

19.508

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGIA



\* 5 3 0 9 5 7 8 2 3 X \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**ESTIMULACION HEMATOPOYETICA  
INDUCIDA POR UN MODIFICADOR DE LA  
RESPUESTA BIOLÓGICA DE NATURALEZA  
POLISACARIDO-PROTEINA**

Vº Bº DEL DIRECTOR DE TESIS

Fdo: GABRIEL MAGANTO FERNANDEZ.

Almudena Real Gallego

1991



ARCHIVO

**A mi madre**

Este trabajo de investigación ha sido realizado en la U.O. de Efectos Biológicos del Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), bajo la dirección del Dr. Gabriel Maganto Fernandez.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Gabriel Maganto, director de esta tesis, sin cuyo continuo apoyo, esfuerzo y confianza no hubiera podido realizarse este trabajo.

Al Dr. Juan Bueren, por su colaboración en los muy diversos aspectos de la realización de esta tesis.

Al Dr. Francisco Mingot, Director del Instituto de Protección Radiológica y Medio Ambiente del CIEMAT, por concederme la oportunidad y las facilidades necesarias para que el trabajo haya podido llevarse a cabo.

A Guillermo Güenechea, cuyo trabajo y disposición me han facilitado enormemente la realización de esta tesis.

A M<sup>a</sup> Jose Peón, por su constante preocupación e imprescindible apoyo, no sólo como el buen técnico que es, sino como compañera y amiga.

A Carmelo Esteban, porque trabajar con el me ha permitido aprender a ser cada día un poco más profesional.

A la Dra. Rosa de Vidania, por sus valiosísimos comentarios y sugerencias.

A Beatriz Albella, cuya madurez profesional y humana me ha ayudado a superar los momentos difíciles, y cuya paciencia y comprensión ha hecho tremendamente fácil el trabajo diario.

Al personal del Estabulario del Instituto de Protección Radiológica y Medio Ambiente, por su estupenda labor, y especialmente a Juanillo, cuya seriedad y responsabilidad ha facilitado tremendamente el trabajo con los ratones.

A todos mis compañeros de Laboratorio y de la O.T., los cuales me han soportado pacientemente durante estos años, y muy especialmente a Montse Aldea, ya que su apoyo y amistad ha sido total desde que inicié este trabajo.

Finalmente, un agradecimiento muy especial a Laboratorios Andrómaco por las facilidades y el apoyo concedidos en todo momento, y muy especialmente al Dr. Juan Pablo Pivel, Pilar Tuduri y al Dr. Antonio Guerrero por su confianza y ayuda incondicional desde que se inició el trabajo en colaboración.

**INDICE**

<b>1.- INTRODUCCION</b> .....	1
<b>1.1.- EL SISTEMA HEMATOPOYETICO</b> .....	2
1.1.1. Estructura del sistema hematopoyético .....	2
1.1.1.1. Precursores hematopoyéticos clonados "in vivo" .....	4
1.1.1.2. Precursores hematopoyéticos clonados "in vitro" .....	6
1.1.2. Regulación del sistema hematopoyético .....	9
1.1.2.1. Factores de crecimiento hematopoyético .....	9
1.1.2.2. Estroma hematopoyético .....	15
<b>1.2.- EFECTO DE LA RADIACION SOBRE EL SISTEMA HEMATOPOYETICO</b> .....	19
1.2.1. Síndromes causados por la radiación .....	19
1.2.2. Sensibilidad de los precursores hematopoyéticos a radiaciones ionizantes .....	20
1.2.3. Recuperación hematopoyética espontánea tras una irradiación .....	21
1.2.4. Terapia hematopoyética .....	22
<b>1.3.- MODIFICADORES DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA</b> .....	23
1.3.1. Factores de crecimiento hematopoyético .....	23
1.3.1.1. Interleuquina 3 (IL-3) .....	24
1.3.1.2. Factor estimulante de colonias granulo-macrofágicas (GM-CSF) .....	24
1.3.1.3. Factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) .....	25
1.3.1.4. Factor estimulante de colonias macrofágicas (M-CSF) .....	26
1.3.1.5. Interleuquina 1 (IL-1) .....	27
1.3.2. Radioprotectores .....	27
1.3.2.1. Aminotioles .....	28
1.3.2.2. Extractos de plantas medicinales .....	28
1.3.2.3. Polisacáridos .....	28
<b>2.- OBJETIVOS</b> .....	31

<b>3.- MATERIALES Y METODOS</b>	33
<b>3.1.- MODIFICADORES DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA</b>	34
<b>3.2.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION</b>	34
<b>3.3.- SUSPENSIONES CELULARES</b>	35
3.3.1. Suspensiones celulares de médula ósea	35
3.3.2. Suspensiones celulares de bazo	35
3.3.3. Suspensiones celulares de sangre periférica	35
<b>3.4.- CUANTIFICACION DE PRECURSORES HEMATOPOYETICOS Y CELULAS CIRCULANTES</b>	36
3.4.1. Unidad formadora de colonias endógenas en bazo (E-CFU)	36
3.4.2. Unidad formadora de colonias exógenas en bazo (CFU-S)	37
3.4.3. Unidad formadora de colonias granulo-macrofágicas (CFU-GM)	38
3.4.4. Unidad formadora de "burst" eritroides (BFU-E)	39
3.4.5. Células maduras circulantes	41
<b>3.5.- CULTIVO DE LARGA DURACION DE MEDULA OSEA (LTBMC)</b>	41
3.5.1. Obtención de suspensiones celulares a partir de LTBMC	42
3.5.2. Determinación de la presencia de actividad estimuladora de colonias (CSA) en el sobrenadante de LTBMC	43
3.5.3. Inhibición del GM-CSA presente en el sobrenadante de LTBMC con antisuero anti GM-CSF	44
<b>3.6.- IRRADIACION</b>	46
3.6.1. Equipo de irradiación	46
3.6.2. Dosimetrías	46
3.6.3. Respuesta hematopoyética a la radiación	47
<b>3.7.- ANALISIS ESTADISTICO</b>	47

<b>4.- RESULTADOS</b>	48
<b>4.1.- ESTIMULACION HEMATOPOYETICA INDUCIDA POR AM3</b>	49
4.1.1. Efecto del tratamiento con AM3 sobre el número de colonias endógenas en bazo (E-CFU)	49
4.1.1.1. Influencia del número de dosis de AM3 administradas	50
4.1.1.2. Influencia de la pauta de administración de AM3	52
4.1.1.3. Influencia de la dosis de radiación	53
4.1.1.4. Influencia de la cepa de ratón	54
4.1.2. Efecto del tratamiento con AM3 sobre la recuperación hematopoyética en ratones subletalmente irradiados	55
4.1.3. Efecto del tratamiento con AM3 sobre la supervivencia de ratones irradiados con dosis potencialmente letales	59
<b>4.2.- ESTIMULACION HEMATOPOYETICA INDUCIDA POR AM5</b>	61
4.2.1. Determinación de la dosis óptima	61
4.2.1.1. Ensayos de formación de colonias endógenas en bazo (E-CFU)	61
4.2.1.2. Ensayos en ratones no irradiados	63
4.2.2. Cinética de estimulación hematopoyética tras el tratamiento con AM5 en ratones no irradiados	65
4.2.2.1. Celularidad	66
4.2.2.2. Precursores pluripotentes	67
4.2.2.3. Precursores comprometidos	69
4.2.2.4. Células maduras circulantes	70
4.2.3. Influencia del contenido residual de endotoxina presente en la muestra, en la estimulación hematopoyética inducida por AM5	71
4.2.3.1. Estimulación hematopoyética en ratones no irradiados, tras el tratamiento con endotoxina (LPS)	72
4.2.3.2. Estimulación hematopoyética en ratones no irradiados tratados con AM5 sometido a un tratamiento hipertérmico	74
4.2.4. Efecto de la administración de AM5 sobre la hematopoyesis de ratones irradiados	75
4.2.4.1. Efecto del tratamiento con AM5 sobre la supervivencia de ratones irradiados con dosis potencialmente letales	76
4.2.4.2. Efecto del tratamiento con AM5 sobre la recuperación hematopoyética tras una irradiación subletal	77
4.2.5. Efecto del tratamiento "in vitro" con AM5 sobre la hematopoyesis en cultivos de larga duración de médula ósea	81
4.2.5.1. Relación dosis-efecto	82

4.2.5.2.	Efecto del tratamiento con múltiples dosis de AM5, sobre la hematopoyesis de LT BMC	86
4.2.6.	Mediadores de la estimulación hematopoyética inducida por AM5 en LT BMC	88
4.2.6.1.	Liberación de actividad estimuladora de colonias en LT BMC tras el tratamiento con AM5	89
4.2.6.2.	Caracterización de los CSFs presentes en LT BMC tras el tratamiento con AM5	94
<b>5.- DISCUSION</b>		97
<b>5.1.- EFECTO ESTIMULADOR DEL AM3 SOBRE EL SISTEMA HEMATOPOYETICO</b>		98
5.1.1.	Estimulación de precursores hematopoyéticos pluripotentes (E-CFU) en animales subletalmente irradiados	99
5.1.2.	¿El incremento de E-CFU tras el tratamiento con AM3 se ve reflejado en un aumento de la supervivencia de animales sometidos a irradiación potencialmente letal?	102
<b>5.2.- ESTIMULACION HEMATOPOYETICA INDUCIDA POR AM5</b>		103
5.2.1.	Estimulación hematopoyética tras el tratamiento con AM5: relación dosis-efecto	104
5.2.1.1.	Ensayos de formación de colonias endógenas en bazo (E-CFU)	104
5.2.1.2.	Estudios de precursores hematopoyéticos en ratones no irradiados	106
5.2.2.	Cinética seguida por los precursores hematopoyéticos tras el tratamiento con AM5	108
5.2.2.1.	Movilización de precursores hematopoyéticos pluripotentes tras el tratamiento con AM5	111
5.2.2.2.	La estimulación hematopoyética producida por el AM5 no es consecuencia del LPS residual presente en la muestra	112
5.2.3.	Capacidad radioprotectora del AM5	113
5.2.4.	Capacidad del AM5, administrado "in vitro", para estimular la hematopoyesis en LT BMCs	117
5.2.5.	¿Son los CSFs mediadores del efecto estimulador del AM5 en LT BMC?	120
5.2.6.	Caracterización de los CSFs liberados en LT BMC tras el tratamiento con AM5	123

<b>6.- CONCLUSIONES</b>	.....	125
<b>7.- BIBLIOGRAFIA</b>	.....	129

**RESUMEN**

## RESUMEN

Los trabajos que configuran esta tesis, se enmarcan dentro de una línea de investigación para el desarrollo de nuevos fármacos capaces de activar la recuperación hematopoyética, en la que colaboran la Unidad de Efectos Biológicos del CIEMAT y Laboratorios Andrómaco S.A.

