tejidos linfoides. El sistema inmunológico de ratones letalmente irradiados ha sido repoblado con células provenientes de colonias de bazo. En el hombre pueden observarse defectos linfocíticos y eritrocíticos asociados y la coexistencia de defectos congénitos marcados por

hipoplasia medular e hipogamaglobulinemia es compatible con el concepto de una célula pluripotencial para el tejido mieloide y linfoide, así mismo en pacientes con LMC se han observado algunos casos con positividad del cromosoma Ph' para todas las líneas celulares incluyendo la linfoide, lo cuál habla del origen común de estas células.

La célula UFC se presenta en un estado de reposo, ya que dosis elevada de hidroxiaurea (agente que destruye las células en la síntesis de DNA) no destruyen muchas de las células UFC cuando se les administra a ratones normales.

Para demostrar la capacidad de autorrenovación de estas células madres, se extrajeron colonias esplénicas derivadas de una célula única, 10 ó 14 días después de ser inyectados; una suspensión de estas células fue inyectada a nuevos animales irradiados, determinando el número de UFC generadas por colonia de bazo. El número de colonias nuevas extraída, estuvo en el rango de 0 - 1000, demostrando la capacidad de las UFC de autorrenovación.

Estas observaciones demostraron la capacidad de una célula progenitora aislada, para una proliferación extensiva y diferenciación en las tres líneas hematopoyéticas celulares.

## 1.2 COMPARTIMIENTOS CELULARES

Cada una de las células sanguíneas debe ser provista de un compartimiento de células madres, cuyo número permanece estable

en condiciones homeostáticas.

En un compartimiento de células madres que permanece estable en número, pero que aporta células diferenciadas, se debe agregar una célula al compartimiento por proliferación dentro del mismo, por cada célula que lo abandona por proceso de diferenciación. Osgood sugirió que estos compartimientos se mantienen por cada división celular, dando por resultado una célula que abandona el compartimiento por diferenciación y una célula que permanece en el compartimiento, una forma asimétrica de división celular. La denominó división alfa-alfa N, y pensó que la división alfa-2, en la cual ambas células hijas permanecen como células madres es un hecho infrecuente. Otra forma de modelo separa los procesos de diferenciación y división celular y evita el concepto de división celular asimétrica. En este modelo por cada célula que es inducida a la diferenciación, y por lo tanto, abandona el compartimiento de células madres, existe otra que es inducida hacia el tipo de división alfa-2alfa, manteniendo así un número estable del compartimiento.

La estructura exacta y las interrelaciones de los compartimientos de las células madres hematopoyéticas, no se conocen. Basados en observaciones morfológicas, Maximow y otros investigadores consideran probable que todas las células de la sangre deriven de una célula madre común: Teoría Monofilética,. Otros, como Sabin y sus colaboradores sugirieron que hay un compartimiento de células madres separado y diferente

para cada una de las células de la sangre: Teoría polifilética completa. Nayeli, Schilling, Downey y otros investigadores propusieron otras teorías intermedias entre estos 2 extremos, (dualista, trilateralista, neounitaria, etc). Las pruebas actuales sugieren que tanto los monifiletistas como los polifiletistas tenían razón.

Los datos con los que actualmente se dispone, relacionados de modo directo con los compartimientos de células madres, provienen principalmente de estudios de las colonias hematopoyéticas esplénicas en el ratón, colonias de células granulocítas cultivadas in vitro a partir de la médula y sangre de ratón y del hombre, ó cultivadas in vivo en cámaras de difusión y a partir de las alteraciones cromosómicas ú otros cambios celulares asociados con enfermedades humanas.

La pruebas actuales señalan que hay un modelo para los compartimientos de células madres con las siguientes características:

- 1) En condiciones normales, los compartimientos de células madres diferenciadas proveen las células de la sangre. Normalmente los neutrófilos, eosinófilos y monocitos se encuentran en un compartimiento común, a juzgar por su coexistencia en las colonias in vitro.
- 2) Si se dañan los compartimientos diferenciados, ó si se produce una mayor demanda de células madres, un compartimiento que se

encuentra normalmente en estado de reposo (Go) comienza con la proliferación y diferenciación para proveer a los compartimientos de células madres para la formación de eritrocitos, megacariocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos.

3) En presencia de daño hematopoyético grave, una célula que es pluripotencial para todas las células de la sangre se activa con el fin de llenar otros sistemas de células madres.

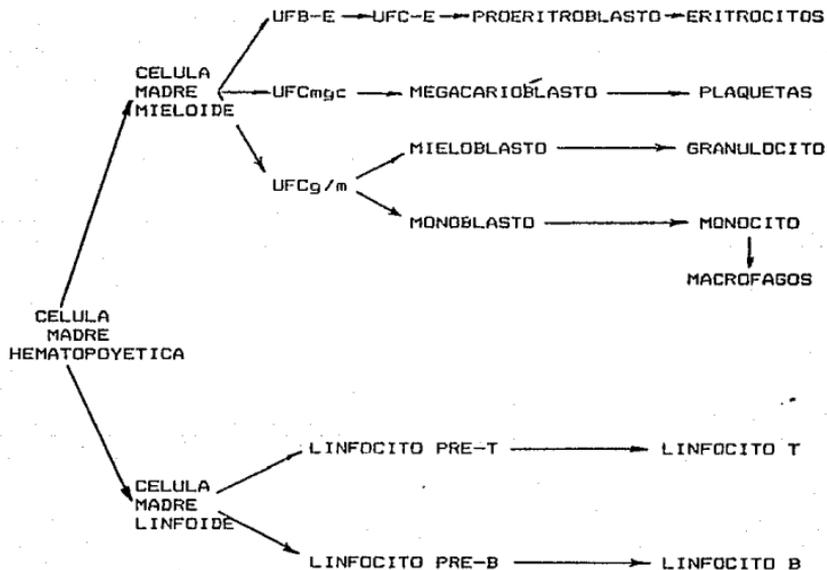
Es posible que estos compartimientos separados sean en realidad un compartimiento único.

Hasta hoy, las células madres pluripotenciales no han sido identificadas. La primera célula propuesta como pluripotencial, desde el tiempo de Maximow, ha sido el linfocito pequeño, y Yoffey y sus colaboradores, entre otros, apinan en favor del linfocito de tamaño intermedio (célula transicional).

Se han hallado células formadoras de colonias en exudados inflamatorios, y este hecho, unido a alguna prueba complementaria, se interpretó como que el monocito fuera la célula formadora de colonias.

Sin embargo, no se ha logrado identificar a ciencia cierta este tipo de elementos pluripotenciales, pero gracias a los estudios multidisciplinarios se ha establecido su existencia.

DIAGRAMA DE INTERRELACION DEL ORIGEN DE LAS CELULAS DE LA SANGRE



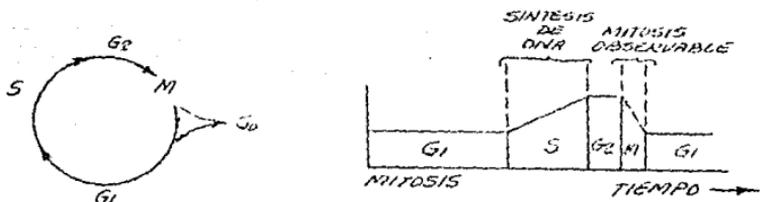
### 1.3 PROLIFERACION Y DIFERENCIACION DE CELULAS.

**PROLIFERACION.** Las células capaces de proliferación pueden encontrarse en un ciclo generativo ó en estado de reposo del cuál pueden ser lanzadas al ciclo generativo. Durante el ciclo generativo, la cantidad total de DNA se duplica y se produce un aumento en otros constituyentes celulares, tales como RNA y proteínas. Durante el proceso de mitosis se produce una distribución igual de los constituyentes celulares a cada célula hija. La síntesis de DNA al parecer, es la clave del ciclo generativo y está limitada a las células en este ciclo. La síntesis de RNA y otras proteínas puede producirse durante el estado de reposo ó en células incapaces de proliferación.

. El ciclo generativo se divide en 4 fases:

En la primera fase ó G<sub>1</sub>, comienza la síntesis de RNA y proteínas y en algún punto de esta fase se inicia el proceso, aún no definido, que desencadena la síntesis de DNA. En la segunda fase ó S, se produce la síntesis de DNA, seguida por G<sub>2</sub>, y a su vez por la mitosis (M). La síntesis de proteínas y la expansión del volumen celular continúan durante todo el ciclo.

DIAGRAMA DEL CICLO GENERATIVO.



- G1 - El núcleo contiene DNA diploide.  
 S - Período de duplicación de DNA.  
 G2 - El núcleo contiene DNA tetraploide.  
 M - Período de mitosis.  
 G0 - Estado de reposo. Tiene potencial para división.  
 Tiempo de generación - Tiempo de una mitosis hasta la siguiente.

El DNA es el depositario de la información genética que se encuentra codificada en la larga molécula polimérica por variación en la secuencia de las bases púricas y pirimídicas. Las cuatro bases del DNA normal son 2 purinas, adenina y guanina, y 2 pirimidinas, timina y citosina.

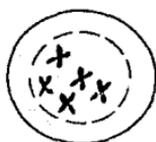
El ritmo de síntesis de proteína disminuye durante G2.

El momento inicial de la mitosis, al parecer, está más estrechamente relacionado con el volumen celular que con la edad de la célula, lo que sugiere que la cantidad de material sintetizado podría desencadenar la mitosis.

La duración de G1 es muy variable y el mecanismo primario para acortar el tiempo de generación, con la finalidad de acelerar el ritmo de producción celular, consiste en acortar G1.

El comienzo de la MITOSIS se expresa morfológicamente por la disolución de la membrana nuclear y la organización de la cromatina en cromosomas individuales (profase). Luego se alinean los cromosomas con sus modelos duplicados aún unidos en el centrómero cromosómico reduplicado (metafase). Los husos tubulares mitóticos que conectan el centrómero cromosómico al centriolo celular, se contraen, y la mitad de cada uno de los cromosomas duplicados migra hacia los centriolos (anafase). Alrededor de cada uno de los dos juegos de cromosomas, se forma una membrana nuclear, la membrana citoplasmática se invagina alrededor de los núcleos y la célula se separa (telofase).

#### DIAGRAMA DE LAS CUATRO ETAPAS DE LA MITOSIS.



PROFASE



METAFASE



ANAFASE



TELOFASE

**DIFERENCIACION.** El patrón de diferenciación distingue una línea celular de otra, debido a que todas las células en un individuo normal llevan el mismo patrón genético cromosómico. En general, se puede sostener que de la misma manera que la síntesis de DNA, según parece, es la clave de la actividad

proliferativa, la síntesis de RNA, lo es de la diferenciación. Se reconocen por lo menos 3 clases de moléculas de RNA: el RNA ribosómico de alto peso molecular (RNAR), el RNA de transferencia de bajo peso molecular (RNAT), por lo menos con un tipo de molécula para cada aminoácido, y, finalmente, el RNA mensajero (RNAm). Las moléculas de RNAm transmiten el mensaje codificado de DNA para la síntesis de proteínas. Sin embargo muchos factores regulan los procesos específicos de diferenciación, morfogénesis y organización celular.

En ciertas células hematopoyéticas en desarrollo la proliferación y la maduración se producen concomitantemente durante determinado período. En estos sistemas las células hijas de la mitosis son presumiblemente más maduras que la célula madre al comienzo del ciclo generativo. La proliferación cesa después de un número variable de divisiones de duplicación, pero la maduración continúa. En circunstancias normales, los eritrocitos y los neutrófilos están virtualmente maduros en el momento en que penetran a la sangre. Sin embargo, otras células, tales como los monocitos continúan el proceso de maduración después de atravesar la sangre y entrar en tejidos como el bazo, la cavidad peritoneal y el pulmón.

Durante la división celular se produce un nuevo par de cromosomas idénticos; es decir, el par inicial de cromosomas se duplica. Ya que los cromosomas contienen los genes que

determinan la individualidad de la célula, el hecho de que el proceso sea replicativo asegura la perpetuación. En términos químicos un cromosoma es una molécula de DNA. Por lo tanto la producción de cromosomas (replicación) se reduce a los eventos de la biosíntesis del DNA, primero, el RNA es sintetizado a partir de la información de los genes del DNA, segundo, la información del RNA se usa luego para dirigir la formación de las proteínas.

#### Síntesis de RNA.

El RNA se transcribe de DNA modelo por la influencia de polimerasas RNA DNA dependientes. El código genético es seguido por la transcripción de adenina RNA desde la timina DNA, de uridina RNA desde la adenina DNA, de la citosina RNA desde la guanidina DNA y de la guanina RNA desde la citosina DNA. Tres pares de bases consecutivas de DNA forman un codón y cada uno de los 64 codones posibles lleva instrucción para un aminoácido específico ó para un mensaje de instrucción para "comenzar o detener" la producción de una cadena polipeptídica.

#### Síntesis de las Proteínas.

Se realiza en las células por la interacción del RNAt con RNAm, aminoácidos, varias enzimas y ribosomas. Los ribosomas, compuestos de RNAr y proteína, comprenden dos unidades diferentes, unidas por iones magnesio, y son el sitio de la síntesis y ensamblado de la cadena polipeptídica. Los aminoácidos se activan por medio de una enzima específica para

cada uno y reaccionan con un RNAt específico para formar aminoacilo-RNAt, y entonces se ligan a los ribosomas. El RNAm de cadena simple se mueve a través de una secuencia de ribosomas formando un complejo RNAm-polipeptidil RNAt, el cuál se transloca al sitio de enlace polipeptidil RNAt sobre la unidad ribosómica más pequeña. El ensamble polipeptídico comienza en el extremo N terminal y se detiene cuando se alcanza una codificación triple, para "detenerse" en la secuencia RNAm. El RNAt específico se libera del ribosoma después que su péptido se agrega a la cadena.

Se sabe que el nucleolo es un sitio importante de ensamble del RNAm y que desempeña un papel importante en la producción de los componentes ribosómicos.

La mayor parte de la energía contenida en el trifosfato de adenosina (ATP) que se requiere para la formación de proteína y para otras funciones celulares, tales como la mitosis, se genera por glucólisis ó en el ciclo del ácido tricarbóxico, usualmente en las mitocondrias. En éstas también se producen importantes reacciones enzimáticas tales como algunas de las implicadas en la biosíntesis del HEM. Debe notarse que los requerimientos de energía, al parecer, difieren en las distintas etapas del ciclo celular. Por ejemplo cuando no se genera energía las células no entran en la profase, pero aquellas que ya se encuentran en la profase completan la mitosis. El Aparato de Golgi es un compartimiento ligado a la membrana de la célula

que contiene enzimas que intervienen en el agregado de mas secuencias hidrocarbonadas terminales a las mitades proteicas, particularmente aquellas de las membranas.

En ciertas células normales, tales como los megacariocitos, y en una variedad de enfermedades, la telofase no se completa y se forman células multinucleadas. Se dice que estas células son poliploides y difieren de las células por un numero anormal de cromosomas contenidos dentro de un sólo núcleo.

#### 1.4 REGULACION DE LA PRODUCCION DE CELULAS MADRES.

En general, se puede afirmar que la hematopoyesis se mantiene en un estado estable en el cuál la producción de células maduras iguala la pérdida de células. El aumento en la demanda de células, como consecuencia de una enfermedad ó de cambios fisiológicos, se suple por una mayor producción de aquellas. Por lo tanto el sistema debe estar sujeto a alguna forma de control de retroalimentación (feedback).

Este control podría ejercerse por factores humorales ó sobre la base de la concentración celular local a traves de una interacción célula a célula. Hay pruebas que sugieren sistemas de control humoral separados y diferentes del tejido eritrocítico, neutrófilo y megacariocítico, pero hasta el momento no se ha obtenido ninguna prueba directa de un control del sistema hematopoyético por una interacción célula a célula.

El control del tamaño del compartimiento UFC se comprende

todavía menos que los mecanismos de control en los compartimientos celulares diferenciados. Si la totalidad del compartimiento UFC se reduce de tamaño, como se logra en el caso de irradiación corporal total, casi inmediatamente comienza un nuevo crecimiento por autorreplicación. La estimulación de la producción de células maduras tal como se obtiene por medio de la inyección de eritropoyetina, conduce a una rápida expansión del compartimiento UFC. Por lo tanto, la proliferación de la célula UFC aumenta por una reducción del tamaño del compartimiento o por una mayor demanda de células maduras.

La diferenciación, cuando no hay autorreplicación, es potencialmente suicida para un compartimiento de células madres, especialmente si éste se ha reducido de tamaño. Podría haber un mecanismo protector eficiente para el compartimiento UFC. Después que el compartimiento se ha reducido a menos de un 10% de lo normal por medio de irradiación, no se puede detectar ninguna diferenciación hasta que el nuevo crecimiento por autorreplicación ha restablecido parcialmente el compartimiento. La vía de diferenciación de las células UFC es dependiente del grado de demanda de estas células. Una vez que la diferenciación comienza en un compartimiento UFC reducido, la salida relativa hacia las líneas eritroide ó granulocítica es guiada por los respectivos grados de demanda para cada tipo celular.