La aplicación de los MRB en terapia oncológica, está basada no sólo en su capacidad para potenciar las funciones antitumorales del sistema inmune, sino también en la de restablecimiento de las poblaciones celulares hematopoyéticas afectadas por los tratamientos de quimio- y radio-terapia.

En este trabajo, nos hemos centrado en esta última vertiente. Así, hemos evaluado la estimulación hematopoyética murina inducida por un MRB de naturaleza polisacárido-proteína, en sus distintas formas galénicas: el adsorbato administrado vía oral (AM3), y el compuesto soluble susceptible de ser administrado vía intravenosa (AM5).

Como parámetro para la cuantificación de la estimulación hematopoyética, hemos utilizado el contenido en precursores pluripotentes y comprometidos hacia la línea granulo-macrofágica y eritroide en distintos órganos hematopoyéticos.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la potente capacidad estimuladora de este MRB, alcanzándose la máxima respuesta hematopoyética con el producto en su forma soluble. Asimismo, demuestran su capacidad protectora frente a radiaciones ionizantes, en el rango de dosis que provocan el síndrome hematopoyético.

Su acción estimuladora alcanza tanto a la hematopoyesis esplénica, como se pone de manifiesto tras su administración "in vivo", como a la hematopoyesis medular demostrada por su acción sobre el LTBM. Este último modelo biológico nos ha permitido confirmar que el incremento de precursores hematopoyéticos producido por la administración de este MRB está mediado por la liberación de factores estimulantes hematopoyéticos endógenos, entre los que se encuentra el GM-CSF.

## **ABREVIATURAS**

<b>AM3</b>	Asociación no covalente proteína-polisacárido, en forma de adsorbato, activo vía oral.
<b>AM5</b>	Asociación no covalente proteína-polisacárido en forma soluble, activo vía intravenosa.
<b>BFU-E</b>	Unidad formadora de "burst" eritroides.
<b>CFU-GM</b>	Unidad formadora de colonias granulo-macrofágicas.
<b>CFU-S</b>	Unidad formadora de colonias exógenas en bazo.
<b>CSA</b>	Actividad estimuladora de colonias.
<b>CSF</b>	Factor estimulante de colonias.
<b>E-CFU</b>	Unidad formadora de colonias endógenas en bazo.
<b>Epo</b>	Eritropoyetina.
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino.
<b>G-CSF</b>	Factor estimulante de colonias granulocíticas.
<b>GM-CSA</b>	Actividad estimuladora de colonias granulo-macrofágicas.
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias granulo-macrofágicas.
<b>Gy</b>	Unidad internacional de dosis de radiación.
<b>HS</b>	Suero de caballo.
<b>ILs</b>	Interleuquinas.
<b>IMDM</b>	Medio Iscove modificado por Dulbecco.
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal.
<b>i.v.</b>	Intravenoso
<b>LPS</b>	Endotoxina bacteriana.

<b>LTBMC</b>	Cultivo de larga duración de médula ósea.
<b>M-CSF</b>	Factor estimulante de colonias macrofágicas.
<b>MRB</b>	Modificadores de la respuesta biológica.
<b>s.c.</b>	Subcutáneo.
<b>SCF</b>	Factor estimulante de células cepa.

## **INTRODUCCION**

## **1.1.- EL SISTEMA HEMATOPOYETICO.**

### **1.1.1.- Estructura del sistema hematopoyético.**

El número de células maduras producidas por el sistema hematopoyético durante la vida del individuo es muy alto. Un individuo adulto produce al día  $2,1 \times 10^{11}$  células rojas y una cantidad similar de granulocitos. Además, el sistema hematopoyético es capaz de incrementar la producción de células maduras frente a situaciones de "emergencia" como por ejemplo pérdida de sangre, hemolisis o infecciones.

El proceso de producción de células sanguíneas tiene lugar principalmente en médula ósea de humanos y en médula ósea y bazo en el caso del ratón.

En el sistema hematopoyético, que constituye uno de los ejemplos más característicos de tejidos con organización jerárquica, se producen de forma continua células maduras funcionales a partir de una población relativamente pequeña de células cepa.

Durante la diferenciación, proliferación y maduración, las células cepa generan poblaciones amplificadas de células progenitoras comprometidas, que posteriormente se amplifican para dar lugar a las células maduras funcionales.

Así, el sistema hematopoyético se considera formado por tres compartimientos: células cepa, precursores comprometidos y células funcionales maduras (Figura 1).

En la médula ósea reside la población de células cepa pluripotentes con capacidad de automantenimiento, responsables de dar lugar a todas las células sanguíneas necesarias en el individuo adulto. Frente a una división celular la célula cepa tiene dos opciones: bien automantenerse, dando lugar a una célula que es la copia exacta de sí misma, o bien comprometerse a diferenciar y desarrollarse.

El fenómeno de automantenimiento permite que la población de células cepa se mantenga durante toda la vida del individuo, mientras que el compromiso hacia diferenciación tendrá como resultado la formación de células maduras funcionales necesarias en sangre y en tejidos.

En general, se acepta que el compartimiento de células cepa es una población celular que se encuentra quiescente (Lajtha y Col, 1969; Hodgson y Bradley, 1984). Sin embargo, a medida que estas células se van comprometiendo hacia una línea celular concreta adquieren un mayor potencial proliferativo (Till y McCulloch, 1980; Eaves y Eaves, 1984). Las células que constituyen el compartimiento de precursores

comprometidos poseen una capacidad de automantenimiento menor que las células cepa, y mediante diferenciación dan lugar a la formación de células maduras.

Frente a una situación de emergencia, se produce una respuesta rápida y eficiente del sistema hematopoyético, que puede prolongarse durante largos períodos de tiempo y que se lleva a cabo mediante un aumento del número de células cepa en fase de síntesis y por divisiones extra de amplificación de los precursores comprometidos. Las células en maduración también contribuyen en estas situaciones, acortando su ciclo celular.

Por ello, no es de extrañar que el sistema hematopoyético no muestre disminuída su actividad con la edad (Botnick y col, 1982), observándose niveles normales de

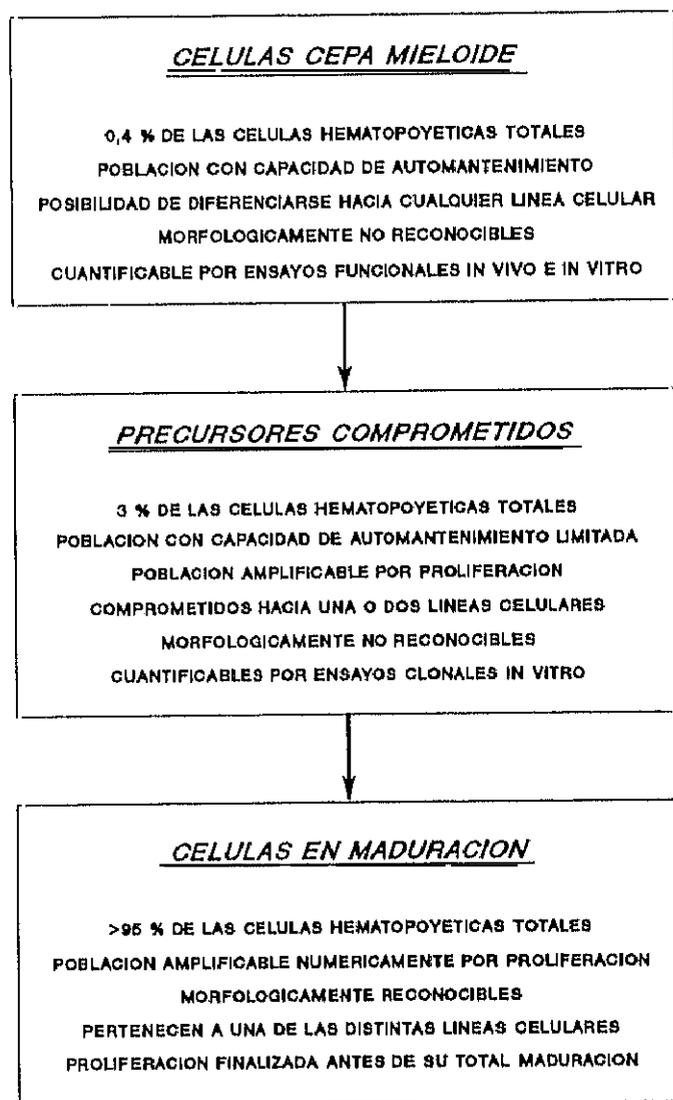


Figura 1: Compartimentalización del sistema hematopoyético. Características. (Lord y Testa, 1988).

precursores comprometidos y de células cepa pluripotentes en animales y humanos de edad avanzada (Schofield y col, 1986).

En el conocimiento de la estructura del sistema hematopoyético, hay que destacar que aunque técnicas de histología y morfología clásicas, aportaron cierta información sobre las células hematopoyéticas, fue fundamentalmente a raíz de la puesta a punto de técnicas de cultivo "in vivo" e "in vitro" de precursores hematopoyéticos, cuando se pudo establecer el esquema del sistema hematopoyético conocido en la actualidad (Figura 2).

#### 1.1.1.1.- Precursos hematopoyéticos clonados "in vivo".

El ensayo de formación de colonias en bazo descrito por Till y Mc Culloch (Till y Mc Culloch, 1961), fue la primera técnica que permitió clonar un precursor hematopoyético. Esencialmente, esta técnica permite identificar y cuantificar células hematopoyéticas pluripotentes con capacidad de automantenimiento, basándose en su capacidad para formar colonias en la superficie del bazo de ratones receptores irradiados con una dosis que esteriliza su sistema hematopoyético. Se demostró que estas colonias contenían, o daban lugar, a todos los tipos celulares hematopoyéticos mostrados en la Figura 2, conteniendo así mismo CFU-S (Unidad Formadora de Colonias en Bazo), lo que querría decir que las CFU-S originales tenían capacidad de automantenimiento (Till y Mc Culloch, 1980). Las colonias formadas en el bazo eran de origen clonal: una colonia procedía de la división reiterada de una única célula (Becker y col, 1963; Wu y col, 1967).

Un dato importante para entender la fisiología del sistema hematopoyético es la heterogeneidad de la población de CFU-S. Esta heterogeneidad se demuestra, porque dentro de la población de CFU-S no todas ellas tienen la misma capacidad de automantenimiento.

Worton y col (Worton y col, 1969) fueron los primeros que definieron la existencia de distintas subpoblaciones dentro de la población de CFU-S. Al separar una población de CFU-S en un gradiente de densidad lineal, las células que mostraban densidad relativa baja, tenían mayor capacidad de automantenimiento que las de alta densidad. Este hecho junto con estudios posteriores llevaron al concepto de una población de CFU-S estructuralmente ordenada, en donde las CFU-S más maduras mostraban menor capacidad de automantenimiento y eran más susceptibles a diferenciación (Hellman y col, 1978). Además, las CFU-S dependiendo de su grado de maduración van a aparecer en distintos días cuando se analizan mediante el ensayo de formación de colonias en bazo, los precursores más maduros aparecen a los 9 días de cultivo, mientras que las CFU-S más indiferenciadas tardan 12 días en crecer (Magli y col, 1982).

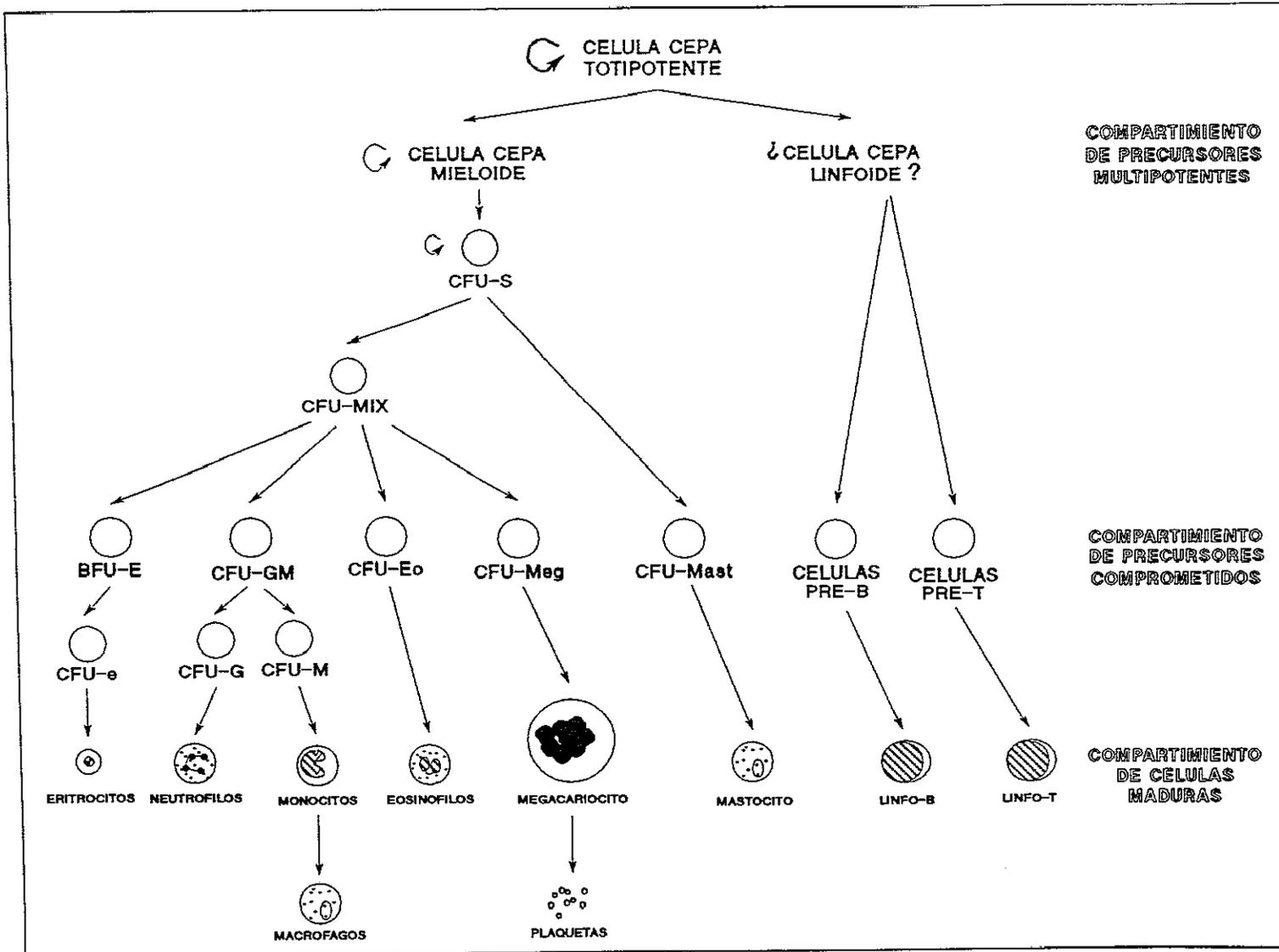


Figura 2: Estructura del sistema hematopoyético. Organización jerárquica.

Una interpretación complementaria de la heterogeneidad de las CFU-S, es el concepto de que las células cepa están asociadas a dominios reguladores dentro de un "nicho" microambiental. Las características de la células cepa no son "intrínsecas" sino que vienen determinadas por el microambiente hematopoyético (Schofield, 1978). En el apartado Regulación del sistema hematopoyético, se tratará más en detalle la teoría de "nicho" hematopoyético.

#### 1.1.1.2.- Precursores hematopoyéticos clonados "in vitro".

Un segundo hallazgo experimental de relevancia, fue el desarrollo de técnicas que permitían el cultivo "in vitro" de precursores hematopoyéticos.

Los ensayos "in vitro" se llevan a cabo mediante el cultivo de células hematopoyéticas en medio semisólido, en presencia de factores reguladores. Bajo estas condiciones, un precursor determinado sigue un proceso de diferenciación y proliferación, dando lugar tras un período adecuado de incubación, a una colonia, cuya composición celular dependerá del precursor cultivado.

La supervivencia, proliferación y capacidad de formar colonias "in vitro" de los precursores hematopoyéticos, es dependiente de factores reguladores específicos: factores de crecimiento hematopoyético (Burgess y col, 1980; Metcalf y Merchav, 1982), de tal manera que en ausencia de estos factores los precursores mueren.

Las colonias obtenidas mediante el cultivo "in vitro" de precursores hematopoyéticos son de origen clonal, procediendo cada colonia de una única célula (Moore y col, 1972; Prchal y col, 1976; Fauser y Messner, 1978; Metcalf y col, 1980). Estos ensayos clonales, permiten realizar estudios cuantitativos tanto de precursores multipotentes, aún no restringidos a una línea hematopoyética concreta, como de precursores comprometidos en un línea concreta de diferenciación.

Cultivo "in vitro" de **colonias de morfología blástica** (Nakahata y Ogawa, 1982a). El gran potencial de proliferación y diferenciación de estas colonias se demuestra porque, al inyectar células de estas colonias en ratones irradiados con dosis potencialmente letales, son capaces de formar colonias en el bazo de estos animales. Asimismo, las células de colonias blásticas son capaces de dar lugar, cuando se cultivan "in vitro", a nuevas colonias blásticas, así como a colonias compuestas por células de diversas líneas hematopoyéticas. Estas observaciones mostraban a las colonias blásticas como originadas de las células cepa. Estas colonias se obtuvieron a partir de médula ósea de ratón, pero desafortunadamente, no se ha podido extrapolar el ensayo a médula ósea humana.

Las **HPP-CFC** (Célula formadora de colonias con alto potencial proliferativo), dan lugar en cultivo "in vitro" a colonias que contienen células diferenciadas hacia la línea macrofágica, así como células cepa (Bradley y Hodgson, 1979).

Recientemente ha sido posible cultivar "in vitro" **precursores pluripotentes (CFU-A)** (Pragnel y col, 1988). Estos precursores poseen una serie de características comunes con las células cepa, al poseer cierta capacidad de automantenimiento y baja actividad proliferativa.

Cultivo de **precursores de colonias mixtas**. Estas colonias contienen células eritroides, granulocíticas, macrofágicas y megacariocíticas (Metcalf y col, 1979; Fauser y Messner, 1979). Estos precursores se sitúan en el esquema hematopoyético entre las células cepa pluripotentes y los precursores comprometidos hacia una línea hematopoyética determinada (Nakahata y Ogawa, 1982b).

Dentro del compartimiento de precursores comprometidos, los **precursores de la línea granulo-macrofágica** fueron los primeros en clonarse "in vitro" sobre una matriz semisólida (Bradley y Metcalf, 1966). Debido a que la existencia de este precursor se pone de manifiesto por su capacidad para formar colonias de granulocitos y macrófagos en cultivo "in vitro", se le conoce como Unidad Formadora de Colonias Granulo-Macrofágicas (CFU-GM), terminología que se emplea para todos los precursores hematopoyéticos clonados en cultivo.

El compartimiento de precursores granulo-macrofágicos está constituido por una población celular heterogénea, existiendo entre las células diferencias de tamaño, densidad, capacidad de automantenimiento y respuesta a estímulos (Metcalf y Mac Donald, 1975; Williams y Jackson, 1977; Bol y Williams, 1980).

A diferencia de las CFU-S, las CFU-GM poseen una capacidad de automantenimiento restringida, y una alta actividad proliferativa (Lajtha y col, 1969; Metcalf, 1972).

Las CFU-GM se originan de forma continuada a partir de las CFU-S (Wu y col, 1968), teniendo lugar esta transición mediante una secuencia continua de cambios, más que por un único suceso de determinación.