### 1.5 FORMACION DE LA SANGRE EN EL EMBRION Y EN EL FETO.

La síntesis de la hemoglobina se inicia en el saco vitelino en todos los vertebrados embrionarios durante el periodo mesoblástico de la hematopoyesis. La mayoría de los investigadores opinan en favor de un origen mesenquimático más que endodérmico para los islotes sanguíneos del saco vitelino. Estas células producen hemoglobinas especiales que no se encuentran durante la eritropoyesis posterior, en ninguna de las especies estudiadas hasta el momento, sin embargo se encuentran indicios en especies filogenéticas inferiores.

La globina de la hemoglobina, que se detecta primero en el embrión humano, está compuesta por cadenas de polipéptidos que son diferentes a todas las otras cadenas de globina reconocidas hasta ahora y se denominan cadenas epsilon (hemoglobina Gower tipo I, epsilon 4). Poco tiempo después comienza la producción de cadenas alfa normales de hemoglobina, y la hemoglobina del saco vitelino puede representarse como alfa2 epsilon 2 (hemoglobina Gower tipo II). De acuerdo con lo que se sabe hasta ahora, todos los eritrocitos circulantes producidos en esta etapa son eritrocitos nucleados grandes con cromatina nuclear de aspecto inmaduro (Producción megaloblástica).

Comenzado aproximadamente en la sexta semana de la vida embrionaria, la producción de eritrocitos por el saco vitelino disminuye y comienza la producción de eritrocitos dentro del

embrion humano. Alrededor de las 10 semanas, ya no se detecta eritropoyesis del saco vitelino. La eritropoyesis se percibe en el hígado fetal aproximadamente a las 6 semanas, en el bazo fetal alrededor de las 12 semanas, y en la médula, aproximadamente a las 20 semanas. Cuando el embarazo llega a su término, virtualmente toda la eritropoyesis se encuentra limitada a la médula.

Durante toda la vida fetal, los eritroblastos del hígado, bazo y médula producen principalmente hemoglobina fetal (F) (alfa 2 gamma 2). No es sino hasta después del nacimiento que se observa una apreciable conversión hacia la hemoglobina adulta. Además de la Hb-F, la sangre del cordón contiene dos componentes menores (10%) denominados F1 y F11. Estos estudios sugieren que la hematopoyesis fetal puede producirse independientemente de la eritropoyetina.

Los eritrocitos derivados de los sacos vitelinos son células primitivas nucleadas grandes (180 a 280 micras cúbicas) y tienen una vida media más corta que los eritrocitos adultos, ya que desaparecen virtualmente todos al cuarto mes. Posteriormente en la eritropoyesis fetal los eritrocitos son más pequeños que las células del saco vitelino, pero son aún macrocíticos de acuerdo con los estándares adultos. Generalmente pierden su núcleo antes de penetrar en la circulación. Los glóbulos rojos circulantes alcanzan el millón/microlitro del segundo al tercer mes fetal, y luego aumentan en forma continua hasta

acercarse a los niveles adultos normales poco tiempo antes de finalizar el embarazo normal.

Sin embargo no es sino hasta que comienza la hematopoyesis en la médula, que la producción de granulocitos y megacariocitos se hace notable. Estos datos sugieren que la médula es el único órgano potencialmente hematopoyético con el medio ambiente adecuado para el completo desarrollo del tejido granulocítico y megacariocítico.

#### 1.6 HEMATOPOYESIS EXTRAMEDULAR.

En la vida posfetal, y en diversas circunstancias, se ha observado la formación de células de la sangre aparentemente normales fuera de los límites de la médula. El bazo es el lugar donde más comúnmente se ha hallado hematopoyesis, pero también se ha registrado en el hígado, ganglios linfáticos y con menos frecuencia en las glándulas adrenales, cartílago, ligamento ancho, trombos, tejido adiposo, áreas intratorácicas, riñón y endosteo. Estas islas hematopoyéticas pueden estar compuestas por tejido eritrocítico, granulocítico ó megacariocítico aparentemente puro ó mixto, que semeja las colonias esplénicas clonales del raton que se recupera de la irradiación.

En general la hematopoyesis extramedular se encuentra en asociación con enfermedades caracterizadas por una producción aumentada de uno ó mas tipos de célula (eritroblastosis fetal,

anemia perniciosa, talasemia, anemia de células falciformes, esferocitosis hereditaria y varios tipos de leucemia.)

#### 1.7 HEMATOPOYESIS MEDULAR.

En los adultos normales, la médula, que es activa para la hematopoyesis, se encuentra limitada a las vertebras, costillas, esternón, pelvis, escápula, cráneo y a las extremidades proximales de los húmeros y fémures. La cavidad medular de los restantes huesos de los miembros se encuentra llena de grasa.

En condiciones anormales, caracterizadas por un aumento de la hematopoyesis de larga duración, se puede observar una expansión periférica de médula hematopoyeticamente activa. En lactantes y niños se produce una hematopoyesis activa en las porciones más distales de las extremidades, en comparación con los adultos. Se puede obtener una estimación global de la localización de médula hematopoyeticamente activa al inyectar isótopos adecuados y realizando el scanning de todo el cuerpo para detectar emisiones radiactivas. Los coloides marcados son fagocitados por las células reticuloendoteliales de la médula, y en el estado normal su distribución es igual a la distribución de la hematopoyesis activa.

#### 1.8 ANATOMIA DE LA MEDULA OSEA.

La cavidad medular de los huesos del hombre se encuentra parcialmente dividida en compartimientos, por placas de

trabéculas óseas que protruyen dentro de la cavidad en ángulos rectos con respecto al hueso medular externo. La médula hematopoyética contenida dentro de este espacio es un tejido gelatinoso a semilíquido, de trama laxa y rico en grasa.

El sistema vascular de la médula ósea es complejo y la producción de células hematopoyéticas, sigue con bastante exactitud la disposición vascular. Las arterias nutricias localizadas centralmente emiten ramas que terminan en lechos capilares dentro del hueso, ó en la periferia del espacio medular. Algunos de los capilares ó vénulas poscapilares (vasos de los canales óseos) vuelven a entrar en la cavidad medular y se unen para formar grandes senos venosos en los cuáles el flujo relativamente lento se dirige nuevamente hacia el centro de la cavidad. Estos senos tienen a menudo un complejo patrón de intercomunicación, pero en ocasiones fluyen hacia la vena central, la cuál sigue el mismo trayecto general que la arteria central. El parénquima hematopoyéticamente activo y la grasa llenan el espacio entre los sinusoides. La hematopoyesis se realiza por fuera de los sinusoides medulares. La pared de los sinusoides venosos de la médula está compuesta principalmente por una red celular endotelial unicelular.

La hematopoyesis se produce dentro del parénquima de la médula, limitado por los sinusoides.

## 1.7 LIBERACION DE CELULAS DESDE LA MEDULA OSEA.

No se conoce con exactitud el control de la liberación de células y los mecanismos de liberación, no hay duda que las células dejan el parénquima y penetran en los sinusoides a través de fenestraciones de las células endoteliales que revisten los sinusoides, pero lo que no está claro es cómo se forman estas fenestraciones. Debido a que los granulocitos son móviles y se hacen más móviles y más deformables a medida que maduran se piensa que migran en dirección al sinusoide. Una hipótesis para explicar la acción del factor liberador de neutrófilos sería sugerir que éste factor actúa como un atractivo para los neutrófilos maduros.

Los megacariocitos se observan usualmente en estrecha proximidad con la membrana sinusoidal, y se han descrito apéndices citoplasmáticos fenestrando las células endoteliales. Por lo tanto la liberación directa de plaquetas dentro del sinusoide a través de la rotura celular ó teóricamente a través de la dispersión del citoplasma requiere solo el desgarro de la membrana citoplasmática del megacariocito.

No se conoce el mecanismo que promueve la liberación del eritrocito básicamente no móvil. En respuesta a una hemorragia aguda, se observa un brusco aumento en el número de eritrocitos maduros en el parénquima medular. Esto sugiere que algunos vasos pueden vaciarse directamente dentro del parénquima y en algunas circunstancias pueden transportar células desde el

parénquima hacia los senos. Las células adventicias pueden cambiar de posición en respuesta a un agrandamiento de los senos, comprimiendo tal vez el parénquima y exprimiendo las células hacía afuera por contracción del espacio parenquimatoso. Se ha sugerido que la viscosidad de los materiales intercelulares del parénquima medular puede ser un medio de influencia sobre la liberación de eritrocitos.

Un factor de importancia en la liberación celular es la deformabilidad celular. Los reticulocitos, los glóbulos rojos maduros y los granulocitos son mucho más deformables que sus precursores. Tal vez la liberación es controlada por una combinación del cambio del flujo sanguíneo directamente hacia el parénquima, volumen sinusoidal y parenquimatoso, y niveles de atractivos celulares en la sangre sinusoidal. El hecho de que una célula sea liberada depende de su capacidad para deformarse lo suficiente como para atravesar las fenestraciones de la pared sinusoidal.

## CAPITULO II

### LINEA ERITROCITICA

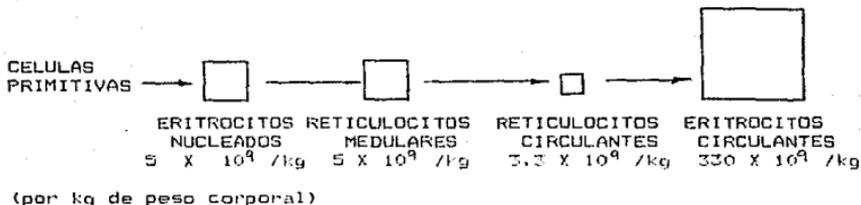
#### 2.1 ERITRON.

Las células de la sangre son diferentes de la mayoría de los tejidos orgánicos en que las células maduras y funcionantes se encuentran físicamente separadas de sus precursores.

Dentro del eritrón, la maduración y proliferación celular se producen simultáneamente. Todos los precursores eritrocitarios morfológicamente identificables se encuentran destinados a madurar, por lo tanto son incapaces de automantenimiento.

Este concepto enfatiza la unidad funcional de los glóbulos rojos y sus precursores. El eritrón ha sido comparado con la piel, la cuál evoluciona a través de capas de células de creciente madurez, hasta una capa de células esencialmente inertes pero funcionalmente importantes, las del estrato córneo. Del mismo modo se puede pensar del eritrón con sus primitivos normoblastos que originan, después de una serie de cambios a los glóbulos rojos, no nucleados y altamente especializados. El tejido intersticial del eritrón está representado por el plasma, la grasa y el retículo de la médula ósea. Cuando se le considera como un todo, el eritrón es un órgano mucho más grande que el hígado.

### MODELO A ESCALA DEL ERITRON



### 2.2 PROLIFERACION Y MADURACION DEL ERITRON.

Todavía no se comprenden totalmente los detalles del esquema de proliferación dentro del eritron, ya que deben basarse en ciertas presunciones. Por ejemplo el cálculo del tiempo que una célula permanece en una etapa morfológica dada (el tiempo de tránsito de compartimiento ó TTC) depende de si se piensa que los productos de la mitosis son reconocibles en una forma más madura que la célula madre (es decir división heteromorfogénica), ó si las células hijas son indistinguibles de la célula madre (división homomorfogénica). Según cuál de estos dos tipos de división se produzca, el TTC para los normoblastos basófilos puede ser muy corto, de 12.4 horas ó muy prolongado de 95 horas, y para los normoblastos policromatófilos, de 8.8 a 37.5 horas. El TTC para los pronormoblastos es de aproximadamente 30 horas y para los normoblastos ortocromáticos de 19 hrs. Por lo tanto median de 70 a 180 horas para que un pronormoblasto se desarrolle en un reticulocito medular, y transcurren 2 ó 3 días más antes de la liberación desde la médula hacia la sangre.

Probablemente, durante la maduración de los precursores eritroides se produzcan de 3 a 5 divisiones celulares. Por lo tanto de cada pronormoblasto derivan de 8 a 32 glóbulos rojos maduros. Según el esquema que se muestra se supone que se producen 4 divisiones, dos de éstas durante la fase de normoblasto basófilo y una al final de cada una de las etapas de pronormoblasto y de normoblasto policromatófilo respectivamente. Los normoblastos ortocromáticos no pueden sintetizar DNA, y, por lo tanto no pueden dividirse.

Dos hechos pueden disminuir la producción teórica de células. Uno de estos es la muerte de la célula antes o poco tiempo después de su liberación desde la médula (eritropoyesis inefectiva). El segundo es la omisión de una división celular, fenómeno que da como resultado una célula grande y pobre en hemoglobina. Estos dos hechos se producen sólo en forma limitada en los sujetos normales, pero pueden encontrarse muy aumentados en circunstancias patológicas.

Presumiblemente, la diferenciación de la célula madre en pronormoblasto se realiza por la inducción de ciertos genes, en especial aquellos necesarios para la síntesis de la hemoglobina, y por la represión de otros no requeridos para la función eritrocitaria. La etapa de pronormoblasto es dominada por el proceso de síntesis de RNA, como lo demuestra la presencia del nucleolo grande y activo. Se forman 3 especies de RNA,

ribosómico (RNAr) de transferencia (RNAt) y mensajero (RNAm), probablemente en proporciones relativas de 80:15:5, respectivamente. La síntesis de RNA declina a medida que la célula madura, y tal vez cesa al final de la etapa basófila.

Las proteínas sintetizadas durante la fase de pronormoblasto son principalmente proteínas, no hemoglobina. Las primeras trazas de hemoglobina pueden detectarse en la etapa de normoblasto basófilo, pero la hemoglobina no es evidente con el microscopio común hasta la etapa policromatófila. En esta etapa, la síntesis de hemoglobina alcanza su máximo. La síntesis de hemoglobina continúa durante la etapa ortocromática y persiste en el reticulocito después de la pérdida del núcleo. Los eritrocitos maduros, al estar desprovistos de ribosomas, no pueden sintetizar hemoglobina.

Dentro del núcleo se encuentra hemoglobina que penetra posiblemente a través de poros en la membrana nuclear.

Después de alcanzar una concentración crítica (posiblemente 20 g/dl), la hemoglobina nuclear puede reaccionar con las histonas nucleares produciendo de esa manera la inactivación cromosómica y la condensación nuclear. Según esta hipótesis, el número de divisiones celulares y el tamaño final del eritrocito se encuentran relacionados con la velocidad de síntesis de la hemoglobina.

En contraste, los macrocitos observados cuando se estimula la eritropoyesis pueden concebirse como el resultado final de una

aceleración de la síntesis de hemoglobina inducida por la eritropoyetina, lo cual conduce, a su vez, a un comienzo más precoz de la degeneración nuclear y a un número reducido de divisiones celulares.

Después que el núcleo degenera, es expulsado de la célula. Este proceso, se completa en el transcurso de 5 a 60 min. Durante el proceso de expulsión, las mitocondrias y las vesículas citoplasmáticas se acumulan cerca del margen nuclear. El núcleo expulsado arrastra consigo un anillo de citoplasma que incluye ribosomas, hemoglobina y mitocondrias condicionales.

Dentro de la médula, al parecer, la desnucleación se produce a medida que el eritroblasto atraviesa la célula endotelial que forma la pared del seno. El citoplasma del normoblasto y los orgánoides pequeños (ribosomas y mitocondrias) pasan forzosamente a través de poros endoteliales y citoplasmáticos de 1 a 4 micras de diámetro, pero el núcleo más rígido no se puede adaptar a este tamaño del poro, por lo tanto el núcleo es atrapado y expulsado de la célula. Poco después de la desnucleación el núcleo es englobado por un macrófago.

A continuación de la desnucleación, la célula permanece dentro de la médula como reticulocito durante varios días.

Después de su liberación, el reticulocito puede quedar secuestrado durante 1 ó 2 días en el bazo. En este lugar puede producirse una maduración adicional y alterarse la

composición de los lípidos de la membrana.

Los reticulocitos tienen una mayor adhesividad que los eritrocitos adultos y se mueven en corrientes a una velocidad mucho menor que las células maduras. Esta propiedad de adhesividad como la descrita para las células más primitivas, puede explicar su tendencia a permanecer dentro de la médula ósea en condiciones normales. Al parecer, tienen un revestimiento de globulina, siendo por lo menos una parte de ese, transferrina. Su paso específico es menor que el del eritrocito adulto y tienden a agruparse en las porciones superiores de las suspensiones de eritrocitos. Varían en su resistencia a las soluciones hipotónicas, y poseen vías metabólicas que faltan en los glóbulos rojos maduros, incluyendo un ciclo del ácido tricarboxílico intacto.

### 2.3 PRECURSORES DEL ERITROCITO

ERITROBLASTO, término usado por Ehrlich para denominar todas las formas de glóbulos rojos nucleados, tanto patológicos como normales. Clasificó los eritroblastos en dos categorías principales: una serie normal, los normoblastos y una serie patológica, los megaloblastos.