Las CFU-GM no pueden revertir a CFU-S, ni comprometerse hacia otra línea hematopoyética (Metcalf, 1980).

Los **precursores de la línea eritroide** constituyen, al igual que las CFU-GM, una población celular heterogénea, definiéndose según su estado de maduración tres precursores clonables: Unidad Formadora de "Burst" Eritroides primitiva (BFU-E p), que necesita un período de incubación de 8 días para su crecimiento, la Unidad Formadora de "Burst" Eritroides madura (BFU-E m) que crece en cultivo tras 4 días de incubación, y la Unidad formadora de Colonias Eritroides (CFU-e), que se

desarrolla a los dos ó tres días de cultivo, y que es el precursor más diferenciado (Gregory, 1976).

Las colonias BFU-E contienen células eritroides en distintos estadios de maduración. Mc Leod y col observaron que en las colonias BFU-E, ocasionalmente aparecían megacariocitos, lo que les hizo postular que los precursores eritroides conservaban una bipotencialidad eritroide-megacariocítica (Mc Leod y col, 1980). Sin embargo, ningún otro autor ha confirmado ésta hipótesis.

El cultivo de precursores megacariocíticos "in vitro" se desarrolló inicialmente en matriz semisólida (Metcalf y col, 1975), y posteriormente se describió un nuevo método para su clonaje, el "plasma clot" (Nakeff y Daniels-Mc Queen, 1976; Mc Leod y col, 1976). El cultivo de estos precursores da lugar a colonias que contienen células megacariocíticas reconocibles morfológicamente. En el caso del ratón, los megacariocitos poseen actividad acetilcolinesterasa (Jackson, 1973).

En la actualidad se acepta que la población de precursores megacariocíticos es heterogénea, habiéndose descrito hasta el momento tres precursores megacariocíticos diferenciables por su grado de maduración: BFU-MK (Unidad formadora de Burst Megacariocíticos), CFU-MK (Unidad formadora de Colonias Megacariocíticas) y LD-CFU-MK (Unidad formadora de colonias Megacariocíticas de baja densidad), si bien éste último únicamente ha sido descrito en roedores, no en humanos (Long y col, 1985; Chatelain y col, 1988).

Hoy se sabe que los precursores hematopoyéticos no están distribuidos de forma homogénea en la médula, existiendo una organización espacial definida, que refleja la dinámica de los procesos de diferenciación y proliferación seguidos por los distintos precursores hematopoyéticos (Lord, 1990).

La cantidad de CFU-S en la proximidad del hueso es 2,5 veces mayor que en el eje central de la médula. Las células cepa con menor capacidad de automantenimiento se localizan en la proximidad del hueso, mientras que las células cepa con mayor capacidad de automantenimiento se encuentran más cercanas al centro de la médula (Lord y Hendry, 1972). Esta diferencia de distribución en relación a las CFU-S, sugiere un movimiento dinámico de células que van abandonando la médula a través del seno venoso central.

Los precursores CFU-GM se encuentran concentrados a unos 120  $\mu\text{m}$  de la superficie del hueso (La distancia entre el eje central y el hueso es de 400  $\mu\text{m}$ ), mientras que las células granulocíticas en proceso de maduración, se encuentran próximas al eje medular (Lord y col, 1975; Lord y Testa, 1988).

Los precursores eritroides, presentan un patrón de distribución similar al de las CFU-GM (Frassoni y col, 1982). Los precursores más primitivos (BFU-E) se encuentran mayoritariamente a 180  $\mu\text{m}$  del hueso. A unos 40  $\mu\text{m}$  están localizadas las CFU-Mix.

La distribución espacial de los precursores hematopoyéticos dentro de la médula tiene una gran importancia práctica, tanto en clínica como en accidentes radiológicos, ya que debido al hueso la distribución de la dosis de radiación recibida en la médula no es uniforme.

### 1.1.2.- Regulación del sistema hematopoyético.

Para que el sistema hematopoyético se mantenga en homeostasis, ha de existir un equilibrio entre los procesos de diferenciación y los de automantenimiento. Un desplazamiento de este equilibrio en cualquiera de las dos direcciones, supone la aparición de procesos patológicos.

Asimismo, hay que tener en cuenta la enorme complejidad del sistema hematopoyético, ya que supone coordinar simultáneamente la producción de ocho líneas celulares principales, y regular todos los procesos de diferenciación, proliferación y maduración celular.

Hoy se sabe que la regulación de la hematopoyesis no sólo está controlada por componentes intrínsecos (dotación genética constitutiva), sino que los componentes extrínsecos (influjos microambientales) juegan un importante papel en la misma.

Son principalmente dos, los componentes extrínsecos implicados en la regulación de la hematopoyesis, que si bien se van a tratar por separado en esta introducción por razones de exposición, están estrechamente relacionados.

De los estudios de cultivo "in vitro" de precursores hematopoyéticos, se deduce que una parte importante del control de la hematopoyesis está mediada por un grupo de moléculas glicoprotéicas denominadas **factores de crecimiento hematopoyético** (Metcalf y Merchav, 1982; Heyworth y col, 1990b). Asimismo existen toda una serie de **inhibidores hematopoyéticos**, capaces de contrarrestar la acción de los factores de crecimiento (Lord y Wright, 1982; Axelrad, 1990).

Por otra parte, existen evidencias sobre asociaciones específicas entre células del **estroma** y focos de hematopoyesis, que han puesto de manifiesto el importante papel desempeñado por el estroma en la regulación hematopoyética (Dexter, 1982).

#### 1.1.2.1.- Factores de crecimiento hematopoyético.

La mayoría de los factores de crecimiento hematopoyético fueron identificados y posteriormente caracterizados y purificados, basándose en su capacidad para estimular la proliferación "in vitro" de células hematopoyéticas clonales. Es por ello que se les denominó Factores Estimulantes de Colonias (CSFs) (Metcalf, 1984).

El prefijo o sufijo que acompaña a las siglas CSF, hace referencia a la línea celular que es estimulada mayoritariamente por ese factor. Así, el GM-CSF es el factor que estimula mayoritariamente a precursores comprometidos hacia la línea granulomacrofágica.

Todos los CSFs caracterizados hasta el momento, al menos los de ratón, son glicoproteínas de peso molecular entre 23.000 y 70.000 y son activos a concentraciones muy bajas, del orden de  $10^{-11}$ - $10^{-13}$  M.

Todos ellos son producidos por más de un tipo celular, tienen una vida media en suero muy corta y muestran una especificidad relativa sobre una línea hematopoyética determinada. Parecen tener actividad biológica restringida a células hematopoyéticas, pero dentro de las distintas poblaciones algunos muestran actividad sobre diferentes tipos celulares, mientras que otros sólo ejercen su acción sobre una línea hematopoyética concreta (Figura 3).

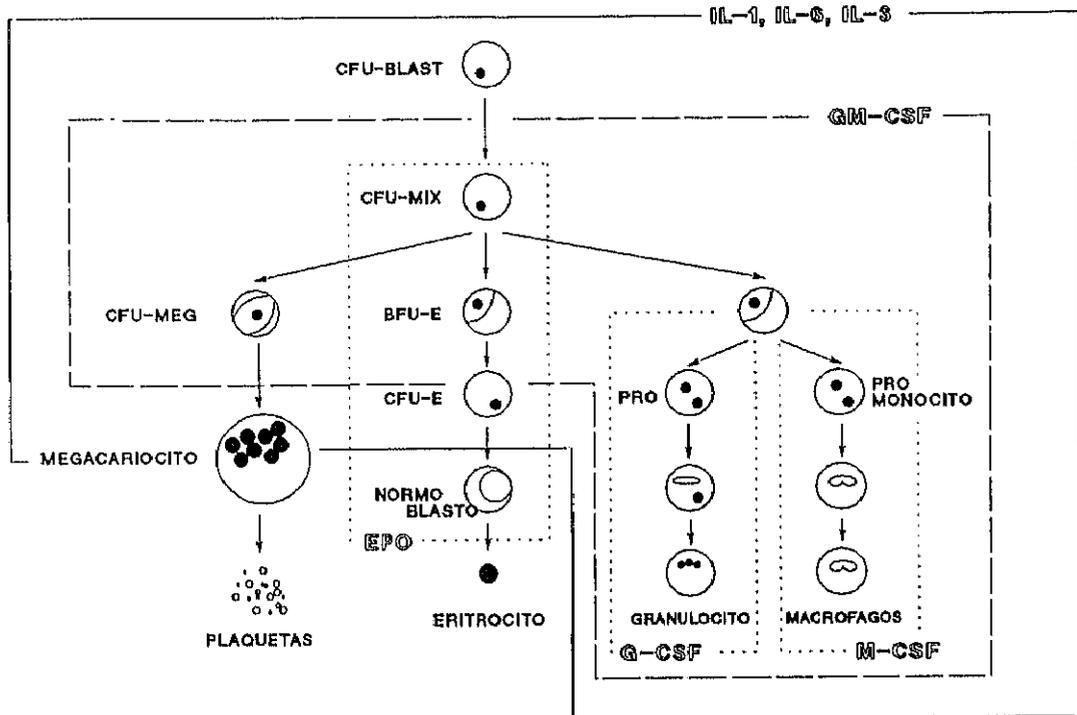
Existen receptores específicos para cada factor. Los precursores hematopoyéticos muestran en su superficie receptores para distintos factores (Keller y col, 1988).

Los CSFs no sólo son capaces de estimular la proliferación de precursores hematopoyéticos, sino que también son capaces de actuar a nivel de diferenciación, e incrementando la actividad funcional de las células maduras de la sangre. Ésto pone de manifiesto la relevancia que estos factores tienen en el caso de infecciones locales o reacciones a alérgenos, siendo de crucial importancia que los factores puedan ser producidos localmente por fibroblastos, células endoteliales, macrófagos o mastocitos (Wodnar-Fillipowicz y col, 1989).