La célula precursora eritrocitaria reconocible menos madura se llama PRONORMOBLASTO. Las células características de las etapas subsecuentes de la maduración se denominan NORMOBLASTOS BASOFILOS, NORMOBLASTOS POLICROMATOFILOS, NORMOBLASTOS

## ORTOCROMATICOS, RETICULOCITOS Y ERITROCITOS MADUROS.

El PRONORMOBLASTO (proeritroblasto de Ferrata, hemoblasto linfoide de Pappenheim, "rubriblasto", "prorrubricito") es una célula redonda ú oval de tamaño moderado a grande (14 a 19 micras de diámetro). Posee un núcleo relativamente grande y un borde de citoplasma basófilo. Tiene nucleolos que pueden ser prominentes. La membrana nuclear es muy fina ó delicada. En esta etapa no se puede distinguir hemoglobina en la célula por lo que es difícil su clasificación cómo miembro de la serie roja. El citoplasma tiene tendencia a ser mas homogéneo y condensado y puede ser de aspecto granular, puede encontrarse un área pálida pequeña que corresponde posiblemente al aparato de Golgi. La cromatina nuclear es algo más gruesa que en los mieloblastos o linfoblastos. En los preparados con tinción supravital se observan en el citoplasma algunas mitocondrias bastoniformes.

El NORMOBLASTO BASOFILO (eritroblasto basófilo de Ferrata, eritroblasto primitivo de Sabin, "rubricito basófilo") es similar al pronormoblasto, excepto que los nucleolos han desaparecido y la célula es algo más pequeña (12 a 17 micras de diámetro). La cromatina tiene el aspecto de un material grueso y granular. La estructura nuclear puede adoptar una posición en rueda de carro, y allí tiende a haber un neto contraste entre la cromatina y la paracromatina. El citoplasma es muy basófilo, inclusive más que en el pronormoblasto, lo que indica la presencia de RNA. Los

cambios de color que se observan durante las etapas subsecuentes manifiestan la aparición de hemoglobina acidófila y la desaparición del RNA.

El primer tinte tenue de hemoglobina introduce en la siguiente etapa, que se denomina NORMOBLASTO POLICROMATOFILO (eritroblasto primitivo de Sabin, rubricito policromático). En esta etapa se observa una creciente condensación de la cromatina nuclear. Se forman conglomerados irregulares de cromatina que pueden teñirse intensamente. No se visualizan nucleolos. El núcleo es mas pequeño (7 a 9 micras) como lo es toda la célula (12 a 15 micras). Con los colorantes supravitales el número máximo de mitocondrias se encontrará en las primeras fases de esta etapa, pero disminuye a medida que la hemoglobina se hace mas abundante.

Cuando el citoplasma posee casi la totalidad de su contenido en hemoglobina, la célula se denomina NORMOBLASTO ORTOCROMATICO (acidofilo), denominación que pretende dar a entender que el tinte citoplasmático es similar al de los eritrocitos maduros. Es el más pequeño de los precursores nucleados del eritrocito (8 a 12 micras de diámetro). En esta etapa final el núcleo sufre una degeneración picnótica, la cromatina se condensa de modo considerable y el núcleo disminuye, pudiendo tener el aspecto de una masa casi homogénea, la cual es finalmente expulsada cuando ingresa a la microcirculación de la médula ósea.

**RETICULOCITOS.** Después que el núcleo ha desaparecido ciertos organoides citoplasmáticos, cómo los ribosomas, las mitocondrias y al aparato de Golgi, persisten durante un corto tiempo. El nuevo azul de metileno ú otros agentes fijadores similares, que se utilizan en la coloración, producen una precipitación uniforme del RNAr, y la intensidad de la coloración basófila es aproximadamente proporcional a la cantidad de RNA presente. Con tinciones policromatófilas la coloración de estas células pueden tener un aspecto uniformemente azul o gris (basofilia difusa), ó varios tonos basófilos pueden entremezclarse con partes que se tiñen de rosa (policromatofilia ó policromasia). Se debe distinguir los efectos del exceso de coloración que afectan a todos los glóbulos rojos del extendido, de la basofilia verdadera que se encuentra solamente en una pequeña proporción de células.

La basofilia punteada ó punteado basófilo es la denominación que se emplea cuando existen gránulos azulados ó negro-azulados en los glóbulos rojos coloreados por uno de los métodos de Romanowsky. Los gránulos pueden ser finos ó gruesos y generalmente son uniformes y redondos, aunque también pueden ser angulosos y se les ha observado en preparados sin colorear y en exámenes con campo oscuro. La coloración con métodos supravitales especiales demuestra un tercer tipo de basofilia, la sustancia granulofilamentosa.

La relación entre la basofilia difusa, el punteado y los

reticulocitos son el resultado de distintas manipulaciones del eritrocito en la preparación para la microscopía. Una fijación rápida ó los agentes fijadores fuertes producen una elevada proporción de células policromatófilas y escasas células punteadas, mientras que la coloración prolongada tiene el efecto opuesto.

En los reticulocitos, el retículo puede aparecer como una estrecha banda que atraviesa la célula, puede encontrarse distribuido uniformemente por toda la célula, ó poseer un conglomerado tan denso como para tener aspecto de núcleo. En general, la cantidad de retículo disminuye en los reticulocitos a medida que la célula madura, y en los reticulocitos tardíos sólo se observan gránulos escasos o algunos filamentos dispersos. Sin embargo la forma y densidad del retículo también dependen de varios factores físicos, cómo la concentración del colorante, el secado del extendido, el calentamiento, el pH, sustancias como la glucosa y las sales sódicas.

Los reticulocitos son más grandes que los eritrocitos totalmente maduros siendo su volumen un 20 % mayor.

**ERITROCITO MADURO.** El eritrocito maduro de los mamíferos es una de las células más altamente especializadas. Está desprovisto de los organoides citoplasmáticos usuales, tales como el núcleo, las mitocondrias ó los ribosomas. Está compuesto por algo más que una membrana rodeando una solución de proteína y

electrolitos. Más del 95% de las proteínas es hemoglobina. El resto de la proteína incluye aquellas enzimas que se requieren para la producción de energía y para el mantenimiento de la hemoglobina en un estado funcional de reducción.

La forma del eritrocito humano normal en reposo es la de una estructura aplanada, bilateralmente indentada, mencionada a menudo como "disco bicóncavo" el diámetro medio normal varía de 7.2 a 7.9 micras. El espesor medio normal de los eritrocitos es de 2.14 micras, 2.05 micras o 1.84 y aún de 1.64 micras.

El volumen medio del eritrocito humano normal es de aproximadamente 87 micras cúbicas.

El área de superficie del eritrocito es aproximadamente de 140 micras, mucho mayor de lo que se esperaría si el volumen se encontrará distribuido en un esfera.

La membrana del eritrocito es un componente dinámico de la célula. Tiene la propiedad de una permeabilidad selectiva, y facilita el paso de cationes contra un gradiente iónico. También sirve como sitio de fijación para ciertas enzimas. Por estos medios mantiene el líquido intracelular y el ambiente electrolítico dentro de límites relativamente estrechos.

La función del glóbulo rojo es mediar el intercambio de los gases respiratorios, oxígeno y dióxido de carbono, entre los pulmones y los tejidos.

Con respecto a los requerimientos para la eritropoyesis, los primeros conocimientos concernientes a las sustancias necesarias

para la hematopoyesis se obtuvieron por la observación de los efectos de las restricciones dietéticas. Whipple y sus colaboradores fueron los iniciadores en este campo, al demostrar claramente la importancia de diferentes nutrientes como las proteínas, aminoácidos, vitamina B12 y ácido fólico, vitamina B6, riboflavina, ácido pantoténico, ac. nicotínico (niacina), ac. ascórbico, vitamina E, y otras vitaminas liposolubles, minerales, cobre, cobalto (elemento esencial en el sentido de que es un componente de la molécula de vitamina B12), zinc.

Se requiere una gran variedad de materiales para la eritropoyesis. Ninguno de estos materiales es específico en el sentido de que es necesario solamente para la eritropoyesis y no para otros sistemas del cuerpo.

Con el MICROSCOPIO ELECTRONICO se ha visto que se puede encontrar ferritina en el citoplasma del pronormoblasto. La ferritina es una proteína grande y con contenido en hierro tiene el aspecto característico de una tetrada, puede aparecer como moléculas aisladas dentro del citoplasma ó se le puede encontrar en vesículas pinocíticas ó en estructuras más grandes (rodeadas a menudo por una membrana) denominadas siderosomas. Su importancia morfológica reside en que constituye una pauta importante en la identificación de una célula dada como un precursor eritrocitario.

El citoplasma de los precursores eritrocitarios contiene

ribosomas, en su mayoría estos permanecen libres dentro del citoplasma en lugar de formar parte de un retículo endoplasmático bien definido. En las células que se encuentran sintetizando activamente hemoglobina, los ribosomas se hallan en unidades conocidas como polirribosomas; éstas comprenden de 2 a 8 ribosomas individuales, unidos por una banda de RNAm. Los ribosomas alcanzan su número máximo en la etapa de NORMOBLASTO BASOFÍLO y desaparecen gradualmente a medida que la célula madura. Persisten durante varios días después de la desaparición del núcleo y son el principal constituyente del retículo de los RETICULOCITOS.

En las células eritroides, las mitocondrias son redondeadas u ovals, y las crestas son menos evidentes que en otras líneas celulares, son más numerosas en las primeras etapas de maduración.

En toda la extensión del citoplasma se observan muchas vesículas pequeñas, de aproximadamente 50 mμ de diámetro, tienen una membrana única con una capa interna poco nítida y a veces contienen partículas de ferritina. Se cree que estas vesículas se originan por pinocitosis o rofecitosis, mediante el cual las sustancias macromoleculares se introducen en la célula, la vesícula se forma de una invaginación de la membrana celular seguida por el cierre de ésta, para constituir una vacuola que posteriormente se separa de la membrana.

Otras estructuras citoplasmáticas del normoblasto joven

incluyen el aparato de Golgi y ocasionales microtúbulos orientados al azar, estos pueden ser remanentes de husos mitóticos.

## 2.4 HEMOGLOBINA.

### 2.4.1 METABOLISMO DEL HIERRO.

El contenido total de hierro del cuerpo tiende a permanecer dentro de límites relativamente fijos, ya que de otra manera se produce una siderosis ó un deficit de fierro. Esto implica que las pérdidas de hierro deben compensarse por la absorción de hierro de los alimentos. El hierro no se " excreta " en el sentido usual de la palabra. Su pérdida generalmente es a traves de células epiteliales del tracto gastrointestinal. El hierro urinario alcanza menos de 0.05 mg/día y esta representado en gran parte, por células descamadas. En la mujer, el flujo menstrual constituye una importante vía adicional de pérdida de hierro.

En situación anormal, estas perdidas son balanceadas por una cantidad equivalente de hierro absorbido de la dieta.

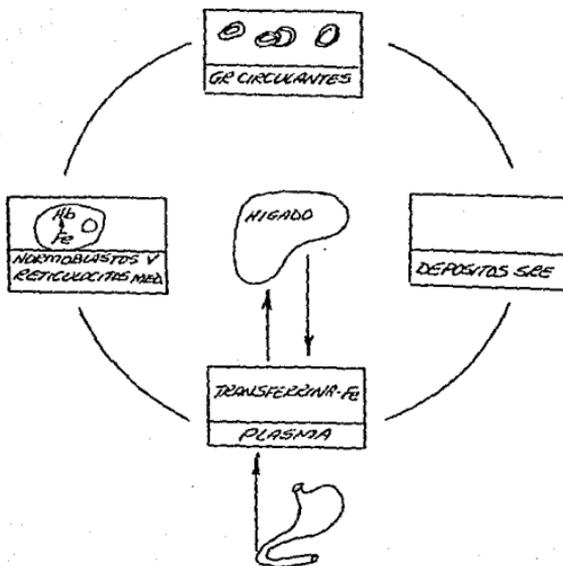
El hierro se absorbe principalmente en las porciones altas del intestino, sobre todo a nivel de duodeno, y la capacidad de absorción es mucho menor en los segmentos intestinales mas distales. Esta localización se encuentra, en parte, relacionada con factores intraluminales tales como el pH y el potencial redox.

Hay por lo menos 2 vías diferentes para la absorción del hierro: una para el hierro unido al hem y otra para el hierro que se encuentra en la forma de ión ferroso. El hierro de la dieta debe convertirse en una de éstas dos formas para absorberse.

Otras formas de hierro de los alimentos deben convertirse al estado ferroso para absorberse.

El metabolismo del hierro está dominado por su papel en la síntesis de la hemoglobina. En este proceso, el hierro se utiliza una y otra vez, pudiendo establecerse como un ciclo. En la parte central de este ciclo se encuentra el compartimiento del hierro plasmático en el cuál el hierro se liga a una proteína de transporte, la transferrina. El hierro se mueve desde el plasma hacia las células que tienen la capacidad de producir hemoglobina. Cuando la síntesis se ha completado, el hierro ahora en forma de hemoglobina en los eritrocitos maduros, es enviado a la circulación. Al final de su vida máxima de 120 días, los eritrocitos son fagocitados por los macrófagos del sistema reticuloendotelial (SRE), donde el hierro es extraído de la hemoglobina. Parte de este hierro puede permanecer depositado en el SRE como ferritina ó hemosiderina, pero la mayor parte es enviado hacia el plasma donde se une a la transferrina, completando el ciclo.

## CICLO DEL HIERRO



La proteína plasmática de enlace con el hierro, la transferrina ("siderofilina"), es una glucoproteína con la movilidad electroforética de una beta-globulina. Se sintetiza

principalmente en el hígado por las células parenquimatosas. La concentración en el plasma es de cerca de 2.5 g/l . Más comunmente se cuantifica en términos de la cantidad de hierro que fijará, medida que se denomina " capacidad total para fijar hierro " (CTFH).

La transferrina liga 2 moléculas de hierro trivalente (férrico), en puntos espacialmente separados sobre la proteína. En circunstancias fisiológicas, la afinidad de la transferrina por el hierro es muy grande. La constante intrínseca de enlace es del orden de 10, valor mucho más elevado que para otros agentes quelantes del hierro conocidos. La afinidad de la transferrina por el hierro puede disminuirse reduciendo el pH ó el hierro a la forma bivalente (ferrosa).

La entrega mediada por transferrina del hierro a los precursores eritrocitarios imparte dirección al flujo de hierro. El hierro no ligado no se orienta hacia un blanco específico, en cambio, deja rápidamente el plasma y se distribuye hacia muchos tejidos, independientemente de su necesidad en hierro.

En el curso del aporte de hierro a los precursores eritrocitarios, la transferrina se une transitoriamente con las células, fenómeno que en cierto grado es característico de especie. Solamente las células que pueden sintetizar hemoglobina se unen con transferrina.

Fletcher y Huehns propusieron que los dos puntos de enlace del hierro de la transferrina se comportan de manera diferente

con respecto a la transferencia de hierro de los tejidos. Un sitio denominado "A", libera preferentemente su hierro a los eritroblastos, mientras que el sitio "B" libera su hierro a otros tejidos tales como el hígado.

La velocidad de entrada del hierro dentro de los normoblastos también se encuentra íntimamente relacionada con la biosíntesis del hem. El agregado de hem libre inhibe la absorción in vitro de hierro por los reticulocitos. Mas aún, una disminución en la concentración intracelular de hem libre, inducida por inhibidores de la síntesis del hem (isoniazida), produce un aumento en la absorción del hierro, y un aumento del hem libre intracelular, inducido por inhibidores de la síntesis de globina (cicloheximida), tiene el efecto opuesto. Estos fenómenos pueden reflejar un sistema de retroalimentación-inhibición, que regula el aporte de hierro de acuerdo con las necesidades de la célula para la síntesis de hemoglobina.

El sistema de la transferrina representa indudablemente la vía más importante mediante la cual el hierro accede al eritrocito. Una vía alterna describe islotes de normoblastos en la médula ósea centrados alrededor de grandes células reticuloendoteliales, se considera que éstas son unidades anatómicas precisas por medio de las cuales los normoblastos obtienen hierro, así como otros elementos formativos esenciales. La superficie del normoblasto presenta pocas invaginaciones que

se transforman en vacuolas diminutas que penetran en el citoplasma (rofeocitosis).

El destino del hierro después de su penetración al normoblasto se conoce a grandes rasgos, alrededor de un 80 a 90 % del hierro que penetra en la célula es tomado por las mitocondrias e incorporado en la hemoglobina. La mayor parte del hierro restante está representado por ferritina (puede detectarse en los eritrocitos por la reacción de azul de Prusia). Los normoblastos con gránulos azul de Prusia positivos (sideróticos) se denominan sideroblastos, y si estos persisten después de la desnucleación las células maduras se denominan siderocitos.

En el eritrocito, la ferritina desempeña el papel de un componente de un mecanismo mediante el cual el hierro que no es necesario puede almacenarse temporalmente y después excretarse. Esta función se puede deducir de dos observaciones: 1) una vez que el hierro se incorpora a la ferritina, parece que no interviene en la síntesis del hem, y 2) la célula puede descargar ferritina hacia el plasma circundante.

Los dos compuestos de depósito del hierro son la ferritina y la hemosiderina. La molécula de ferritina tiene una forma casi esférica y consiste en una cubierta de proteína rodeando un núcleo de hidroxifosfatoférrico. La hemosiderina al parecer, proviene de la ferritina, es un agregado denso ó cristal de ferritina el cuál puede ó no estar rodeado por una membrana.

Representa una forma más estable y menos disponible de hierro de depósito que la ferritina.

**HEMOGLOBINA** Es el nombre que se aplica a la proteína para el transporte de oxígeno que se encuentra en los eritrocitos. Debido a que representa alrededor del 90% del peso seco del eritrocito maduro, una importante proporción de la actividad de biosíntesis del normoblasto en desarrollo debe dedicarse a su producción. Es una proteína conjugada de peso molecular cercano a 64,500. Aproximadamente el 96 % de la molécula es proteína (globina) y el resto está representado por un grupo prostético muy coloreado, el hem, un complejo de hierro y protoporfirina. Una velocidad óptima de síntesis de hemoglobina requiere el funcionamiento adecuado de tres vías metabólicas correspondientes a cada uno de los tres componentes estructurales de la hemoglobina:

la vía metabólica del hierro, la biosíntesis del hem y la biosíntesis de la globina.

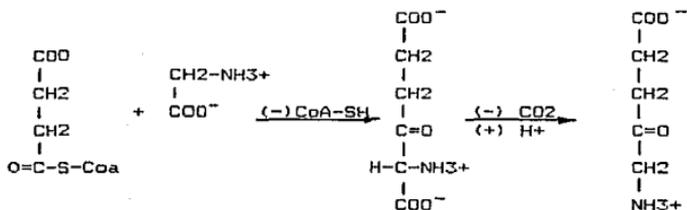
#### 2.4.2 SINTESIS DEL HEM

Se produce en la mayor parte de las células corporales excepto en los eritrocitos maduros, pero sobretodo en los precursores eritroides.

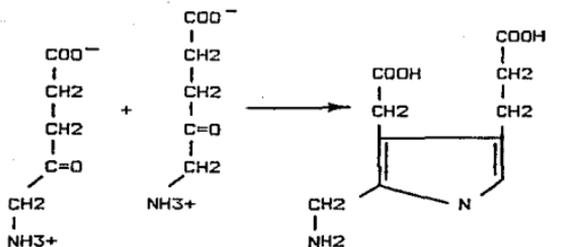
La succinil coenzima A se condensa con la glicina para formar un compuesto intermedio inestable, el ácido alfa-amino-beta-cetoadípico, que es descarboxilado prontamente para dar el

ácido delta-aminolevulínico (ALA). Esta condensación requiere fosfato de piridoxal (vitamina B 6) y debe tener lugar en las mitocondrias intactas.

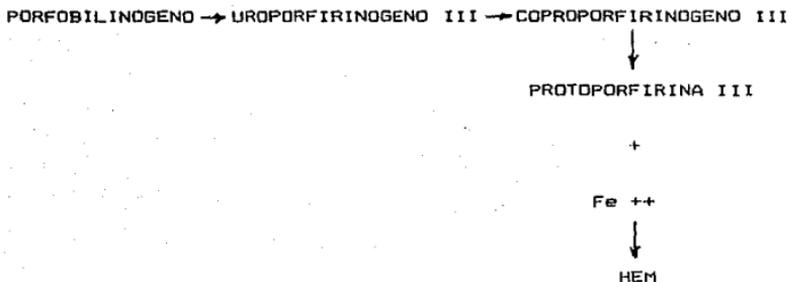
### Del Ciclo Ac. Tricarboxílico



SUCCINIL COENZIMA A + GLICINA  $\longrightarrow$  ALFA-AMINO-BETA-CETOADIPICO  $\longrightarrow$  AC. DELTA AMINO LEVULINICO



PORFOBILINOGENO



El succinil coenzima A puede obtenerse del ciclo del ácido tricarboxílico, su precursor normal es el alfa-cetoglutarato, o bien de otras fuentes metabólicas como la reacción de succinato con coenzima A (CoA) y trifosfato de guanósina en presencia de la succinil CoA sintetasa; de la transferencia de coenzima A del aceto acetil CoA al succinato, una reacción catalizada por la aceto acetil CoA: succinil CoA transferasa; y por valina e isoleucina, que son metabolizadas a succinil CoA vía propionil CoA y metilmalonil CoA.

Dos moléculas de ALA se condensan para formar un monopirrol, el porfobilinógeno, catalizadas por la enzima ALA-deshidrasa. Tanto el ALA como el porfobilinógeno se excretan normalmente por la orina en pequeñas cantidades.

El hem, producto final de la vía, deprime la síntesis de ALA

sintetasa. Otro factor que afecta la velocidad de esta reacción es la inhibición por retroalimentación: el hem no solamente deprime la síntesis enzimática, sino que también inhibe la actividad de la enzima ya formada. Al parecer logra esta inhibición formando un complejo de coordinación entre su átomo de hierro y la enzima y debido a estos efectos de depresión e inhibición, cualquier acumulación de hem conduce a una disminución en la velocidad de síntesis de ALA, inversamente, si el hem es removido rápidamente por unión con la globina, se estimula la síntesis de ALA.

Para formar uroporfirinógeno III ó I, reaccionan cuatro moléculas de porfobilinógeno, esta reacción requiere dos enzimas, la uroporfirinógeno sintetasa (porfobilinógeno desaminasa) y la uroporfirinógeno III cosintetasa. El tipo isómero III se convierte por la vía del coproporfirinógeno III y el protoporfirinógeno lo hace en protoporfirina. La protoporfirina suele encontrarse en los eritrocitos maduros. El hierro se inserta en la molécula de protoporfirina mediante la enzima mitocondrial ferroquelatasa para formar la molécula de hem completa.

La biosíntesis del hem guarda una peculiar relación con las mitocondrias. El primero y los dos últimos pasos son mitocondriales, mientras que los pasos intermedios se producen en el citoplasma extramitocondrial. En consecuencia a medida que maduran y que sus mitocondrias degeneran, los eritrocitos pierden

capacidad para formar ALA y para convertir el coproporfirinógeno III en hem. Sin embargo, retienen la capacidad de convertir ALA en coproporfirinógeno.

#### 2.4.3 SINTESIS DE LA GLOBINA

Desde el punto de vista de la estructura proteica, hay varias hemoglobinas normales. La hemoglobina A ó hemoglobina del adulto representa de 96 a 98% de la hemoglobina total en los adultos. La mayor parte de la hemoglobina restante es una hemoglobina estructuralmente diferente, la hemoglobina A2. En la vida fetal y en el recién nacido, la hemoglobina predominante es la hemoglobina fetal o hemoglobina F (HbF). En el primer año de vida, la HbF es reemplazada gradualmente por las hemoglobinas A y A2, de manera que la primera representa menos del 1% de la hemoglobina de los adultos. Otras hemoglobinas normales (Gower I, II), se encuentran solamente en el embrión.

Todas las hemoglobinas normales contienen 2 pares de cadenas polipeptídicas, y a cada cadena se encuentra unido un grupo hem. En la HbA, las cadenas polipeptídicas de un par se denominan cadenas alfa ( $\alpha^1$ ), y las del otro par cadenas beta ( $\beta^1$ ). La HbF contiene un par de cadenas alfa idénticas a las que se encuentran en la hemoglobina A, pero las cadenas del segundo par son diferentes y se denominan gamma ( $\gamma^F$ ) por lo tanto, la HbF se denomina  $\alpha_2 \gamma_2^F$ . La HbA2 contiene un par de cadenas alfa y un par de cadenas delta  $\delta_2^A$  y se

denomina  $\alpha_2\beta_2$  . La Hb embrionaria, Gower II, tiene la estructura  $\alpha_2\beta_2$  . La HbA2 puede separarse de la HbA y F y cuantificarse por medio de una variedad de elementos electroforéticos ó cromatográficos. Muchos procedimientos electroforéticos de rutina no distinguen la HbF de la A, pero se puede realizar la separación a pH 6.0 en gel de agar. Más comúnmente, la HbF se detecta y cuantifica por su capacidad para resistir la desnaturalización en reactivos alcalinos ("prueba de la desnaturalización alcalina").

Las cadenas alfa, beta, gamma y delta difieren una de otra en su estructura proteica. Cuatro aspectos de esta estructura son:

- 1) Estructura primaria o secuencia de aminoácidos
- 2) Estructura secundaria que describe la organización de aminoácidos en helicoides estabilizados por uniones hidrógeno entre los grupos CO y NH de las espirales adyacentes.
- 3) Estructura terciaria, se refiere a la forma en la cuál las cadenas polipeptídicas se pliegan para formar una unidad esférica tridimensional, estabilizada por fuerzas hidrofóbicas de Van der Waals
- 4) Estructura cuaternaria, ó la manera en que varias cadenas polipeptídicas se unen para formar una sólo molécula.

Actualmente es posible expresar la estructura primaria exacta de las cuatro cadenas hemoglobínicas normales.

A pesar de las diferencias en la estructura primaria de las cadenas, sus estructuras secundarias son sorprendentemente similares. Hay 8 segmentos helicoidales en cada una y estos helicoides se designan con las letras A a H. Los helicoides tienen una longitud casi idéntica en las 4 cadenas normales, excepto para el helicoide D, que contiene 7 aminoácidos en las cadenas beta, gamma, y delta, pero solamente 2 aminoácidos en la cadena alfa. Los helicoides constituyen alrededor del 75% de la molécula.

Las estructuras terciaria y cuaternaria de la hemoglobina han sido estudiadas por medio de técnicas de difracción de rayos X. En soluciones acuosas y en cristales, las cadenas polipeptídicas adoptan una estructura en la cual los aminoácidos polares se presentan a la superficie molecular donde interactúan con agua, haciendo soluble la molécula. Los grupos dirigidos hacia el núcleo más central de la molécula son todos no polares, y la unión hidrofóbica (Van der Waals) que se produce entre ellos hace que la estructura sea estable. La estructura terciaria resultante, aproximadamente esférica, es similar para todos los polipéptidos de las hemoglobinas normales. El hierro del hem forma una unión covalente con la histidina en F8 (mencionada a veces como histidina "proximal"). El medio no polar del grupo hem hace posible que el hierro forme una unión reversible con el oxígeno, sin oxidarse a la forma férrica.

Cuando se combinan 4 cadenas polipeptídicas para producir la

molécula completa de hemoglobina, cada cadena se ubica aproximadamente en los vértices de un tetraedro regular.

Dentro de la célula precursora del eritrocito, el hem y la globina se forman en cantidades casi equivalentes. Si la biosíntesis del hem se encuentra restringida, por ejemplo, en el déficit del hierro, se produce una reducción comparable en la síntesis de la globina. En ausencia del hem, los poliribosomas se separan y cesa la síntesis de globina. La separación es reversible, y si se agrega hem, los ribosomas se transforman nuevamente en poliribosomas y comienza la síntesis de globina.

## 2.5 CONTROL DE LA ERITROPOYESIS.

Es evidente que hay un mecanismo bien balanceado que mantiene al eritrón dentro de límites normales y que media la respuesta a una variedad de situaciones normales y anormales. En términos generales, este sistema de control opera de la siguiente manera: las alteraciones en la concentración de hemoglobina en la sangre conducen a cambios en la tensión de oxígeno entre los tejidos dentro del riñón. En respuesta a la hipoxia, el riñón secreta un factor que interactúa con un sustrato plasmático para producir una hormona: la ERITROPOYETINA. Esta hormona induce a las células medulares primitivas a diferenciarse en pronormoblastos, lográndose una expansión de la médula eritroide y un aumento en la producción de eritrocitos. A su vez, esto conduce a un aumento en el tamaño

del eritrón y en los niveles del oxígeno en los tejidos.

La tensión de oxígeno de los tejidos depende de los índices relativos de aporte y demanda de oxígeno. El aporte de oxígeno es una función compleja de interactuantes variables, pero semiindependientes, que incluyen:

- 1) flujo sanguíneo
- 2) concentración de hemoglobina en la sangre
- 3) saturación hemoglobínica de oxígeno
- 4) afinidad de la hemoglobina con el oxígeno.

Cada una de estas funciones puede alterarse para compensar una deficiencia en una de las otras.

La hipoxia de los tejidos es el estímulo fundamental para la eritropoyesis. Sin embargo actualmente parece claro que no ejerce sus efectos por una acción directa sobre la médula, actúa induciendo la elaboración de una hormona, la eritropoyetina. Aún no se conoce la naturaleza de los receptores de oxígeno de los tejidos; sin embargo, estos receptores se encuentran probablemente ubicados dentro del riñón, ya que la producción de eritropoyetina puede inducirse por la constricción de la arteria renal ó por perfusión hipóxica del riñón aislado.

ERITROPOYETINA. (Factor estimulante de la eritropoyesis FEE).

En 1906, Carnot y Deflandre propusieron que la sangre circulante transporta una sustancia estimulante eritropoyética:

su trabajo fue ignorado por escasos datos experimentales para apoyar su teoría. El informe aparecido en 1950 sobre el desarrollo de una hiperplasia normoblástica de la médula ósea en los componentes de un par de ratas parabióticas, de las cuáles una sólo fué sometida a hipóxia, renovó el interés acerca de la posibilidad de que el estímulo hipóxico fuera mediado a través de un factor de tipo hormonal en la sangre.

Actualmente se acepta que estas observaciones pueden explicarse por los efectos de una hormona, la eritropoyetina, cuya producción se relaciona con la tensión de oxígeno de los tejidos.

La eritropoyetina es relativamente estable al calor y al almacenamiento. Es una glucoproteína que contiene ac. ciálico, hexosamina y hexosas, peso molecular de 45,800, migra como una alfa globulina durante la electroforesis.

La eritropoyetina se detecta y cuantifica usualmente por medio del bioensayo. Ensayos más sensibles y económicos emplean ratones ex-hipóxicos y policitémicos (eritropoyéticamente deprimidos) como animales de prueba y la incorporación de hierro en los eritrocitos circulantes como índice de actividad eritropoyética, esta se expresa en unidades, y una unidad se define como aquella cantidad de actividad en 1,48 mg de la primera preparación internacional de referencia (PIR) de eritropoyetina, denominada formalmente eritropoyetina estandar B o en 0.5 mg de la segunda PIR.

El principal sitio de producción de eritropoyetina es el riñón, existen tejidos no renales productores de eritropoyetina, Gordon y colaboradores propusieron que el riñón forma una enzima denominada eritrogenina (factor eritropoyético renal, FER) que es eritropoyéticamente inactiva por sí misma, pero que reacciona con un sustrato plasmático, eritropoyetinógeno, de origen hepático, para producir eritropoyetina activa.

Aún se discute la ubicación del mecanismo secretor de eritropoyetina dentro del parénquima renal.

En estudios que emplean la técnica de tinción fluorescente de anticuerpos, se encontró que la eritropoyetina estaba localizada en las células epiteliales del glomérulo, se sugirió que el lugar en el cuál la eritrogenina reacciona con su sustrato es el glomérulo.

A diferencia de la eritropoyetina, la eritrogenina se origina en forma difusa en el riñón.

El sitio primario de acción de la eritropoyetina, es una célula madre no identificada (la célula sensible a la eritropoyetina). Se cree que esta célula está destinada a la línea celular eritrocitaria y que se trata de un precursor del pronormoblasto.

Presumiblemente, un tipo de RNA con coeficiente de sedimentación de 9S producido al adicionar eritropoyetina a cultivos in vitro, es el mensajero para la síntesis de la

globina. Por lo tanto, la eritropoyetina activa genes de control y estructurales, esenciales para la síntesis de la hemoglobina, y al hacerlo logra que la célula sensible a la eritropoyetina adopte las características morfológicas del pronormoblasto. Además, hay pruebas de que la autoduplicación y la proliferación de las células sensibles a la eritropoyetina son estimuladas por la eritropoyetina. En última instancia, estos efectos conducen a la expansión del compartimiento medular de producción eritrocitaria (hiperplasia eritroide).

La eritropoyetina puede detectarse tanto en la orina como en el plasma.

La presencia de eritropoyetina en la orina y el plasma de personas normales constituye una prueba de que la hormona es necesaria para la eritropoyesis normal. Refuerzan esta afirmación las observaciones de que la administración de anticuerpos contra la eritropoyetina deprime la eritropoyesis normal y que la hipertransfusión de personas normales disminuye los niveles urinarios de eritropoyetina.

La regulación de la eritropoyesis por el sistema nervioso se preconiza desde hace tiempo, pero las pruebas presentadas son poco convincentes. Finalmente, se ha demostrado que la atropina impide la reticulocitosis de la estimulación hipotalámica como también la respuesta de la eritropoyetina a la hipoxia. Es posible que el hipotálamo perciba los niveles de oxígeno de los tejidos y estimule la eritropoyesis, ya sea a

traves de un mecanismo humoral neurohipofisario ó por vía del sistema nervioso simpático.