No se conoce el mecanismo de acción completo de ningún CSF. A nivel bioquímico las células sobre las que actúa el factor sufren toda una serie de cambios. A nivel biológico es difícil pensar que exista un solo mecanismo que explique los diferentes efectos atribuibles a los CSFs. En el caso de la diferenciación, que es irreversible, una vez que ha tenido lugar no necesita la presencia de factores. Sin embargo en procesos de proliferación o de aumento de capacidad funcional es necesario que el factor esté presente de manera continuada. Ésto lo explican algunos autores basándose en el hecho de que los fenómenos de diferenciación son consecuencia de cambios genéticos, mientras que los procesos de proliferación y aumento de funcionalidad, se dan como consecuencia de la interacción de los factores estimulantes con elementos de la membrana celular (Pigoli y col, 1982).

Existe poca homología entre los factores estimulantes, lo que indicaría que han evolucionado de forma independiente. Sin embargo, hay que destacar que los genes que codifican para estos factores están localizados muy próximos. En humanos éstos se localizan en el cromosoma 5 dentro de la región q23-q33. En esta región, además de los genes que codifican la IL-3, GM-CSF y M-CSF, también se localiza el gen que codifica para el receptor del M-CSF (Huebner y col, 1985).

Es fácil concluir que alteraciones en estos genes serían cruciales en el desarrollo de enfermedades malignas. Así, se ha observado que pacientes con leucemia mieloblástica muestran deleciones en el cromosoma 5 (Clark y Kamen, 1987).



**Figura 3:** Papel de los Factores de Crecimiento Hematopoyético en la regulación del Sistema. (Griffin, 1988).

#### A.- Tipos de factores de crecimiento.

Los factores de crecimiento hematopoyéticos mayoritarios son: eritropoyetina (Epo), factor estimulante de colonias granulo-macrofágicas (GM-CSF), factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF), factor estimulante de colonias macrofágicas (M-CSF) y el multi-CSF ó IL-3. Recientemente se ha caracterizado un nuevo factor de crecimiento hematopoyético el factor estimulante de células cepa (SCF).

El clonaje de estas moléculas, mediante técnicas de ADN recombinante, ha permitido obtenerlas en cantidades suficientes como para poder profundizar, tanto en el estudio de sus propiedades como de sus posibles aplicaciones experimentales y clínicas (Metcalf, 1985; Metcalf, 1986; Clark y Kamen, 1987; Heyworth y col, 1990a).

Si bien los CSFs muestran un solapamiento en su acción sobre las células hematopoyéticas (Tabla I), sus células blanco siguen un esquema jerarquizado, que coincide con el esquema de jerarquías de las células del sistema hematopoyético.

FACTOR	CFU-Mix	CFU-GM	CFU-G	CFU-M	CFU-Eo	CFU-Meg	BFU-E	CFU-e
IL-3	+	+	+	+	+	+	+	±
GM-CSF	±	+	+	+	+	±	±	-
G-CSF	-	+	+	-	-	-	-	-
M-CSF	-	+	-	+	-	-	-	-
Epo	-	-	-	-	-	±	±	+

**Tabla I:** Acción solapada de los Factores de crecimiento sobre los precursores hematopoyéticos.

#### B.- Poblaciones "blanco" de los CSFs.

La **IL-3** actúa a nivel de precursores pluripotentes, muy indiferenciados dentro de la jerarquía del sistema hematopoyético, así como sobre precursores más comprometidos. Se ha descrito que estimula la supervivencia de las CFU-S "in vivo" y el crecimiento de CFU-Mix "in vitro" (Spivack y col, 1985).

El **SCF**, si bien no posee una fuerte actividad estimuladora por si mismo a nivel de células cepa mieloides y linfoides, cuando se combina con GM-CSF o IL-7 tiene un fuerte efecto sinérgico (Witte, 1990).

El **GM-CSF**, estimula principalmente precursores granulo-macrofágicos (CFU-GM), pero también puede estimular CFU-Eo y en cierta medida CFU-Mix, cuando las concentraciones de factor presentes son elevadas. El GM-CSF estimula asimismo precursores eritroides y megacariocíticos (Metcalf y col, 1980).

El **G-CSF**, estimula el desarrollo de neutrófilos a partir de precursores granulocíticos (Metcalf y Nicola, 1983), aunque en presencia de otros factores actúa sinérgicamente, permitiendo el crecimiento de células de otras líneas hematopoyéticas (Heyworth y col, 1988).

El **M-CSF**, estimula la división y proliferación de los precursores granulo-macrofágicos (CFU-GM) hacia macrófagos. Igual que el G-CSF, el M-CSF sinergiza con otros factores (Golde, 1990).

La **eritropoyetina** es imprescindible para que los precursores eritroides (BFU-E y CFU-e) completen su maduración, si bien en el caso de precursores eritroides más inmaduros (BFU-E) es necesaria la presencia de otros factores (IL-3 y GM-CSF) para que estos proliferen "in vitro" dando lugar a colonias eritroides (Eaves y Eaves, 1978).

Una gran variedad de biorreguladores (IL-1, IL-4, IL-5 e IL-6) también influyen en el crecimiento y diferenciación de los precursores hematopoyéticos. Aunque sólo la IL-5 es capaz de inducir la formación de colonias "in vitro" a partir de precursores eosinófilos (Clutterbuck y Sanderson, 1988), todos ellos pueden actuar de forma sinérgica con los CSFs para estimular y modular la producción celular. Por ejemplo la IL-1 sinergiza tanto con M-CSF induciendo la diferenciación y proliferación de las células cepa hacia macrófagos (Stanley y col, 1986), como con G-CSF, IL-3 ó GM-CSF (Moore y Warren, 1987).

#### C.- Células productoras de CSFs.

La IL-3 es producida "in vitro" por células T activadas y por determinadas líneas celulares de leucemia mielomonocítica. "In vivo", sin embargo, no ha podido ser detectada ni siquiera en animales en los que se está produciendo una respuesta de las células T a antígenos (Garland y col, 1983). Un fenómeno similar se ha descrito para la IL-2. Puesto que la IL-3 y la IL-2 actúan estimulando la proliferación de células cepa y células-T respectivamente, no es de extrañar que su producción esté estrechamente limitada e incluso que estén sometidos a un control local.

Es de destacar que no han podido encontrarse niveles detectables de mRNA para IL-3 en estroma medular "in vitro", en condiciones en las que la hematopoyesis se está manteniendo por largos períodos de tiempo (Spooncer y col, 1986). Tampoco se ha podido detectar en estos sistemas, proteína biológicamente activa.

El GM-CSF se ha podido detectar en suero, pudiéndose obtener moléculas biológicamente activas a partir de cultivos a corto plazo de diferentes tejidos (Nicola y col, 1979). Se ha descrito, que los mayores cambios en los niveles de GM-CSF circulante se obtienen tras una infección bacteriana o una inyección de endotoxina bacteriana. El GM-CSF "in vitro" puede ser producido por células-T, fibroblastos y células endoteliales estimuladas adecuadamente, poniendo de nuevo de manifiesto el importante papel desempeñado por este factor en la regulación de la respuesta de células maduras a infecciones.

Células del estroma medular, cultivadas "in vitro", son capaces de producir niveles detectables de GM-CSF, indicando que este factor debe jugar algún papel en la hematopoyesis medular (Quesenberry, 1986; Gualtieri y col, 1986).

El G-CSF y M-CSF también son detectables "in vivo", y al igual que el GM-CSF pueden ser producidos "in vitro" por diferentes tipos celulares, incluyendo células del estroma medular. Las células del estroma medular también son capaces de producir IL-4 (Quesenberry, 1986). Así, las células estromales del microambiente medular disponen de la maquinaria necesaria para sintetizar una serie de moléculas reguladoras: GM-CSF, G-CSF, M-CSF e IL-4, pero no la IL-3.

#### D.- Inhibidores hematopoyéticos.

Si bien la existencia de factores de crecimiento hematopoyético no ha sido nunca discutida, la presencia de inhibidores ha sido cuestionada durante muchos años.

Hoy se acepta que los inhibidores están estructuralmente próximos a los CSFs, interfiriendo en la producción o acción de éstos, actuando mediante mecanismos de regulación "feedback".

Se han descrito dos moléculas inhibitoras a nivel de las células cepa. Una de ellas de alto peso molecular (50-100 Kd) (Lord y Wright, 1984), que actúa sobre poblaciones de CFU-S altamente purificadas, sugiriendo su acción directa sobre estos precursores.

El otro inhibidor de células cepa descrito, posee bajo peso molecular, ha sido aislado de médula de ternera fetal, e inhibe la entrada de las CFU-S en fase de síntesis (Frindel y Guigon, 1977). Recientemente se ha demostrado su acción "in vivo" como inhibidor de procesos de proliferación (Lenfant y col, 1989).

Recientemente se ha purificado un compuesto derivado de macrófagos, que inhibe de forma reversible la proliferación de las células cepa, denominado SCI (stem cell inhibitor). Ensayos de inhibición con anticuerpos y la secuencia del SCI, han puesto de manifiesto que este factor es idéntico a una citoquina previamente descrita, el MIP-1a (proteína inflamatoria de macrófagos). Las actividades biológicas del SCI/MIP1a sugieren que es un regulador negativo primario de la proliferación de las células cepa hematopoyéticas (Graham y col, 1990).

En la actualidad se están realizando estudios con estos inhibidores en células humanas, debido a la gran aplicación clínica que tendrían, por su capacidad de proteger la médula durante tratamientos antitumorales (Dexter y White, 1990).

Se han descrito una gran variedad de moléculas que inhiben directa o indirectamente la granulopoyesis. Todas estas moléculas tienen una serie de características en común como son, la naturaleza química (generalmente son glicoproteínas), su complejo modo de acción (el cual puede ser altamente dependiente del microambiente y no está restringido a la granulopoyesis), sus interacciones con factores de crecimiento, su posible sinergismo y la falta de datos en relación a su papel fisiológico. Entre los

inhibidores de la granulopoyesis cabe destacar la ferritina ácida, interferón- $\alpha$  y  $\gamma$ , prostaglandinas y factor de necrosis tumoral (Guigon y Najman, 1988).

Existen también inhibidores de la granulopoyesis de bajo peso molecular. A partir de médula murina, se ha obtenido un pentapéptido que es un fuerte inhibidor de CFU-GM humanas y murinas "in vitro" y de CFU-GM, CFU-S y granulocitos periféricos "in vivo" (Laerum y Paukovits, 1984).