Otras sustancias eritropoyéticas, como los andrógenos, estimulan la producción de eritropoyetina, pueden potenciar la acción, tal vez aumentando el número de células madres sensibles a ésta. Hay estudios que sugieren que los andrógenos ejercen un efecto directo sobre la eritropoyesis sin la intermediación del sistema eritropoyetina.

Los estrógenos pueden ejercer un efecto inhibitor sobre la producción de glóbulos rojos, en la deficiencia de hormona tiroidea es probable que ejerza sus efectos sobre la eritropoyesis en forma indirecta, alterando la demanda de oxígeno de los tejidos. De la misma manera el cortisol y la hormona de crecimiento probablemente también afectan la eritropoyesis en forma secundaria por un mecanismo celular.

El lactógeno placentario y la prolactina, al parecer, estimulan directamente la eritropoyesis, pero debe encontrarse presente eritropoyetina para lograr un máximo efecto. Algunas hormonas vasoactivas estimulan la eritropoyesis, probablemente por disminución del flujo sanguíneo hacia el mecanismo renal de percepción de la hipoxia, induciendo por lo tanto la secreción de eritropoyetina.

Se demostró que la inyección de hemolizados, hemoglobina ó hemina estimulaba la eritropoyesis, y este fenómeno fué ofrecido

como una explicación del aumento de la eritropoyesis observado en pacientes con anemia hemolítica compensada y niveles normales de hemoglobina en sangre.

Como puede apreciarse durante el proceso de formación y desarrollo de esta línea celular se presentan diversidad de cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos, condicionados por mecanismos de regulación y con el único fin de generar a una de las células más eficientes de los organismos eucarióticos, el glóbulo rojo.

## CAPITULO III

### LINEA GRANULOCITICA

Las células medulares y sanguíneas se constituyen a partir de un compartimiento de células madres. La célula unitaria multipotencial formadora de colonias (UFC ó célula madre no comprometida) y las células madres intermedias ("comprometidas").

#### 3.1 SERIE MIELOIDE

Los granulocitos neutrófilos, eosinófilos y basófilos forman la serie mieloide. Se piensa que las tres líneas celulares siguen patrones similares de proliferación, diferenciación, maduración y almacenamiento en la médula ósea, y de liberación a la sangre. Estos procesos están mejor documentados para los neutrófilos y son escasos para los basófilos. Las tres primeras etapas morfológicas, el mieloblasto, el promielocito y el mielocito, tienen capacidad de división mitótica como lo demuestra su absorción de timidina marcada con tritio, y la presencia de mitosis; las últimas etapas no pueden dividirse, sino que sufren diferenciación y cambios de maduración. Los límites morfológicos de cada compartimiento celular se basaron en tamaño celular, relación del tamaño del núcleo con respecto al citoplasma, delicadeza de la cromatina nuclear, forma nuclear, presencia ó ausencia de nucleolos, presencia y tipo de gránulos citoplasmáticos, y el color del citoplasma de las células

teñidas.

Debido a que durante cada ciclo de autorreproducción celular se producen cambios en la cromatina nuclear y en el tamaño de la célula, y puesto que la formación de los gránulos y otros cambios citoplasmáticos se producen gradualmente durante las etapas de desarrollo celular, las definiciones morfológicas son necesariamente arbitrarias y no siempre se ajustan a cambios bioquímicos y fisiológicos significativos. A veces es difícil clasificar a una célula en una categoría ó en otra, ya que en realidad se trata de una transición entre ambas. Sin embargo, es útil separar las líneas celulares en compartimientos morfológicos y definir los límites normales de la distribución celular dentro de ellos, ya que los cambios importantes con respecto a estos patrones son indicadores de enfermedad.

MIELOBLASTO, este término describe una célula inmadura que se encuentra normalmente en la médula ósea y no en la sangre. Esta célula puede dividirse y formar promielocitos, los cuáles a su vez originan mielocitos. No se sabe si existen mieloblastos separados para las líneas celulares neutrófila, eosinófila y basófila.

El mieloblasto posee un núcleo relativamente grande, redondo ó ligeramente oval, y una pequeña cantidad de citoplasma. En preparados teñidos con colorante de Wright, la membrana nuclear es lisa, de contornos uniformes y extraordinariamente fina, sin

condensación de cromatina cerca de su superficie interior, como sucede en los linfoblastos. La cromatina muestra una distribución uniforme y difusa, sin acumulación en masas grandes, aunque puede haber cierta condensación alrededor de los nucleolos. La cromatina puede presentarse como cordones muy finos, dando así al núcleo un aspecto de tamiz; ó puede tener la forma de finos gránulos semejantes a polvo, lo que produce un efecto de punteado uniforme. Por lo general, hay de dos a cinco nucleolos, de color celeste pálido. El citoplasma es basófilo (azul) y generalmente, aunque no siempre, no presenta aparato de Golgi evidente. A veces el citoplasma es reticulado, esponjoso y espumoso.

Con el MICROSCOPIO ELECTRONICO se observa la membrana nuclear fina y vaga, con poca ó ninguna condensación cromatínica. Las numerosas partículas de ribonucleoproteína en el citoplasma producen una basofilia azul intenso en los preparados coloreados. Las mitocondrias son abundantes pero pequeñas, y el retículo endoplasmático es plano y aparece infrecuentemente. El aparato de Golgi está más definido y no hay gránulos citoplasmáticos.

La clasificación de las células mieloides, por medio del microscopio electrónico, que se basa principalmente en los estadios de formación de gránulos, también coloca a las células que muestran un comienzo de formación de gránulos en la categoría de promielocito.

En los extendidos húmedos, los mieloblastos aparecen

inmóviles, con bordes finos y rígidos. El citoplasma es difuso y usualmente no contiene ninguna sustancia que pueda colorearse, excepto mitocondrias, las cuáles están diseminadas en forma difusa por todo el citoplasma y se tiñen de un color azul verdoso brillante con el verde Jano. La falta de movilidad de los mieloblastos en las preparaciones supravitales se debe a la naturaleza de la preparación más que a una verdadera inmovilidad de las células. En estudios cinematográficos de preparaciones de gota pendiente, los mieloblastos manifiestan un característico movimiento tipo caracol.

Debido a que se encuentran en proceso de crecimiento y división, los mieloblastos varían considerablemente en tamaño, de 10 a 20 micras de diámetro.

### 3.2 DIFERENCIACION DE LOS MIELOBLASTOS DE LOS LINFOBLASTOS Y DE OTROS BLASTOS.

Es extremadamente difícil, por lo menos con los métodos que se conocen actualmente, distinguir a los leucoblastos (mieloblastos, linfoblasto, monoblastos) y aún los pronormoblastos, si se excluye de la categoría de blastos a las células que muestran cambios que denotan el comienzo de la maduración (formación de gránulos ó síntesis de hemoglobina). En el linfoblasto, la membrana nuclear es más densa que la del mieloblasto y la cromatina es más densa y puede demostrar cierta formación de agregados. En los linfoblastos hay por lo común

uno ó dos nucleolos y su membrana es usualmente bien definida. Las mitocondrias son cortas y más abultadas que las de los mieloblastos y con frecuencia adoptan una posición cerca del núcleo. El "monoblasto" tiene características similares a las del monocito maduro tales como una cromatina muy fina, núcleo pálido y un citoplasma que semeja vidrio esmerilado, con un borde fino e irregular. En muchos casos la identificación de las células "blasto" no es difícil por la gran ayuda que significa la presencia de las células maduras más fácilmente reconocibles que las rodean. En el caso del mieloblasto, la demostración de promielocitos asociados que muestran granulaciones azurófilas con el colorante de Wright ó con colorantes similares, o una reacción positiva a la coloración de la peroxidasa, constituye una evidencia presuntiva muy sólida para su identificación.

MIELOCITOS Y PROMIELOCITOS, las diferentes etapas más allá del mieloblasto han sido diferenciadas primariamente sobre la base del número y tipo de gránulos presentes.

Los llamados gránulos primarios ("no específicos, azurófilos") aparecen por primera vez en la etapa de promielocito y pueden identificarse en el estudio estructural fino como característicos de las series neutrófila, eosinófila ó basófila. No se transforman en gránulos "específicos" sino que persisten durante la secuencia de maduración y se les observa en todas las etapas subsecuentes, incluyendo las formas polimorfonucleares.

El promielocito posee un núcleo redondo ú oval en el cuál la

cromatina se distribuye difusamente, como en el mieloblasto; en etapas posteriores, se puede observar una ligera condensación cromatínica alrededor de la membrana nuclear. Presenta nucleolos, pero a medida que la célula se desarrolla, se tornan menos notables.

Con el MICROSCOPIO ELECTRONICO, la principal diferencia con el mieloblasto, se encuentra en el citoplasma, donde el retículo endoplásmico es más prominente y adopta un aspecto dilatado y vesicular. Aparecen los gránulos primarios, azurófilos, y se acumulan en número creciente durante esta etapa, pero aún no se encuentran presentes los gránulos secundarios o específicos.

En los promielocitos precoces, los pocos gránulos presentes pueden verse difícilmente por medio del microscopio común, debido a que están a menudo sobre el núcleo y sólo son evidentes con el exámen a varios planos focales.

Como el mieloblasto, el promielocito es inmóvil en los preparados planos de portaobjeto y cubreobjeto, y sólo en la última etapa se observa un ligero movimiento. Aún entonces falta la gran cantidad de gránulos tan característica de los granulocitos maduros. En las preparaciones de gota pendiente, los promielocitos son activamente móviles.

El MIELOCITO NEUTROFILO puede definirse como la etapa en la cuál aparecen en el citoplasma gránulos específicos (secundarios) y por tanto la célula puede identificarse como perteneciente a la

serie neutrófila cuando se colorea y se observa con el microscópio común. El núcleo del mielocito neutrófilo es excéntrico, redondo ú oval, y un lado puede aparecer algo aplanado. La cromatina nuclear es un poco gruesa, y los nucleólos son pequeños frecuentemente invisibles (se ven claramente con el microscópio electrónico). Los gránulos primarios persisten en los mielocitos, pero la formación de nuevos gránulos primarios se detiene bruscamente, y cada división celular subsecuente conduce a una disminución de su número en la población hija. Los gránulos secundarios de la serie neutrófila son más pequeños que los gránulos primarios. La cantidad de retículo endoplásmico granular se encuentra reducida en el mielocito, la basofilia citoplasmática disminuye y desaparece. Las mitocondrias permanecen pequeñas y relativamente escasas.

Los gránulos primarios maduros de los neutrófilos son lisosomas que limitan con la membrana y que contienen varias enzimas y otras sustancias como la fosfatasa ácida, peroxidasa, esterasa, betaglucuronidasa, betagalactosidasa, aril-sulfatasa, 5'nucleosidasa, N-acetil-beta-glucosa-minidasa, alfa-manosidasa, mucosustancia sulfatada, lisozima y otras proteínas básicas.

Aproximadamente un tercio de la lisozima de los neutrófilos, al parecer, esta presente en los gránulos primarios de neutrófilos y también se han localizado otras proteínas básicas bactericidas. La fosfatasa alcalina está ausente de los gránulos primarios.

Los gránulos secundarios de los neutrófilos se caracterizan por su contenido de fosfatasa alcalina y su carencia de fosfatasa ácida; carecen ó contienen muy poco de peroxidasa y mucosacarido sulfatado. Además contienen aminopeptidasa, lisozima, colagenasa y proteínas basicas.

METAMIELOCITOS, se caracteriza por un núcleo claramente indentado ó de forma de herradura sin nucleolo, y la cromatina nuclear es moderadamente densa con considerable acumulacion evidente a lo largo de la membrana nuclear. El citoplasma se encuentra lleno de gránulos primarios y secundarios, pero predominan los secundarios. El retículo endoplasmático es escaso así cómo también los polisomas, lo cuál significa la virtual finalización de la síntesis de proteínas.

El límite entre los compartimientos mielocítico y metamielocítico se define mejor fisiológicamente por el hecho de que los mielocitos sintetizan DNA, absorben timidina tritiada dentro de su cromatina nuclear, se dividen y se encuentran activamente implicados en la síntesis de proteína, como lo demuestra la presencia de numerosos nucleolos, de abundante retículo endoplasmático y de polisomas. Se debe prestar particular atención a la evidencia en el núcleo y en el citoplasma de que ha disminuido ó ha cesado la síntesis de proteína. Esto se juzga por el hecho de que la cromatina nuclear es gruesa y aglomerada y por el rosa tenue del

citoplasma, el cual en los preparados coloreados tiene esencialmente el color de la célula madura. Estas características son útiles para diferenciar los metamielocitos de los monocitos, ya que en estos últimos la cromatina nuclear permanece fina más reticular y persiste la evidencia de síntesis de proteína. En los metamielocitos se visualiza un movimiento ameboide, aún en preparados de portaobjeto y cubreobjeto.

FORMAS JUVENILES O EN CAYADO, esta etapa se caracteriza por una mayor condensación de la cromatina nuclear y la transformación de las formas nucleares en configuraciones en "salchicha" ó cayado, las cuáles poseen diámetros aproximadamente uniformes en toda su longitud. Comienzan a desarrollarse una ó más constricciones, que progresan hasta que el núcleo se divide en dos ó más lóbulos conectados por cordones filamentosos de hétérocromatina en la etapa polimorfonuclear. No hay una diferencia clara entre los estadios en cayado y segmentado. Se ha elegido como pauta para la inclusión en la categoría polimorfonuclear la separación clara de los lóbulos nucleares. Las células que carecen de esta formación completa de lóbulos evidentes, se clasifican como formas en cayado.

NEUTRÓFILOS POLIMORFONUCLEARES, en esta etapa de maduración completa las células tienen un tamaño y un contenido en gránulos esencialmente uniformes. Con el colorante de Wright, se observa que el núcleo obtiene un color purpúreo muy intenso y contiene cromatina gruesa y condensada. Los lóbulos están unidos por

filamentos delgados de cromatina, aunque éstos pueden no ser fácilmente visibles si los lóbulos se encuentran superpuestos unos con otros. El citoplasma es rosa claro y contiene gránulos específicos finos. Los gránulos primarios azurófilos han perdido generalmente en esta etapa sus características de coloración oscura, pero se pueden observar con el microscopio electrónico, mediante éste se ve que los gránulos muestran un considerable cambio de densidad, presumiblemente un reflejo de la variación en el contenido enzimático, y mantienen una distancia mínima de 100 nm desde la membrana celular. Las grandes masas de glucógeno se tornan evidentes por primera vez; esto puede reflejar su propensión al metabolismo anaerobio. No se conoce el propósito de la lobulación nuclear; tal vez acrecenta la deformabilidad de la célula y el movimiento a través de las paredes de los vasos y hacia sitios de inflamación ó bien es el resultado del vaciamiento nucleolar y no posee ninguna función.

En extendidos húmedos, los neutrófilos polimorfonucleares se caracterizan por presentar una actividad ameboide acentuada, a temperatura fisiológica. Primero, se extienden largos pseudópodos de ectoplasma libre de gránulos, donde luego penetra el endoplasma con sus gránulos en movimientos vibratorios activos. El núcleo sigue pasivamente al resto del citoplasma y puede alargarse o comprimirse adquiriendo formas caprichosas. Con frecuencia, a medida que la célula avanza, queda detrás de

Ésta un largo filamento de citoplasma que permanece estirado. Por último, este filamento es traccionado, aunque en ocasiones puede desprenderse. La velocidad de movimiento de los neutrófilos ha sido estimada en 30 micras por minuto. En los extendidos con tinción supravital, los gránulos (específicos) aparecen de color rosa amarillento y son refringentes; además pueden observarse vacuolas ocasionales más grandes, no refringentes de color rojo intenso.

La principal función de los granulocitos neutrófilos es la de impedir ó retrasar la entrada de agentes infecciosos ó de otro material extraño en el medio ambiente del huesped. Esta función se cumple mediante la fagocitosis y digestión de ese material. Los neutrófilos liberan además varias sustancias, y podrían, por consiguiente, tener también funciones secretorias.

### 3.3 COMPARTIMIENTOS MITOTICO Y DE MADURACION.

La producción de neutrófilos en el hombre adulto normal, se realiza sólo en la médula ósea. El ciclo vital del neutrófilo puede dividirse convenientemente en fases de médula ósea, sangre y tejidos.

El mieloblasto, el promielocito y el mielocito pueden someterse a división celular, a juzgar por la observación directa en cultivos por su capacidad para incorporar timidina tritiada en su DNA nuclear. Estas formas constituyen por lo tanto, el compartimiento mitótico. Se diferencian simultaneamente, teniendo en cuenta la aparición de gránulos azurófilos y

específicos en su citoplasma. Las formas más maduras de la serie neutrófila (metamielocito, en cayado, y neutrofilo polimorfonuclear) son consideradas como incapaces de división celular (excepto tal vez en circunstancias infrecuentes) y no incorporan timidina tritiada a sus núcleos, pero muestran continuos cambios de maduración. Desde éste las células fluyen hacia la sangre, donde se distribuyen en 2 sitios:

- 1) el pool de granulocitos circulantes en sangre (PGC)
- 2) el pool granulocítico marginal (PGM) donde se adhieren a las paredes de las vénulas poscapilares.