Se ha descrito un inhibidor específico de las BFU-E, una glicoproteína neutra capaz de reducir de manera reversible la proporción de precursores BFU-E que se encuentran en fase de síntesis, sin afectar a las CFU-S, CFU-GM o CFU-e. Los niveles de este inhibidor en la médula parecen estar regulados por mecanismos de control genético, de desarrollo y fisiológicos (Axelrad, 1990).

Otras moléculas son capaces de inhibir las BFU-E pero su acción no es específica de éstas. Entre ellas podemos citar al factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , TGF $\beta$  ("Transforming Growth Factor) e interferón- $\alpha$  y  $\gamma$  (Del Rizzo y col, 1990).

Los factores implicados en la regulación negativa de los megacariocitos son poco conocidos. Se sabe que el interferón- $\alpha$  y  $\gamma$  inhiben el desarrollo de CFU-Meg, aunque el interferón  $\gamma$  requiere la presencia de células accesorias (Guigon y Najman, 1988).

#### 1.1.2.2.- Estroma hematopoyético.

Aunque el crecimiento "in vitro" de colonias a partir de precursores comprometidos hematopoyéticos sólo depende de la adición de moléculas estimuladoras, la hematopoyesis que se desarrolla "in vivo" tiene lugar dentro de un microambiente altamente estructurado en donde están presentes células del estroma, no hematopoyéticas.

Durante muchos años se ha intentado clarificar, hasta que punto las células del estroma constituyan un simple soporte en donde se localizaban las células hematopoyéticas, respondiendo éstas a estímulos externos, o si por el contrario el estroma jugaba un papel determinante en el desarrollo y la regulación de la hematopoyesis.

Las evidencias de que las células del estroma que forman el microambiente hematopoyético juegan un papel directo o indirecto en la regulación de la hematopoyesis, proceden de diversas líneas de investigación:

- Ratones mutantes. Se han producido cepas de ratón con mutaciones en los loci W y Steel del cromosoma 5 y 10 respectivamente (W/Wv y Sl/Sl), que se caracterizan por tener una anemia macrocítica. En cada una de las cepas la anemia tiene distinto origen. En la cepa W/Wv, el microambiente hematopoyético es normal, pero tienen un defecto en la población de células cepa, lo

que conduce a que no haya CFU-S (Mc Culloch y col, 1964). La anemia de estos animales puede curarse si se les hace un trasplante de médula que contenga células cepa normales.

Los ratones mutantes Sl/Sl<sub>d</sub> poseen una población de células cepa normal, pero el estroma hematopoyético es defectivo (Mc Culloch y col, 1965). La anemia no puede curarse con un trasplante de médula, es necesario implantar a estos animales un microambiente adecuado (bazo de un ratón normal), que pueda ser colonizado por células cepa del receptor.

Los estudios realizados con estas cepas mutantes de ratón, demostraban que son necesarias tanto una población de células cepa como un estroma normal para que tenga lugar una hematopoyesis correcta (Dexter y Moore, 1977).

- Cultivo de larga duración de médula ósea (LTBMC). La puesta a punto de técnicas de cultivo "in vitro" de precursores hematopoyéticos pluripotentes o comprometidos, fue un paso decisivo para el conocimiento de la estructura del sistema hematopoyético. Sin embargo, estos ensayos no permiten el estudio de los mecanismos de control que acontecen "in vivo" para que el sistema hematopoyético mantenga su homeostasis, ya que durante el período que dura el cultivo las células van perdiendo gradualmente su potencial proliferativo, de tal manera que tras 7-14 días, en el cultivo ya sólo pueden encontrarse células maduras.

Gracias al desarrollo del cultivo de larga duración de médula ósea (Dexter y Lajtha, 1974), se pudo demostrar la importancia del estroma en la regulación hematopoyética (Dexter y col, 1984).

En el cultivo descrito por Dexter, sobre una capa adherente establecida, tiene lugar la proliferación y mantenimiento de las CFU-S. Estas CFU-S se diferencian en el cultivo hacia células granulocíticas (Williams y col, 1977), precursores eritroides (Testa y Dexter, 1977; Dexter y col, 1981), y bajo condiciones apropiadas hacia megacariocitos, plaquetas (Williams y col, 1978) y precursores linfoides (Jones-Villeneuve y Philips, 1980).

La necesidad de un estroma funcional para que pueda mantenerse la hematopoyesis se puso de manifiesto en varios estudios realizados: (1) Cuando las células de médula se cultivaban en placas siliconizadas, que inhiben la adherencia de las células, no se mantenía la hematopoyesis (Dexter y col, 1977). (2) Las células del estroma de otros órganos, incluido el bazo, no eran capaces de mantener la hematopoyesis (Reimann y Burger, 1979). (3) La médula de ratones Sl/Sl<sub>d</sub> que tienen un microambiente defectivo, no era capaz de formar una capa adherente funcional que mantuviera la hematopoyesis en LTBMC. Aunque la capa formada no era funcional, mostraba una morfología

normal, lo que llevó a pensar que el defecto de la capa residía en la falta de interacción célula-célula.

- Implante ectópico de médula. El implante ectópico de médula ósea bajo la cápsula renal, tiene como consecuencia la formación de un osículo que contiene médula activa. En este caso, el estroma que se desarrolla es del animal donador, mientras que las células hematopoyéticas provienen del receptor. Así, la capacidad funcional de ese estroma se mediría directamente por el número de precursores asentados en él (Schofield, 1986b; Molineux y col, 1987).

El estroma interviene en la regulación del sistema hematopoyético a través de tres vías fundamentales:

- A.- Interacción entre células del estroma y células hematopoyéticas.
- B.- A través de la matriz extracelular.
- C.- Liberando factores de crecimiento hematopoyéticos.

A.- Interacción célula del estroma-célula hematopoyética.

El hecho de que las interacciones célula-célula fueran importantes para el mantenimiento de la hematopoyesis, se puso de manifiesto al observar que si en un cultivo de larga duración de médula, se aislaban las células hematopoyéticas de la capa de estroma utilizando cámaras de difusión, la hematopoyesis decaía rápidamente (Bentley, 1981).

Mediante estudios morfológicos "in situ" de la médula ósea (Lichtman, 1981) y análisis "in vitro" de clones de células estromales (Zipori y col, 1985), se ha podido determinar la gran heterogeneidad del estroma medular. La complejidad mostrada por las poblaciones celulares del estroma, hace difícil el estudio de las interacciones concretas que tienen lugar entre las células hematopoyéticas y las células del estroma.

Por ello, la aproximación experimental seguida para el estudio de interacciones célula-célula, es la de utilizar líneas establecidas de células estromales, capaces de mantener la hematopoyesis "in vitro" durante largos períodos de tiempo (Kodama y col, 1984; Hunt y col, 1987; Whitlock y col, 1987; Itoh y col, 1989).

La mayoría de las líneas estromales establecidas se han obtenido a partir de cultivos de larga duración de médula ósea, eliminando las células cepa hematopoyéticas, por ejemplo mediante irradiación (Dexter y col, 1977; Johnson y Dorshkind, 1986).

Se ha observado, que es necesaria la existencia de una interacción entre las células del estroma y las células cepa para que éstas puedan mantenerse "in vitro" por largos períodos de tiempo (Coulombel y col, 1981).

Si se añaden CSFs a un cultivo de larga duración, tiene lugar una maduración de las células cepa, sin embargo, aquellas células cepa que están en íntimo contacto con la capa de estroma, se encuentran protegidas del efecto de los CSFs, no siendo inducidas a diferenciar. Ésto, apoya la hipótesis de "nicho hematopoyético" propuesto por Schofield (Schofield, 1978).

Los "nichos" representan dominios reguladores de células cepa. Así, la médula estaría compartimentalizada en unidades funcionales altamente delimitadas, poniéndose de manifiesto la gran importancia de la existencia de interacciones entre células cepa y células del estroma. Si las células cepa pierden el contacto con el estroma, abandonando el "nicho hematopoyético", quedan expuestas a toda una serie de influjos microambientales, capaces de inducir la diferenciación de las células cepa.

#### B.- Matriz extracelular.

El estroma medular está compuesto por diferentes poblaciones celulares (macrófagos, células reticulares, células endoteliales etc.), así como por matriz extracelular.

Los componentes más estudiados de la matriz extracelular son los **proteoglicanos**. Los proteoglicanos son sintetizados por células de tejidos hematopoyéticos, y principalmente por células del estroma (Minguell y Tavassoli, 1989). Una vez sintetizadas, estas moléculas migran a la membrana celular permaneciendo allí durante un período de tiempo, transcurrido el cual son liberados al espacio extracelular.

El interés sobre estas moléculas surgió al observarse que ciertos proteoglicanos estaban localizados en áreas concretas del bazo, en donde estaba teniendo lugar una fuerte actividad hematopoyética (Mc Cuskey y col, 1972).

Los proteoglicanos están implicados en la regulación de procesos de crecimiento y diferenciación, principalmente del sistema hematopoyético (Gordon y col, 1987; Bentley y col, 1988). De hecho, se ha observado que el glicosaminoglicano **heparán sulfato**, puede unir de forma selectiva factores de crecimiento hematopoyéticos, presentándose después a los precursores (Roberts y col, 1988).

Otra proteína bien caracterizada de la matriz extracelular, la **hemonectina**, está implicada en procesos de unión específica de granulocitos durante el desarrollo tanto fetal como post-natal (Campbell y col, 1987; Peters y col, 1990).

Los procesos de maduración de precursores de la línea eritroide están asociados con cambios en los receptores de **fibronectina** (Vuillet-Gaugler y col, 1990), indicando el papel que ésta juega en la regulación de células eritroides.

Los precursores hematopoyéticos sintetizan niveles altos de **condroitín sulfato**, el cual se postula que interviene favoreciendo la unión precursores-células del estroma (Zuckerman y Wicha, 1983).

### C.- Liberación de factores de crecimiento hematopoyético.

Se ha descrito que las células del estroma de cultivo de larga duración de médula ósea producen CSFs (Heard y col, 1982; Gualtieri y col, 1982; Shaddock y col, 1983).

Cabe pensar que los factores de crecimiento hematopoyético son producidos localmente por células del estroma, uniéndose inmediatamente a receptores de membrana de precursores cercanos. El factor unido al receptor se internaliza posteriormente en el precursor (Tushinski y col, 1982).