Las células que se encuentran en estos dos sitios están en continuo equilibrio. En ocasiones, las células se mueven a través de las paredes del vaso para entrar en los tejidos.

En este esquema la producción celular puede estimarse, ya sea evaluando el índice de producción ("nacimiento") en el compartimiento mitótico ó midiendo el flujo celular a través de estadios subsecuentes tales como la sangre.

#### 3.4 TIEMPO DE TRANSITO A TRAVES DEL "POOL" DE MADURACION NO DIVISIBLE.

Siguiendo un pulso marcador de timidina tritiada ó de radio fosfato, hay un retardo de varios días antes que los neutrófilos segmentados marcados aparezcan en la sangre. Esto representa el tiempo mínimo desde la síntesis de DNA en el último ciclo generativo mielocítico hasta que la célula ha madurado a

neutrófilo segmentado y es liberada hacia la sangre. Este tiempo mínimo de tránsito ó tiempo de "aparición" fué de 96 a 144 horas.

### 3.5 MECANISMOS DE CONTROL QUE REGULAN LA GRANULOCITOPYESIS

El intercambio celular entre los lotes marginales y circulante puede ocurrir sin que existan alteraciones en el recambio de neutrófilos sanguíneos; pero cualquier variación en el tamaño del pool granulocitario total (PGT) debe resultar de cambios entre el ingreso y/o egreso celular. Los estudios basados en la técnica de leucoferesis, demostraron que el animal normal restituye el PGT, después de su depleción, movilizandó células de las reservas granulocíticas de la médula ósea.

Este aumento de la concentración de neutrófilos y del tamaño del PGT -de la misma manera que se aumenta y desarrolla en la mayoría de las infecciones bacterianas ó luego de la administración de endotoxina ó de esteroides- debe desencadenarse por una señal y debe haber, así mismo, alguna forma de estimulación de la producción celular, para restituir las reservas medulares deplecionadas.

Se han propuesto mecanismos neurales de control de la proliferación y liberación celular hematopoyética y existencia de sustancias reguladoras de los neutrófilos de naturaleza humoral.

El FPG (factor promotor de la granulocitosis) puede ser una sustancia granulocitopoyética que se produce naturalmente. Se

trata de una micromolécula ( peso molecular < 2000 ) libre de proteína.

La inyección de endotoxina a animales produce neutrofilia, por lo común precedida de neutropenia. Los estudios realizados en médula ósea para investigar este efecto (liberación de neutrófilos estimulada por endotoxina), demostraron cambios en las células adventiciales de las paredes sinusoidales y del intersticio medular. Sin embargo, no puede distinguirse la causa del efecto.

Se ha estudiado extensivamente la estimulación de formación de colonias granulocíticas en cultivos de placas de agar. Esta actividad estimulante de colonias (AEC) se ha encontrado en el suero y en la orina de pacientes con leucemia aguda ó crónica ó mononucleosis infecciosa, y en baja concentración en personas normales.

Los neutrófilos polimorfonucleares humanos, secretan AEC y producen un mejor estímulo que la AEC urinaria para el crecimiento de colonias medulares.

Otros estudios demostraron que los macrófagos o los monocitos liberan AEC, mientras que los neutrófilos son inhibidores. Se piensa que la AEC actúa sobre las células madres más que sobre las primitivas UFC ó sobre formas posteriores.

Se ha descrito otro factor estimulante de la

granulocitopoyesis. Este factor es activo in vivo, difunde en camaras "millipore" para estimular la proliferación mieloidea de blastos y promielocitos y se halla presente sólo en las fases de neutropenia y de recuperación que siguen a la exposición a los rayos X ó a la inyección de vinblastina.

EOSINOFILOS, muestran los mismos fenómenos de maduración que los neutrófilos, excepto que probablemente se forma sólo un tipo de gránulo. Tienen una cromatina nuclear fina y nucleolos bien desarrollados, contienen grandes mitocondrias, retículo endoplásmico dilatado y unos pocos gránulos grandes, densos y homogéneos que al parecer se forman a lo largo de todas las etapas subsecuentes de maduración. La condensación de la cromatina nuclear, la disminución en el tamaño y la desaparición en última instancia de los nucleolos y la reducción en el tamaño del aparato de Golgi se producen en forma paralela a los cambios observados durante la maduración neutrófila. Es poco frecuente encontrar más de dos lóbulos en los eosinófilos maduros y los lóbulos son más grandes que los observados en los neutrófilos. Los gránulos eosinófilos son considerablemente más grandes que los gránulos neutrófilos, aparecen en cierta forma refringentes vistos con el microscopio común y se tiñen de rojo amarillento intenso con el colorante de Wright. Tienen una movilidad menos activa que los neutrófilos.

Citoquímicamente los gránulos eosinófilos están compuestos

por una proteína básica que contiene zinc y peroxidasa, carecen de fosfatasa alcalina, lisozima y proteínas bactericidas, además, se han identificado en los gránulos mucosustancia PAS reactiva, fosfatasa ácida, ribonucleasa, beta-glucuronidasa, catepsina, arilsulfatasa, desoxirribonucleasa, nucleotidasa, lipasa y plasminógeno. De los granulocitos maduros, los eosinófilos muestran la coloración más intensa con la peroxidasa, al parecer esto se debe a su contenido en proteínas básicas.

El aspecto morfológico característico de los eosinófilos y el hecho de que estas células tengan tendencia a aparecer en sitios en donde se encuentran proteínas extrañas y acumulación de parásitos, y en asociación con reacciones alérgicas, ha dado como resultado una literatura copiosa. Sin embargo el conocimiento de su producción, cinética, y función, es limitado. Este hecho se debe en parte, a que los eosinófilos constituyen una pequeña proporción de los leucocitos medulares y sanguíneos del hombre normal y de los animales, por lo que es difícil llevar a cabo estudios cuantitativos.

La producción de eosinófilos, así como la de neutrófilos, se efectúa solamente en la médula ósea del hombre normal. Los promielocitos y mielocitos eosinófilos de la médula ósea son capaces de sufrir mitosis; los metamielocitos y otras formas más maduras, se mantienen, por lo común, en estadios posmitóticos en vías de maduración.

El flujo celular a través del sistema, al parecer, sigue un

patrón lineal, como en el caso de los neutrófilos; existe, por otra parte, una reserva de células maduras importantes, que puede movilizarse de acuerdo con la demanda.

La maduración y el tiempo de aparición de los eosinófilos es más corto que el de los neutrófilos; el tiempo de síntesis de DNA es similar. Los estudios cinéticos efectuados en pacientes con eosinofilia sugieren un patrón similar al de los neutrófilos, con un tiempo de aparición de 3 a 4 días y un tiempo medio de tránsito de 9 días.

No se conoce mejor el destino de los eosinófilos que el de los neutrófilos. Pueden encontrarse eosinófilos en la saliva humana.

Los esteroides adrenales y la ACTH producen eosinopenia en el hombre y suprimen la eosinofilia inducida por proteínas en los animales. Los medios por los cuáles se producen estos hechos son inciertos.

Si las infecciones bacterianas y algunos procesos inflamatorios producen neutrofilia y, comunmente eosinopenia, mientras que las reacciones antígeno-anticuerpo y ciertas proteínas extrañas producen eosinofilia, se sugiere la existencia de mecanismos de control separados para ambos sistemas celulares. Este concepto es avalado por los informes sobre un factor liberador de eosinófilos y un factor difusible capaz de estimular la producción de eosinófilos por blastos y promielocitos en

cámaras "millipore" implantadas en la cavidad peritoneal del ratón.

**BASÓFILOS Y CELULAS "CEBADAS"**, Los basófilos se distinguen por sus gránulos grandes, gruesos, de color negro purpúreo que usualmente llenan el citoplasma y a menudo oscurecen el núcleo. Los gránulos son hidrosolubles y, por lo tanto, pueden disolverse en el proceso de coloración y lavado; las células pueden aparecer entonces como vacuolas, restando sólo unos pocos ó ningún gránulo basófilo.

Con el microscopio electrónico, en los basófilos segmentados, las mitocondrias son grandes y numerosas como en el eosinófilo. En contraste con los neutrófilos, el glucógeno es mucho menos abundante. Los basófilos presentan una movilidad lenta, el núcleo avanza en lugar del citoplasma, como sucede en el neutrófilo y en el eosinófilo. Los gránulos contienen grandes cantidades de heparina e histamina (mucosustancia ácida sulfatada) y es probable que sea la causa de la afinidad de los gránulos por los colorantes básicos.

En los tejidos se hallan células similares aunque un poco más grandes, denominadas células cebadas. Aunque estas células se asemejan a los basófilos en su metacromasia, naturaleza ácida y contenido en histamina y heparina, contienen enzimas hidrolíticas y 5-hidroxitriptamina que no se encuentran presentes en los basófilos. También la ultraestructura de sus gránulos es

diferente. Las células cebadas, descargan sus gránulos fuera de la célula (exoplasmosis), mientras que los basófilos sufren usualmente una desgranulación interna difusa después de la fagocitosis, aunque también pueden mostrar exoplasmosis.

Se sabe muy poco acerca de la fisiología, la cinética y las funciones de los basófilos, los leucocitos sanguíneos menos numerosos del hombre. El basófilo es, por lo común mas pequeño y menos granular que el mastocito y tiene un núcleo bilobulado o triobulado.

Los basófilos, en forma similar a los neutrófilos y eosinófilos se producen en la médula ósea. Cuando se administró timidina trititada a seres humanos, los índices de marcación iniciales de los mielocitos eosinófilos y basófilos de la médula ósea, fueron semejantes a los de los mielocitos neutrófilos. La cinética de los eosinófilos y basófilos en la médula ósea fué similar en ambos, así como a la del sistema neutrófilo; hubo un período de retardo de 3 horas entre la inyección de timidina trititada y la aparición de marcación en los metamielocitos; un período de 1 día hasta la marcación de las formas en cayado y un período de 1 día y medio hasta la marcación de los basófilos segmentados de la médula ósea. El "tiempo de aparición" desde la inyección de timidina trititada hasta la aparición de basófilos marcados en sangre periférica fué de dos días y medio; el pico máximo de basófilos marcados

porcentuales (alrededor de 23%) se alcanzó al séptimo día.

Debido a la escasez de basófilos en la sangre, no han podido realizarse estudios sobre el tamaño del pool, distribución celular ó tiempo medio de desaparición.

Los basófilos de la sangre pueden moverse lentamente, migran hacia la piel ó el peritoneo después de la inyección de proteínas extrañas y se acumulan en parchos cutáneos en individuos sensibilizados. Aunque tienen capacidad fagocitaria, no parece que ésta sea su función principal. Los basófilos y mastocitos liberan su contenido granular fuera de la célula (exocitosis) después de la exposición a una serie de estímulos tales como la irritación mecánica y, en individuos sensibilizados al antígeno ó al frío. Por lo tanto, tienen una importante función secretora.

Contienen histidina decarboxilasa y pueden por lo tanto sintetizar la histamina (ubicada en los gránulos).

Además de estar involucrados en las reacciones de hipersensibilidad, los basófilos, al parecer, liberan heparina durante la lipemia posprandrial y se informó acerca de una correlación entre la concentración sanguínea de basófilos y el nivel de triglicéridos plasmáticos. Se cree que los basófilos facilitan el metabolismo de los triglicéridos por liberación de heparina, la que a su vez activa a la lipasa de lipoproteína.

## CAPITULO IV

### SERIE MONOCITICA.

El MONOCITO es un leucocito fagocitario, proviene de una célula madre específica, el MONOBLASTO. Es una célula carente de movilidad, con un diámetro de aproximadamente 14 micras ó más, caracterizada por un citoplasma moderadamente basófilo ó grisáceo, un núcleo grande con poca indentación, cromatina fina y filamentososa y uno ó dos nucleolos grandes. En las células tratadas con coloración supravital, aparecen numerosas mitocondrias finas, esféricas ó delgadas, con forma parecida a un bastón.

Con el microscópio electrónico pueden observarse en el citoplasma ribosomas agregados y bandas diseminadas de retículo endoplasmático, pero el aparato de Golgi es pequeño. La diferenciación entre el monoblasto y el mieloblasto es muy difícil aún con la utilización del microscópio electrónico, pero se toma como criterio el tipo de cromatina plegada para el monoblasto y fina para el mieloblasto.

PROMONOCITO, o monocito joven, tiene un diámetro de hasta 20 micras y posee un núcleo grande y moderadamente indentado. La célula es móvil y fagocitaria, pero menos que el monocito maduro. El citoplasma muestra considerable basofilia. Con el microscópio común no se observan gránulos azurófilos, pero pueden

distinguirse unos pocos y finos cuerpos rojos neutros. El borde citoplasmático muestra a menudo extensiones disparejas o pseudópodos arrugados. Con el microscópio electrónico son evidentes el retículo endoplásmico y ribosomas, y el aparato de Golgi se encuentra bien desarrollado, con comienzo de formación de gránulos en el citoplasma.

Los estudios efectuados en la médula ósea, revelaron la presencia de un grupo de formas celulares de apariencia más joven y de tamaño mayor que los monocitos, con un citoplasma muy basófilo que se marcan después de la incubación con timidina tritiada en comparación con monocitos medulares típicos que no se marcan. Estas formas jóvenes, los promonocitos, se distinguen de los monocitos y macrófagos por que en su mayoría tienen un contenido hiperdiploide de DNA y por sus características morfológicas y tintoriales.

Constituyen un 2.9% de los fagocitos mononucleares de las células de la médula.

En el hombre normal, sólo el 12% de los promonocitos medulares se marcó después de una incubación in vitro con timidina tritiada. Los estudios in vitro con marcación doble (timidina tritiada y timidina marcada con carbono 14), así como las inyecciones seriadas de timidina tritiada, muestran un tiempo mínimo de síntesis de DNA de alrededor de 10 horas, con un tiempo de generación, para los promonocitos, de aproximadamente 29 horas. Por estudios efectuados en monocitos sanguíneos marcados

después de la inyección intravenosa de diisopropilfluorofostato (DFP) tritiado, se estimó el tiempo de pasaje del "pool" de proliferación medular en 55 horas. Esta cifra es casi el doble del tiempo de generación de los monocitos y sugiere la existencia de 2 generaciones de promonocitos encadenados en el hombre. Después de la inyección de timidina tritiada los monocitos marcados aparecen en sangre periférica a las 5-7 horas quedando demostrada así la ausencia de un compartimiento de depósito importante.

Se han identificado los precursores de los monoblastos y promonocitos; la posibilidad que tienen las colonias granulocíticas desarrolladas en agar ó en bazo, de transformarse en colonias de macrófagos, esto sugiere un origen común para ambas series.

Se estima que en el hombre normal, el "pool" medular de promonocitos es de alrededor de 600 millones de promonocitos por kilogramo de peso corporal. A partir de este dato, del índice de marcación y del tiempo de síntesis del DNA, se calcula la cifra de producción normal de monocitos, que es de 7.0 millones de monocitos/kg por día.

MONOCITOS, el monocito maduro se distingue fácilmente de las otras células de la sangre en los frotis bien teñidos. Es usualmente más grande que los otros leucocitos (17 a 20 micras) y posee un núcleo grande, arriñonado. La cromatina nuclear es

delicada y la membrana delgada. El núcleo está, por lo común, ubicado en el centro. El citoplasma es abundante, de color grisáceo ó azul sucio (coloración de Wright), y lleno de innumerables vacuolas finas de color lila o azul rojizo. Si el preparado no está coloreado en exceso, los gránulos asemejan un polvo fino, ó proporcionan al citoplasma azulado un aspecto de vidrio esmerilado; si la coloración es muy intensa, los gránulos aparecen mas prominentes y la célula puede confundirse con un metamielocito ó aun con una forma en cayado del neutrófilo. La cromatina muy delicada y reticular así como el color azulado del citoplasma en el monocito son sumamente útiles para la diferenciación. Los gránulos en los monocitos se colorean por el método de la peroxidasa, pero son menos y más finos que los que se encuentran en los granulocitos.

La cinética de monocitos se ha evaluado marcando sangre autóloga con DFP tritiado, reinyectando las células marcadas y midiendo la proporción de células marcadas presentes en etapas tardías, por medio de técnicas autoradiográficas. Se encontró que el pool monocítico marginal es aproximadamente 3.5 veces mayor que el pool circulante.

Probablemente existen sustancias monocitopoyéticas, pero la información al respecto es aun muy escasa. En el suero de ratas, después de la inyección del coadyuvante de Freund en los ganglios linfáticos, se encontró una "hormona monocitogénica". Esta actividad produce una monocitosis sanguínea acentuada y se

piensa que aumenta la proliferación del precursor monocítico.