La producción de factores de crecimiento hematopoyético podría estar regulada de tal manera, que sólo se produjese la cantidad de factor necesaria para saturar los receptores presentes en los precursores, lo que explicaría el hecho de que no se encuentren concentraciones altas de estos factores en los sobrenadantes de los cultivos de larga duración de médula ósea (Tavassoli y col, 1990).

## 1.2.- **EFFECTO DE LA RADIACION SOBRE EL SISTEMA HEMATOPOYE- TICO.**

### 1.2.1.- **Síndromes causados por la radiación.**

Dentro de las múltiples clasificaciones que pueden establecerse sobre los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes, la división entre **efectos estocásticos** y **efectos deterministas** tiene para nosotros especial interés, al permitirnos delimitar nuestro campo de trabajo. La distinción entre ambos tipos de efectos atiende a la naturaleza del daño producido. Así, los efectos deterministas se definen como aquellos cuya gravedad es función de la dosis de radiación recibida y en los cuales existe una dosis umbral, por debajo de la cual no se manifiestan efectos.

En este grupo se incluyen los diferentes síndromes de radiación. El primero de ellos, el **Síndrome del Sistema Nervioso Central**, se produce tras dosis muy elevadas de radiación (10-15 Gy). La muerte del individuo tiene lugar pocas horas después de la

exposición a la radiación, como consecuencia de un daño cardiovascular y neurológico severo.

Lógicamente con estas dosis no sólo se ve afectado el sistema nervioso central. Otros, como el sistema gastrointestinal o el sistema hematopoyético, también sufren un daño severo que les conducirá a una disfunción. Sin embargo, al producirse la muerte en un período de tiempo muy corto, estos efectos no llegan a ponerse de manifiesto (Hall, 1973).

Con dosis de radiación inferiores (5-10 Gy) la muerte del individuo tiene lugar a los pocos días, como consecuencia del **Síndrome Gastrointestinal**.

La radiación, al afectar a las células cepa de las criptas del epitelio intestinal, reduciendo su número, disminuye el aporte de nuevas células maduras conduciendo, en último término, a la despoblación del tracto gastrointestinal y por tanto a la muerte del individuo (Hall, 1973).

Por último, con dosis moderadas de radiación (2-10 Gy) se produce el denominado **Síndrome Hematopoyético o de la Médula ósea**.

El síndrome hematopoyético se caracteriza por una aplasia parcial o total del tejido hematopoyético, dependiendo de la dosis de radiación recibida, provocando la muerte del individuo en un período de tiempo no superior a los 60 días.

La pérdida de precursores hematopoyéticos, tanto pluripotentes como comprometidos, produce un descenso en el número de células maduras en sangre periférica, lo que conlleva la aparición de infecciones oportunistas, deterioro del sistema inmune, etc. (Hendry, 1985; Schofield, 1986a).

### 1.2.2.- Sensibilidad de los precursores hematopoyéticos a radiaciones ionizantes.

La sensibilidad de los precursores hematopoyéticos, en términos de pérdida de su capacidad de proliferación, se determina mediante las llamadas curvas de supervivencia. En radiobiología se utilizan, entre otros, dos parámetros para describir las curvas de supervivencia celular,  $D_0$  y  $n$ , ambos característicos del conocido modelo multiblancos simple impacto (Silini, 1975).

$D_0$  viene determinada por la pendiente de la zona exponencial de la curva, e indica la dosis de radiación requerida para reducir la supervivencia a un 37% en la zona exponencial.  $n$ , número de extrapolación, está relacionado con la capacidad de acumular y reparar daño subletal.

Desde hace tres décadas, cuando Till y Mc Culloch determinaron por primera vez la radiosensibilidad de las CFU-S (Till y Mc Culloch, 1961), se han realizado numerosas determinaciones de los parámetros  $D_0$  y  $n$ , de distintos precursores hematopoyéticos y en muy distintas condiciones de experimentación.

De estos trabajos se deduce que la supervivencia de las CFU-S no es dependiente de la cepa de ratón, que se ve poco afectada por la tasa de dosis, y que sin embargo es dependiente del tipo de radiación utilizado ( $D_0=1,0$  Gy para rayos  $\gamma$  y  $0,77$  Gy para rayos X).

La radiosensibilidad también se ve afectada por el órgano origen de la población de CFU-S (Las CFU-S de hígado fetal se muestran más radio-resistentes ( $D_0=1,5$  Gy) que las CFU-S de bazo y médula ósea), y por la fase del ciclo celular en la que se encuentre la CFU-S (Hendry, 1972).

En cuanto a la radiosensibilidad de los precursores comprometidos, mientras que los precursores eritroides tienen una sensibilidad similar a la de las CFU-S ( $D_0=0,74$  Gy, rayos-X), los precursores de la línea granulo-macrofágica son más radioresistentes ( $D_0=1,8$  Gy) (Wagemaker y col, 1979; Hendry, 1985; Imai y Nakao, 1987).

Estudios realizados en humanos, muestran que sus CFU-GM tienen una radiosensibilidad muy parecida a las CFU-GM de ratón (Testa y col, 1985).

### 1.2.3.- Recuperación hematopoyética espontánea tras una irradiación.

Siempre que la irradiación no suponga la desaparición de todas las células cepa hematopoyéticas del individuo, lo que sólo ocurre a dosis muy elevadas (superiores a  $15$  Gy), la población de CFU-S superviviente comienza tras  $24$  ó  $48$  horas a repoblar su compartimiento, con un tiempo medio de duplicación de  $28$  horas en el fémur y de  $16$  horas en el bazo, para dosis de radiación superiores a  $3,0$  Gy (Lajtha y col, 1971). Cuanto menor sea la dosis de radiación, mayor será el tiempo medio de duplicación. El tiempo medio de duplicación de  $28$  horas es similar al que poseen las CFU-S no irradiadas, trasplantadas a un receptor primario y probablemente representan los valores óptimos para situaciones de repoblación hematopoyética.

Después de la fase regenerativa, las CFU-S alcanzan valores próximos al control, sin que existan evidencias de superación de los valores normales, ni en bazo ni en fémur. Este comportamiento sugiere la ausencia de daño residual en la CFU-S tras la irradiación. A este respecto existen opiniones contradictorias. Algunos autores han descrito una menor capacidad de la CFU-S tras una irradiación para regenerar la hematopoyesis de ratones receptores previamente irradiados (Croizat y col, 1970). Asimismo, en ratones irradiados con dosis de  $5,0$  Gy se ha descrito que las CFU-S

30 días después de la irradiación se encuentran por debajo de los valores control (50% del valor control) (Grande y col, 1990).

En relación a las CFU-GM, tres días después de la irradiación (4,5 Gy), los valores de estos precursores son incluso inferiores a los de la CFU-S, lo que sugiere que la recuperación de las CFU-GM se inicia una vez se ha disparado la recuperación de las CFU-S (Testa y col, 1974).

Durante el período de regeneración, las curvas de CFU-GM y CFU-S muestran perfiles muy semejantes. Sin embargo, al ser el tiempo de duplicación de las CFU-GM (24 horas) ligeramente inferior al de las CFU-S (28 horas), los precursores CFU-GM alcanzan sus valores normales antes que las CFU-S.

En bazo, los patrones de recuperación son diferentes. Cinco días después de una irradiación con 4,5 Gy, los valores de CFU-GM en bazo se encuentran un orden de magnitud por encima de las CFU-S, y en el día 15 post-irradiación los niveles son superiores a los normales, si bien vuelven lentamente a los valores control en días posteriores (Testa y col, 1974).

Respecto a los precursores de la línea eritroide, estos descienden al 50% del valor control tras 1,5 Gy, recuperándose posteriormente hasta superar los valores control los días 7-10, período en el que los valores de CFU-S aún son subóptimos (Hendry y Lord, 1983; Testa y col, 1985). Esto demuestra la existencia de procesos de amplificación extra por parte de los precursores eritroides, para asegurar que los niveles de eritrocitos en sangre van a ser los adecuados incluso aunque los niveles de CFU-S estén disminuídos.

#### 1.2.4.- **Terapia hematopoyética.**

Lógicamente, aunque el sistema hematopoyético tiene una cierta capacidad intrínseca de recuperación, ésta no es suficiente en casos en los que una gran parte de los precursores hematopoyéticos han sido esterilizados proliferativamente por un agente citotóxico, lo que ha hecho necesario desarrollar toda una serie de terapias de apoyo.

Este es el caso del **trasplante de médula ósea**, aunque por su complejidad y agresividad puede no resultar siempre el más adecuado a aplicar. Así, hay que tener en cuenta los riesgos de rechazo injerto contra huésped y las limitaciones de encontrar un donante adecuado, así como la edad de los receptores (Blume, 1986).

Al ser la aparición de infecciones oportunistas y de hemorragias una de las causas principales de muerte tras la irradiación, se intentó solventar este problema mediante **transfusiones**. Los resultados alcanzados con estas terapias no han sido muy

satisfactorios para el caso de granulocitos, aunque resultan temporalmente eficaces para eritrocitos y plaquetas.

En los últimos años, la investigación en este campo ha ido fundamentalmente dirigida al estudio de compuestos capaces de proteger y/o estimular a los precursores hematopoyéticos pluripotentes que sobreviven a la irradiación, acelerando de esta manera la recuperación hematopoyética, y por tanto disminuyendo el riesgo de aparición de infecciones oportunistas y hemorragias (Neta y Oppenheim, 1988; Butturini y col, 1988).

### **1.3.- MODIFICADORES DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA.**

Los modificadores de la respuesta biológica (MRB) han sido definidos como "agentes capaces de modificar la relación entre un tumor y su huesped, mediante la manipulación de la respuesta biológica de éste hacia las células tumorales, consiguiendo resultados terapéuticos efectivos".

En base a los conocimientos actuales, se acepta que los MRB pueden actuar de dos formas bien definidas. De una parte, como potenciadores de las funciones antitumorales de algunas células del sistema inmune, y por otra, restaurando las poblaciones celulares afectadas por los tratamientos clásicos de quimio- y radio-terapia. Nuestro interés se centra en éste último punto.