CELULAS EPITELIOIDES Y CELULAS GIGANTES, los monocitos a nivel tisular se transforman en macrófagos, los cuales a su vez pueden desarrollar las características de células epitelioides, y entonces pueden, finalmente, fusionarse para formar células gigantes multinucleadas. La célula epitelioides es más grande que el monocito y posee un núcleo indentado u oval con cromatina densa. El citoplasma es abundante y contiene una gran cantidad de vacuolas, unas pocas mitocondrias y filamentos citoplasmáticos. La célula es altamente fagocitaria y es evidente una intensa síntesis de proteínas. En las células gigantes se observan múltiples regiones de Golgi, las mitocondrias se tornan prominentes y los filamentos citoplasmáticos son muy numerosos, mientras que los lisosomas disminuyen su número o están ausentes, tal vez como resultado del cambio en la función, de una fagocitosis y remoción de partículas a una de transporte activo.

La médula ósea es la fuente de monocitos y macrófagos. La transfusión de células medulares singénicas marcadas con timidina tritiada en ratas irradiadas confirmó estos hallazgos; estudios similares demostraron que los linfocitos del conducto torácico a las suspensiones celulares de los ganglios linfáticos o del timo no actúan como fuente de precursores de macrófagos; las células esplénicas podrían hacerlo, pero no son una fuente importante.

Después de 24 horas de incubación con timidina tritiada, un tercio de los fagocitos mononucleares medulares se marcó, en comparación con un 2.2% de macrófagos peritoneales y ningún monocito sanguíneo. Estos hallazgos sugieren que la médula ósea contiene una población proliferante que provee de monocitos a la sangre, los que a su vez penetran en los tejidos y se transforman en macrófagos.

## CAPÍTULO V

### SERIE LINFOCITICA

Las células madres indiferenciadas pluripotenciales de distintas fuentes (área vascular del saco vitelino, médula ósea fetal ó hígado fetal) son capaces de desarrollarse siguiendo diferentes líneas, según el epitelio especializado con el que tomen contacto. Se supone que los componentes epiteliales del timo y de la bolsa (o sus equivalentes) proporcionan un micromedio apropiado para esa diferenciación. Esos tejidos asociados al intestino, el timo y la bolsa, así como la médula ósea, se denominan órganos linfoides "centrales" ó "primarios". Las células madres linfoides al entrar en contacto con el epitelio tímico, son inducidas a diferenciarse en linfocitos pequeños, capaces de mediar respuestas celulares; mientras que las células precursoras linfoides, bajo la influencia de la bolsa ó su equivalente en los mamíferos, pueden diferenciarse, eventualmente, en células plasmáticas productoras de anticuerpos.

Los tejidos linfoides centrales sirven para poblar y mantener áreas representativas bien definidas en los tejidos linfoides "periféricos" ó "secundarios" como los ganglios linfáticos y el bazo; se considera que el timo puebla y mantiene las áreas paracorticales de los ganglios linfáticos y la pulpa blanca del bazo, regiones que contribuyen a la función de inmunidad celular, incluyendo las reacciones de hipersensibilidad

retardada, rechazo de homoinjertos, reacción injerto contra huesped y funciones de colaboración en algunos tipos de respuestas por anticuerpos. Se supone que la bolsa (ó las placas de Peyer) es responsable de la población y mantenimiento de los folículos linfáticos de los ganglios linfáticos y del bazo, así cómo de los cordones medulares de los ganglios linfáticos, elementos relacionados con la producción de anticuerpos. Además de proporcionar células precursoras linfoides, los órganos linfoides centrales producen sustancias humorales que promueven la maduración de las células inmunocompetentes. La unión decisiva entre las áreas central y periférica, por un lado, y sus respectivas funciones, por el otro, han sido demostradas por experimentos con extirpaciones, por estudios realizados en estados de deficiencia inmunológica en el hombre y por la inmunización de animales con técnicas que estimulan la producción de anticuerpos ó la inmunidad celular, hechos que se acompañan de cambios morfológicos en las áreas correspondientes dependientes del timo ó de la bolsa.

Los linfocitos diferenciados destinados a la producción de anticuerpos se denominan células B (células bolsa-dependientes ó médula ósea-dependientes) mientras que los involucrados en las funciones de inmunidad celular se denominan células T (células timo-dependientes).

Cada día muere ó se pierde un número significativo de

linfocitos por lo que existen compartimientos de células madres hematopoyéticas de diversos niveles de diferenciación. Los linfocitos descienden en definitiva de las células madres primitivas pluripotenciales del área vascular del saco vitelino. Estas células son capaces de diferenciarse en células madres con capacidad más restringida, como las que mantienen al sistema linfoide y las que originan otras células hematopoyéticas.

Los linfocitos constituyen por sí mismos un compartimiento de células madres altamente diferenciado debido a que son capaces de sufrir transformación blástica, división celular y eventualmente, reversión a linfocitos pequeños.

Es probable que en circunstancias normales las células madres unipotenciales más maduras mantengan a los compartimientos linfoide, eritrocítico y otros. Si uno de estos compartimientos de células madres maduras se lesiona o si hay una demanda excesiva de células, se requiere cada vez más la presencia de progenitores primitivos en los compartimientos más diferenciados. En el adulto, las células madres pluripotenciales hematopoyéticas, capaces de desarrollo linfoide y no linfoide, así como las células madres más altamente diferenciadas, se encuentran en la médula ósea y en menor grado en la sangre. Se ubican también en la médula ósea e hígado fetales, pero no en otros tejidos linfoides.

Los tejidos linfoides en conjunto constituyen un sistema orgánico importante, pero no se han efectuado mediciones precisas

del número total de linfocitos en el cuerpo humano.

Los linfocitos pequeños de la médula ósea muestran el promedio de recambio más rápido; prácticamente el 100 % de estas células se marca después de 4 días y su tiempo medio de renovación es de 4 horas. El timo ocupa el segundo lugar con un tiempo medio de renovación de 36 horas, seguido por el bazo, los ganglios linfáticos mesentéricos y finalmente la linfa del conducto torácico.

#### 5.1 LINFOPOYESIS

La médula ósea es un sitio importante de linfopoyesis. Es similar a la de los órganos linfoides primarios como el timo y la bolsa de las aves: la velocidad de turnover es alta e independiente de los cambios que se producen en el sistema linfoide periférico, tales como la depleción de linfocitos recirculantes y la irradiación continúa del bazo.

No se conocen el destino y función de la mayoría de los linfocitos medulares.

1) Algunas células derivadas de la médula ósea son capaces de actuar como células madres pluripotenciales; sin embargo a pesar de que se ha sugerido que estas células tienen las características morfológicas de los linfocitos, este hecho no ha sido comprobado.

2) Otras actúan como células madres linfoides migrando al timo, y a la bolsa, (ó placas de Peyer en los mamíferos), donde

se encargan de un tipo particular de función inmunológica.

3) Algunas migran hacia las estructuras linfoides periféricas y sirven de fuente de formación de células productoras de anticuerpos (células B).

4) La gran mayoría de los linfocitos medulares, no tienen una función claramente reconocida y se utilizan al azar. El alto promedio de reutilización de timidina dentro del pool medular de linfocitos, sugiere que muchas, si no la mayoría, de estas células se desintegra in situ, proveyendo así a la próxima generación de linfocitos, de elementos de fabricación para la síntesis de DNA.

TIMO, los elementos epiteliales del timo derivan de la región ventral de la tercera y cuarta bolsa faríngea. La mayoría de los investigadores opinan que los linfocitos tímicos son la progenie de células inmigrantes, seguramente derivadas de tejidos hematopoyéticos tales como la médula ósea ó el hígado fetal. Este secuestro por el timo de células precursoras linfoides circulantes se comprobó en experimentos con injertos de timo, quimeras por radiación y parabiontes, utilizando células portadoras de marcadores cromosómicos ó marcadores radiactivos. Las células de los ganglios linfáticos y del conducto torácico, normalmente no migran hacia el timo.

Como la médula ósea, la cortical del timo tiene un alto porcentaje de producción linfocitaria. Los índices mitóticos son alrededor de diez veces más altos que los de los ganglios

linfáticos subcutáneos y 5 veces más altos que los de los ganglios linfáticos mesentéricos y que los de las placas de Peyer.

La actividad mitótica de los linfocitos tímicos es máxima en el período neonatal y decrece después, pero siempre excede la de los tejidos linfoides periféricos.

Alrededor del 95 % de los linfocitos tímicos se reemplazan cada 3 ó 4 días, los restantes tienen vida más larga.

Probablemente, la mayoría de los linfocitos tímicos resulte de una serie de divisiones reduccionales dentro de la cortical, comenzando a partir de células linfoides mayores, más primitivas. Un 75 % de células precursoras primitivas de la cortical se reemplazan continuamente por células madres inmigrantes ó por células precursoras linfoides a razón de 1 % diario, las restantes son de origen intrínseco. Las células linfoides de la medular del timo tienen poca ó ninguna actividad mitótica, además tienen otras características como son una provisión de mitocondrias más rica, algunos sacos más de retículo endoplásmico, nucleolo bien desarrollado, mayor resistencia a radiaciones y cortisona, y cierto grado de competencia inmunológica.

No está bien establecido el destino final de los linfocitos tímicos.

Es poco lo que se sabe acerca de los factores inmunológicos

que regulan la linfopoyesis, se sabe que la linfopoyesis tímica no está sujeta a mecanismos externos de retroalimentación (estímulo antigénico, resección de órganos linfoides periféricos, timectomía parcial ó presencia de injertos tímicos únicos ó múltiples).

Entre los factores no inmunológicos que afectan la linfopoyesis tímica, se encuentran los corticosteroides adrenales. La adrenalectomía ó insuficiencia adrenal se asocian con un aumento del tamaño del timo y la actividad mitótica mientras que la administración de corticosteroides exógenos ocasionan atrofia del timo. La testosterona y los estrógenos pueden producir involución aguda del timo pero este efecto no es mediado por los esteroides adrenales. La hormona del crecimiento y la tiroxina producen aumento del tamaño del timo.

Los centros germinativos de los folículos linfoides son las principales áreas de linfopoyesis activa del bazo, ganglios linfáticos y placas de Peyer normales. Los folículos se ubican en la zona subcortical de los ganglios linfáticos y en la pulpa blanca del bazo. Los linfocitos del área compacta que rodea a los centros germinativos proliferan a menor velocidad y no derivan primariamente de las células de esos centros. El desarrollo de los centros germinativos depende de la estimulación antigénica; aparecen tardíamente en el curso de una respuesta inmunológica primaria verdadera y se asocian, característicamente a la segunda estimulación antigénica.

La velocidad de linfopoyesis en los centros germinativos es alta, rivalizando con la de la médula ósea y el timo. Algunas células migran desde las zonas de mayor proliferación hacia áreas más vagamente estructuradas del centro y hacia el tejido linfoide vecino. Al parecer, por lo menos una fracción de estas células se diferencia en células productoras de anticuerpos. Sin embargo, la mayoría de las células formadas al parecer se desintegran in situ; sus núcleos y otros componentes son digeridos con frecuencia, por los monocitos y macrófagos, cuya producción acompaña a la intensa actividad linfoproliferativa.

Las células ubicadas en las zonas paracorticales de los ganglios linfáticos y en las vainas periarteriolas del bazo son capaces de proliferar luego de la estimulación con ciertos antígenos. La velocidad de linfopoyesis en estas áreas es mucho menor que la que se produce en los folículos.

El factor primordial de control de la masa total de linfocitos del organismo es, al parecer la cantidad de exposición al antígeno.

Hay dos patrones básicos de migración de linfocitos: uno involucra la migración de las células precursoras desde la médula ósea hacia el timo y la bolsa y, desde estas estructuras hacia los órganos linfoides periféricos como los ganglios linfáticos y el bazo; el otro consiste en una recirculación continua de linfocitos altamente diferenciados derivados primariamente de las

áreas timo-dependientes de los glóbulos linfáticos y del bazo.

La principal función de los linfocitos es la producción de inmunidad, un fenómeno complejo, que culmina con la síntesis de inmunoglobulinas específicas (anticuerpos) y el establecimiento de la inmunidad celular.

Los linfocitos son un componente de vital importancia de un sistema inmune funcional y anatómicamente definido, que incluye la médula ósea, el timo, los tejidos linfáticos del intestino, el bazo, los ganglios linfáticos, los vasos linfáticos y la sangre.

LINFOCITO, el linfocito sanguíneo generalmente es pequeño (10 micras ó menos) pero son comunes las formas más grandes, se han dividido en grandes, medianos y pequeños.

En las células teñidas con colorante de Wright, el núcleo es de color azul púrpuro intenso y se compone de agregados densos de cromatina. El núcleo, es redondeado aunque puede ser ligeramente dentado y tiene una ubicación excéntrica dentro del citoplasma azul celeste. Los nucleolos no son visibles con técnicas comunes. El citoplasma puede formar un reborde delgado alrededor del núcleo ó puede ser muy abundante. Generalmente no se observan gránulos citoplasmáticos aunque en algunas células aparecen gránulos brillantes de color rojo violáceo (azurófilos) que difieren de los de las células mieloides por que no producen reacción de oxidasa ó peroxidasa. Tienen movilidad activa y se mueven en forma característica lo que les da aspecto de espejo de mano: el núcleo se ubica en la extremidad anterior

(sobresaliente) y el citoplasma (el mango) se arrastra por detrás de él; otros tipos de movimientos son de reptación ó ameboides. Se demostró en los cultivos que algunas células móviles tienen un uropodio, un proceso citoplasmático como, semejante a un pie, unido a la extremidad del mango del "espejo". El uropodio se encuentra solamente en las células T.

La visión de los linfocitos pequeños en el microscópio electrónico revela la presencia de una membrana citoplasmática bilaminar lisa, con escasas microvellosidades y de microespículas rígidas. El escaso citoplasma de los linfocitos pequeños muestra la notoria ausencia de orgánoides. Se encuentra un complejo de Golgi pequeño, cerca de la muesca nuclear, en esta área se ubican también uno ó dos centriolos.

## 5.2 CONTROL DE LA HEMATOPOYESIS

La sugerencia de que el bazo determina la edad en la cuál los eritrocitos jóvenes se liberan de la médula ósea y que la reticulocitosis postesplenectomía es el resultado de la supresión de este control, se explica ahora por que el bazo normal atrapa reticulocitos, por lo que después de la esplenectomía, estas células jóvenes, viscosas y fácilmente aglutinables, pueden circular libremente en la sangre. Por otra parte, el concepto de que el bazo podría influir sobre la población de células madres de la médula ósea se ha extendido y es claro ahora que en el ratón, el bazo puede servir como fuente de UFC capaces de

repoblar una médula deplecionada. Esto podría no representar un control específico de la hematopoyesis, por el hecho de que el incremento de las células madre hematopoyéticas, medido por la formación endógena de colonias esplénicas, puede producirse por la inyección de plasma extraño, endotoxina y una variedad de otras sustancias. Queda aún sin demostrar entonces, la existencia de una sustancia específica humoral esplénica de control.

Las observaciones realizadas sobre los efectos de la esplenectomía y reimplantación de tejido esplénico, sugieren también la posible existencia de un factor humoral esplénico. Estas observaciones sugieren que la velocidad de producción ó de liberación de leucocitos de la médula, podría estar bajo el control del bazo, pero también son posibles otras explicaciones y aún no se demostró la existencia de una "leucopoyetina" humoral esplénica.

La observación, bien conocida, de que la radiación dirigida al bazo se asocia con una reducción de los leucocitos circulantes en los pacientes leucémicos, llevo a la especulación de que ésta alteración está determinada por la liberación de un factor humoral esplénico, en respuesta a la terapia radiante. Los estudios de los efectos de la reinyección de plasma aspirado antes y después de la irradiación del bazo, apoyan esta hipótesis.

La trombocitosis postesplenectomía, se explica sobre la base de la supresión del sitio de almacenamiento normal de alrededor de un tercio de las plaquetas sanguíneas. No se demostró aún ninguna actividad trombocitopoyética esplénica.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LOS LEUCOCITOS

(COLORACION DE WRIGHT)

TIPO DE CELULA	NUCLEO							CITOPLASMA			
	TAMANO	POSICION	FORMA	COLOR	CRROMATINA	MEMBRANA NUCLEAR	NUCLEOLO	CANTIDAD RELATIVA	COLOR	ZONA CLARA	GRANULOS
LEUCOCITOS A. MIELOBLASTOS	10-18 MICRAS	EXCENTRICO O CENTRAL	REDONDA U OVAL	PURPURA ROJIZO CLARO	RED MUY FINA	MUY FINA	2-5	ESCALA	AZUL	NO HAY	NO HAY
B.PROMIELOCITO	12-20 MICRAS	EXCENTRICO O CENTRAL	REDONDA U OVAL	PURPURA ROJIZO CLARO	RED MUY FINA	FINA	2-5	MODERADA	AZUL	NO HAY	AZUROFILOS
C.MIELOCITO	12-18 MICRAS	EXCENTRICO	OVAL O LIGERAMENTE INDENTADA	PURPURA ROJIZO	FINA, PERO SE HACE GRADUALMENTE GRUESA	INDISTINGUIBLE	RAROS	MODERADA	ROSA AZULADO	NO HAY	AZUROFILOS MAS GRANULOS ESPECIFICOS
D.METAMELOCITO	10-18 MICRAS	EXCENTRICO O CENTRAL	HERRADURA GRUESA INDENTADA	AZUL PURPUREO CLARO	SE DISTINGUEN CLARAMENTE LA BASICROMATINA OXICROMATINA	PRESENTE	NO HAY	ABUNDANTE	ROSA	NO HAY	NEUTROFILOS EOSINOFILOS O BASOFILOS
FORMA JUVENIL O EN CAYADO	10-16 MICRAS	EXCENTRICO O CENTRAL	FORMA DE CAYADO DE ESPESOR UNIFORME	AZUL PURPUREO CLARO	SE DISTINGUEN CLARAMENTE LA BASICROMATINA OXICROMATINA	PRESENTE	NO HAY	ABUNDANTE	ROSA	NO HAY	NEUTROFILOS EOSINOFILOS O BASOFILOS
NEUTROFILO POLIMORFO-NUCLEAR	10-15 MICRAS	EXCENTRICO O CENTRAL	2-5 O MAS LOBULOS EVIDENTES	AZUL PURPUREO OSCURO	MUY GRUESA	PRESENTE	NO HAY	ABUNDANTE	ROSA TENUE	NO HAY	FINOS, ROSA O ROSA VIOLADO
EOSINOFILO POLIMORFO-NUCLEAR	10-15 MICRAS	EXCENTRICO O CENTRAL	2-3 LOBULOS	AZUL PURPUREO	GRUESA	PRESENTE	NO HAY	ABUNDANTE	ROSA	NO HAY	GRANDES, GRUESOS TAMANO UNIFORME NUMEROSOS ROJO CARMESI
BASOFILO POLIMORFO-NUCLEAR	10-15 MICRAS	CENTRAL	2-3 LOBULOS	AZUL PURPUREO	GRUESA CUBIERTA CON GRANULOS	PRESENTE	NO HAY	ABUNDANTE	ROSA TENUE	NO HAY	GRANDES, GRUESOS UNIFORMES, NEGRO AZULADOS

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LOS LEUCOCITOS (COLORACION DE WRIGHT). CONT.

TIPO DE CELULA	TAMAÑO	NUCLEO						CITOPLASMA			
		POSICION	FORMA	COLOR	CRROMATINA	MEMBRANA NUCLEAR	NUCLEOLO	CANTIDAD RELATIVA	COLOR	TEXTURA	GRANULOS
E. LINFOCITOS AL INFANTIL	10-15 MICRAS	EXCENTRICA O CENTRAL	REDONDA U OVAL	PURPURA ROJIZO CLARO	PARTICULAS MODERADAMENTE GRUESAS	BASTANTE DENSA	1-2	ESCASA	AZUL CLARO	PRESENTE	NO HAY
LINFOCITO MADURO	10-18 MICRAS	EXCENTRICA	REDONDA O LIGERAMENTE INDENTADA	AZUL PURPUREO OSCURO	GRANDES MASAS DE TAMAÑO MODERADO O GRANDE	DENSA	NO HAY	ESCASA O ABUNDANTE	REDONDA O LIGERAMENTE INDENTADA	PRESENTE AL CITOPLASMA OSCURO	NINGUNO O POCOS AZURDIFIOS
J. MONOCITO	12-20 MICRAS	EXCENTRICA O CENTRAL	REDONDA OVAL HENDIDA O HERRADURA	VIOLETA AZULADO PALIDO	RETICULADA FINA, TIPO ENCAJE O MADEJA	PRESENTE	NO HAY	ABUNDANTE	GRISACEO O AZUL TURBIO	NO HAY	ABUNDANTES, FINOS, LILA O AZUL ROJIZO
MACROFAGO	15-80 MICRAS	CENTRAL	ALARGADA INDENTADA U OVAL	VIOLETA AZULADO PALIDO	ESPONJOSA	EVIDENTE	NO HAY	USUALMENTE ABUNDANTE	AZUL CIELO OPACO	NO HAY	NUMEROSOS MODERADAMENTE GRUESOS GRANULOS AZULES Y VACUOLAS

CAPITULO VI  
LINEA MEGACARIOCITICA

En 1906 J.H. Wright llegó a la conclusión que las plaquetas eran porciones desprendidas del citoplasma de los megacariocitos. La prueba más reciente de esta hipótesis puede resumirse como sigue:

- 1) las plaquetas se ven por primera vez en el embrión, aproximadamente en la misma época en que aparecen los megacariocitos.
- 2) la trombocitosis inducida experimentalmente se asocia a un incremento en el número de megacariocitos.
- 3) hay numerosas semejanzas entre la composición citoquímica y antigénica de los megacariocitos y las plaquetas.
- 4) los isótopos radiactivos que se incorporan a los megacariocitos, aparecen subsecuentemente en las plaquetas.
- 5) en los animales se ha observado directamente la producción plaquetaria a partir de los megacariocitos.

**MEGACARIOCITOS.** Son células extremadamente grandes, que varían de 35 a 160 micras de diámetro. Tienen un núcleo irregularmente lobulado, con forma de anillo ó de rosca, compuesto por cromatina densa y que se tiñe de azul brillante con el colorante de Wright. No se ven nucleolos. El citoplasma es abundante, de color azul claro y está lleno, de granos azurófilos delicados. En el feto, los megacariocitos se

encuentran, sucesivamente, en el hígado, el bazo y la médula ósea. En los mamíferos adultos, se hallan en la médula ósea, el pulmón y el bazo.

Se ha considerado que los megacariocitos provienen de diversas fuentes, incluyendo las células mesenquimáticas primitivas, las células reticulares, los hemocitoblastos ó linfocitos grandes y las células de revestimiento de los sinusoides hepáticos. Sin embargo, ahora hay pruebas convincentes de que se originan en común con los eritrocitos y granulocitos, a partir de las células madres pluripotenciales.

El primer precursor morfológicamente reconocible es el MEGACARIOBLASTO. Esta célula mide 15 a 50 micras de diámetro y contiene un núcleo grande, oval ó arrañonado, con varios nucleolos. El citoplasma es escaso, no granular e intensamente basófilo. Puede verse mitosis. El megacarioblasto se agranda, comienzan a aparecer gránulos citoplasmáticos y se forma el PROMEGACARIOCITO, una célula de 20 a 80 micras de diámetro. El núcleo de esta célula es oval ó de forma irregular; el citoplasma es más abundante que el del megacarioblasto y contiene gránulos que se desarrollan primeramente en la zona perinuclear. De este precursor se forma el MEGACARIOCITO MADURO GRANULAR, (descrito anteriormente) los términos: estadios I, II y III se usan frecuentemente con referencia al grado de maduración de los megacariocitos y corresponden en general a las designaciones de

megacarioblasto, promegacariocito y megacariocito granular respectivamente.

La morfología de los MEGACARIOCITOS en extendidos coloreados, normalmente es muy variable. Algunos observadores distinguen los megacariocitos de "reserva", de las formas productoras de plaquetas, basándose en la ausencia de gránulos en la perifería de la célula. La "producción plaquetaria" aparente de megacariocitos inmaduros ó no funcionantes puede deberse a artefactos, como por ejemplo "seudotrombocitos" formado por rotura de una cubierta celular viscosa durante la preparación del extendido, ó la adhesión al megacariocito de agregados plaquetarios que se forman en la sangre contaminante.

Cuando se acelera la producción plaquetaria, los megacariocitos aumentan de tamaño y de número.

Los megacariocitos se ubican en la médula ósea en íntima relación con la membrana sinusoidal. Las plaquetas pueden producirse por dos procesos algo diferentes, ambos comprobados en el hombre. La formación plaquetaria seudopódica, descrita por Wright, comienza con el desarrollo de numerosos seudópodos citoplasmáticos largos, que se extienden a través de las aberturas de la membrana sinusal, hacia la luz, muchos de aquellos en forma semejante a un pulpo. Estos seudópodos se vuelven cada vez más finos y terminan siendo filiformes; dentro de ellos se forman masas granulares del tamaño de plaquetas.

Probablemente estos pseudópodos son capturados en los capilares sinusoidales, por sus contracciones se liberan los segmentos y las plaquetas así formadas son arrastradas por la corriente sanguínea.

Las plaquetas se forman también por fragmentación in situ de grandes porciones de citoplasma megacariocítico. Este hecho comienza con la formación de "zonas de demarcación", que aparecen primeramente como una cadena de pequeñas vesículas, que se funden para formar fisura. El agrandamiento y fusión simultáneos de estas fisuras, dan como resultado la rotura del citoplasma megacariocítico en 2000 a 4000 unidades distintas, las plaquetas. Este proceso puede comprender grandes masas de citoplasma en forma simultánea ó puede producirse por medio de una demarcación continúa de áreas más pequeñas. Virtualmente, todo el citoplasma del megacariocito puede romperse y el núcleo desnudo degenera.

Se considera que el principal sitio de producción de plaquetas durante la vida adulta es la médula ósea. Howell y Donahue contradijeron lo anterior en los siguientes términos:

- 1) generalmente, el recuento de plaquetas es mayor en sangre arterial que en sangre venosa.
- 2) hay menos plaquetas en la médula ósea que en el bazo ó en los pulmones,
- 3) la perfusión de médula ósea rinde pocas plaquetas, mientras

que la perfusión de pulmones produce muchas,

4) los megacariocitos que se ven en los pulmones, al parecer, son activos productores de plaquetas.

Estos autores concluyeron que las plaquetas se forman normalmente en el pulmón, a partir de megacariocitos que se desarrollan ahí, de la misma manera que en la médula ósea. Aunque no se comprobó la formación de megacariocitos en el pulmón, existe un apoyo considerable para la suposición de que las plaquetas se liberan en los pulmones a partir de megacariocitos traídos por la sangre venosa, desde la médula ósea. Del 20 al 50% de los megacariocitos maduros pueden entrar en la sangre, llegando en último término a los pulmones, y del 7 al 17% de las plaquetas del organismo pueden producirse allí.

A veces, se encuentran megacariocitos ó fragmentos de sus núcleos ó citoplasma en sangre periférica. Son de tamaño variable y de forma oval ó irregular. El núcleo se colorea profundamente y puede estar rodeado por una pequeña porción de citoplasma.

Las células de la línea megacariocítica, morfológicamente reconocibles, carecen de la capacidad de autorenovarse y se mantienen gracias al influjo continuo de células precursoras del compartimiento de células madres. Se ha comprobado la existencia de un pool de células madres intermedio "multiplicador", "dedicado" a diferenciarse en megacariocitos.

La maduración de estas células primitivas en megacariocitos maduros, comprende un proceso único.

La maduración del núcleo implica una endoreduplicación nuclear (endomitosis), proceso en el cual el material nuclear se reduplica, pero el núcleo no se divide. Esto da como resultado un núcleo poliploide, que debe distinguirse de una célula poliploide. Cada división produce una duplicación de todo el material nuclear. Esto sucede en una serie de células que contienen el equivalente de 4, 8, 16 y 32 pares de cromosomas; este número se denomina también número nuclear (N), valor "ploide" o clase.

La maduración del citoplasma, que se manifiesta por un progresivo aumento de su cantidad y granularidad, y una pérdida de la basofilia primitiva, se produce sin división citoplasmática. La maduración citoplasmática es evidente sólo después de haberse completado la división nuclear. Sin embargo, el desarrollo de organoides citoplasmáticos aparece mucho antes. Tanto la maduración nuclear como la citoplasmática, dan como resultado un incremento del volumen de la célula. Según la estimación de la marcación del DNA, el tiempo total de maduración megacariocítica, es de aproximadamente cinco días.

Debido a que las plaquetas se producen por fragmentación del citoplasma de los megacariocitos, el número total de plaquetas producido depende del número y volumen citoplasmático de estas

células precursoras. Hay varios métodos de enumeración de megacariocitos pero ninguno es completamente satisfactorio. El más utilizado es un método indirecto que incluye la determinación microscópica del número de megacariocitos en relación al número de precursores eritroides; estos últimos se cuantifican con bastante precisión marcándolos con hierro radiactivo. Con este método el número normal de megacariocitos en el hombre es de 6.1 +/- 0.7 millones por kg de peso corporal.

La vida media de las plaquetas estimada por la marcación in vitro de toda la población con Cr <sup>51</sup>-cromato, es de 9 a 12 días.

La constancia notable del recuento plaquetario en circunstancias normales, sugiere que la producción de estas células está bien regulada; durante muchos años se señaló la presencia de factores humorales de control semejantes a la eritropoyetina. Los estudios que demuestran que hay un aumento de la producción plaquetaria por trombocitoforesis y su depresión por una transfusión de plaquetas, proporciona una buena prueba de la presencia de esa "trombopoyetina".

Los efectos de esta sustancia humoral se pueden cuantificar de modo aproximativo. Varios grupos de investigadores demostraron que hay estimulación de la trombopoyesis en animales que han recibido suero, plasma y fracciones de éstos, y orina derivada de fuentes humanas y animales. Los resultados de estos estudios no son del todo consistentes y existen factores no específicos que pueden confundir los resultados.

Los intentos de aislar y caracterizar químicamente las sustancias troebopoyéticas han tenido un éxito limitado. Estudios preliminares sugieren la presencia de un principio activo que migra electroforéticamente como una alfa-2 globulina, tiene hidratos de carbono, no dializable y termoestable. Difiere de la eritropoyetina por su labilidad de almacenamiento, su presencia en animales nefrectomizados y otros aspectos.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BLEIBERG, I., LIRON, M., AND FELDMAN, M.: STUDIES ON THE REGULATION OF HEMOPOIETIC SPLEEN COLONIES. BLOOD 29: 469, 1967.
2. CARTWRIGHT, GE. DIETARY FACTORS CONCERNED IN ERYTHROPOIESIS. BLOOD 2:111, 256, 1947.
3. CHERVENICK, P.A., LoBUGLIO, AF: HUMAN BLOOD MONOCYTES; STIMULATORS OF GRANULOCYTE AND MONONUCLEAR COLONY FORMATION IN VITRO. SCIENCE 178: 164, 1972.
4. CURRY, J.L., TRENTIN, J.J., AND WOLF, N.: HEMOPOIETIC SPLEEN COLONY STUDIES. II. ERYTHROPOIESIS. J. EXP. MED. 125:703, 1967.
5. CURRY, J.L., AND TRENTIN, J.J.: HEMOPOIETIC SPLEEN COLONY STUDIES. I. GROWTH AND DIFFERENTIATION. DEV. BIOL. 15:395, 1967.
6. DACIE JV. WHITE JC: ERYTHROPOIESIS. J. CLIN. PATHOL. 2:1, 1959.
7. DAVIDSOHN, ISRAEL. HENRY JOHN BERNARD. TODD-SANFORD. DIAGNOSTICO CLINICO FOR EL LABORATORIO. SALVAT EDITORES, S.A. 6a. EDICION, BARCELONA, 1979.
8. FLIEDNER TM et al: GRANULOCYTOPOIESIS. I. SENESCENCE AND RANDOM LOSS OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN HUMAN BEINGS. BLOOD 24: 402, 1964.
9. GORDON AS et al: THE KIDNEY AND ERYTHROPOIESIS. SEMIN. HEMATOL. 4:337, 1967; VITAMIN HORM. 31:105, 1973.
10. KATZ, D.H.: LYMPHOCYTE DIFFERENTIATION, RECOGNITION AND REGULATION. ACADEMIC NEW YORK, 1977.
11. LEWIS, J.F., AND TROBAUGH, F.E., JR.: HAEMATOPOIETIC STEM CELLS. NATURE 204:589, 1967.
12. MITCHISON, N.A.: THE COLONISATION OF IRRADIATED TISSUE BY TRANSPLANTED SPLEEN CELLS. BR. J. EXP. PATHOL. 37:239, 1956.

13. O'GRADY, L. F., LEWIS, J. P., AND TROBAUGH, F.E., JR.: THE EFFECT OF ERYTHROPOIETIN ON DIFFERENTIATED ERYTHROID PRECURSOR. J. LAB. CLIN. MED. 71: 693, 1968.
14. ORLIC, D.: ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF ERYTHROPOIESIS, IN REGULATION OF HEMATOPOIESIS, VOL. 1, ED. AS GORDON. NEW YORK; APPLETON-CENTURY-CROFTS. 1970.
15. REISSMANN, K.R.: STUDIES ON THE MECHANISM OF ERYTHROPOIETIC STIMULATION IN PARABIOTIC RATS DURING HYPOXIA. BLOOD 5:372, 1950.
16. WINTROBE MAXWELL M., HEMATOLOGIA CLINICA. EDITORIAL INTERMEDICA. CUARTA EDICION. BUENOS AIRES - ARGENTINA, 1979.
17. WOLF, N.S., AND TRENTIN, J.J. HEMOPOIETIC COLONY STUDIES V. EFFECT OF HEMOPOIETIC ORGAN STROMA ON DIFFERENTIATION OF PLURIPOTENT STEM CELLS. J. EXP. MED. 127: 205, 1968.