Una de las limitaciones en el uso de tratamientos antitumorales se encuentra a nivel del tejido hematopoyético. La gran sensibilidad de éste conduce a estados patológicos de linfopenia, granulocitopenia y trombopenia, tras la quimio- radio-terapia. Aquellas drogas que estimulen o protejan el sistema hematopoyético van a permitir un tratamiento antitumoral más drástico y por tanto más eficaz, ya que la eficacia está directamente relacionada con la intensidad del tratamiento aplicado.

Debido al gran número de MRB descritos hasta el momento, es difícil su clasificación, basándose ésta según los autores en su naturaleza química, sus propiedades o su mecanismo de acción.

#### **1.3.1.- Factores de crecimiento hematopoyético.**

Debido a que los factores de crecimiento hematopoyético, y en concreto CSFs e ILs, estimulan la proliferación de células cepa hematopoyéticas "in vitro" (Apartado

1.1.2.1), se ha despertado un gran interés en su potencial aplicación para acelerar la recuperación hematopoyética después de tratamientos de quimio- radio-terapia.

En la actualidad, la mayoría de los factores de crecimiento hematopoyético descritos han sido clonados, y por tanto se dispone de ellos en forma recombinante (rIL-3, rGM-CSF, rG-CSF, rM-CSF, rIL-1, SCF).

Los estudios sobre estos factores han abarcado desde trabajos en animales de experimentación (ratones, perros y monos), hasta su aplicación clínica en humanos sometidos a tratamientos antitumorales (Testa y Dexter, 1989; Glaspy y Golde, 1990), incluyendo también accidentes radiológicos como el de Brasil (Butturini y col, 1988) o Chernobil (Gale y Butturini, 1990).

#### 1.3.1.1.- Interleuquina 3 (IL-3).

La IL-3 con un rango de actividad mayor que el descrito para otros CSFs, parece ser el estimulador más eficaz de la trombopoyesis (Leary y col, 1987).

Ratones normales tratados con IL-3, muestran un incremento de precursores pluripotentes y comprometidos en bazo, si bien en la médula ósea el número de estos precursores disminuye (Kindler y col, 1986). Este hecho puede ser debido a una migración de precursores hematopoyéticos desde la médula hacia el bazo como consecuencia del tratamiento con IL-3 (Lord y col, 1986).

El valor de células maduras en sangre periférica está incrementado en ratones tratados con IL-3, observándose incremento de monocitos, neutrófilos y eosinófilos.

En ratones sometidos a dosis subletales de radiación, la IL-3 es capaz de incrementar significativamente los niveles de precursores hematopoyéticos. Sin embargo, no se ha observado incremento en la supervivencia de ratones irradiados con dosis potencialmente letales, como consecuencia del tratamiento con IL-3.

Estudios clínicos realizados recientemente (Ganser y col, 1990) apuntan que la IL-3 es capaz de estimular la mielopoyesis, trombopoyesis y en menor grado la eritropoyesis en pacientes con mielosupresión medular.

#### 1.3.1.2.- Factor estimulante de colonias granulo-macrofágicas (GM-CSF).

El GM-CSF ha sido, junto con el G-CSF, el factor de crecimiento hematopoyético más utilizado en ensayos clínicos y en accidentes nucleares.

El factor GM-CSF si bien actúa preferentemente sobre los precursores de la línea granulo-macrofágica, se ha observado que tiene un amplio rango de acción.

Estudios realizados en animales de experimentación, ponen de manifiesto el efecto estimulador del GM-CSF sobre la mielopoiesis. Los niveles de precursores pluripotentes y comprometidos se ven fuertemente aumentados en el bazo, si bien a nivel de médula ósea hay una bajada significativa de éstos (Metcalf y col, 1987). A nivel de células maduras, los granulocitos y los macrófagos aumentan su actividad funcional como consecuencia del tratamiento con GM-CSF (Metcalf, 1986).

Recientemente se ha descrito, que el GM-CSF juega un papel regulador en la trombopoyesis "in vitro", si bien este efecto no se reproduce "in vivo" (Ishibashi y col, 1990).

El GM-CSF cuando se administra 1 día antes ó 1 día después de una irradiación potencialmente letal, muestra una ligera actividad radioprotectora, con incrementos en la supervivencia de los animales del 30% (Talmadge y col, 1989). La administración de GM-CSF a animales sometidos a dosis de radiación subletales, acelera la recuperación hematopoyética en los mismos (Neta y Oppenheim, 1988).

Estudios realizados tanto en animales de experimentación como en humanos, muestran que el GM-CSF es capaz de reducir el período de neutropenia que sigue a tratamientos de quimio- radio-terapia (Mayer y col, 1987; Vadham-Raj y col, 1990). Puesto que los neutrófilos son fundamentales en la defensa del individuo frente a infecciones microbianas, el GM-CSF se presenta como posible agente terapéutico para disminuir el riesgo de infecciones oportunistas, tan frecuentes tras tratamientos antitumorales. Distintos autores han confirmado esta posibilidad, mostrando que la administración de GM-CSF reduce la incidencia de infecciones en pacientes mielosuprimidos (Vadham-Raj y col, 1987), y en ratones sometidos a trasplante de médula ósea (Bleiberg y col, 1990).

El GM-CSF no sólo es capaz de aumentar los niveles de neutrófilos, sino que también incrementa los valores de monocitos y eosinófilos en pacientes con anemia aplásica o SIDA (Clark, 1988; Champlin y col, 1989).

Este factor también ha sido aplicado en pacientes sometidos a trasplante autólogo de médula ósea, con objeto de acelerar la recuperación hematopoyética en estos pacientes (Nemunaitis, 1988).

Si bien en la mayoría de los estudios clínicos el GM-CSF ha sido administrado por vía intravenosa, sus efectos son muy similares si se administra subcutáneamente. La toxicidad producida por este CSF parece ser dosis dependiente.

#### 1.3.1.3.- Factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF).

El G-CSF "in vitro" estimula la proliferación y diferenciación de precursores hacia neutrófilos. "In vivo", se ha confirmado este mismo efecto en ratones (Souza, 1990),

hamsters (Cohen y col, 1987), primates no humanos (Welte y col, 1987) y humanos (Bronchud y col, 1988).

A nivel de precursores hematopoyéticos, el tratamiento "in vivo" con G-CSF produce una reducción de éstos en la médula, si bien los valores en bazo se ven fuertemente incrementados en ratones tratados con el factor (Metcalf y Nicola, 1983; Pojda y col, 1990). Aunque no está claro si el aumento observado en la hematopoyesis esplénica, es consecuencia de una migración de precursores desde la médula, ésta es la hipótesis más aceptada.

Recientemente se ha obtenido un G-CSF mutante, por delección de distintas secuencias de aminoácidos, denominado KW-2228, el cual presenta mayor actividad estimuladora que el rG-CSF, a dosis subóptimas (Okabe y col, 1990).

El G-CSF posee capacidad radioprotectora. La administración "in vivo" de G-CSF, eleva de manera significativa la supervivencia de ratones irradiados con dosis potencialmente letales (Uckun y col, 1990; Tanikawa y col, 1990). Este efecto es fuertemente dependiente de la dosis, no presentando actividad radioprotectora a dosis bajas (0,02 - 2  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ ). Sin embargo, dosis altas (40  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ ) administradas antes de la irradiación, producen un incremento significativo de la supervivencia en ratones irradiados. Si el G-CSF se administra después de la irradiación no induce radioprotección (Neta y Oppenheim, 1988).

El G-CSF no sólo es capaz de aumentar la supervivencia del animal tras dosis altas de radiación, sino que también se ha observado que el tratamiento con G-CSF de ratones irradiados subletalmente, provoca una recuperación hematopoyética más rápida. Esta recuperación se pone de manifiesto a nivel de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, así como a nivel de precursores pluripotentes y comprometidos de médula ósea (Patchen y col, 1990).

En clínica, el G-CSF ha sido utilizado en todos aquellos casos en los que era necesaria una recuperación rápida de los neutrófilos. Se han observado reducciones en los períodos de neutropenia, como consecuencia del tratamiento con G-CSF, en pacientes que habían recibido tratamientos severos de quimioterapia, en enfermos con neutropenia congénita, leucemia, síndromes mielodisplásicos o SIDA (Masaoka y col, 1989; Negrin y col, 1990).

#### 1.3.1.4.- Factor estimulante de colonias macrofágicas (M-CSF).

El M-CSF estimula a los macrófagos para que éstos liberen factor de necrosis tumoral (TNF) e interleuquina 1 (IL-1). Estas interleuquinas son mediadores, "in vivo", de la liberación de GM-CSF, IL-3 y G-CSF en los tejidos, por lo que se piensa que el M-CSF debe actuar de manera indirecta incrementando el contenido de neutrófilos.

En pacientes sometidos a quimio-terapia o con neutropenia crónica, el tratamiento con M-CSF produce un incremento transitorio y de pequeña magnitud en el número de neutrófilos (Motoyoshi y col, 1986; Komiyama y col, 1988).

Incluso cuando el factor es utilizado a dosis bajas, se ha detectado una cierta toxicidad, con aparición de fiebre y otros efectos secundarios no deseados.

El papel del M-CSF en clínica aún no está claro, aunque parece ser más eficaz en situaciones en las que se requiere un aumento de las defensas del huésped frente a parásitos intracelulares y en pacientes con cáncer.

#### 1.3.1.5.- Interleuquina 1 (IL-1).

La IL-1 juega un papel primordial en la activación de linfocitos T y B, induce neutrofilia en sangre periférica (Moore y Warren, 1987; Stork y col, 1988), estimula la síntesis de CSFs "in vivo" e "in vitro" (Zucali y col, 1986), actúa conjuntamente con otros CSFs estimulando a los precursores hematopoyéticos pluripotentes (Mochizuki y col, 1987; Bagby, 1989), y aumenta la recuperación mieloide después de tratamientos antitumorales clásicos (Stork y col, 1989).

Estudios realizados en animales de experimentación muestran que la administración de IL-1 antes de una irradiación potencialmente letal, produce un aumento significativo de la supervivencia de los animales (Schwartz y col, 1987; Schwartz, 1989). Después de la irradiación, los animales tratados con IL-1 presentan niveles superiores a los control, tanto de precursores pluripotentes como comprometidos (Schwartz y col, 1988).

Los distintos efectos mielopoyéticos de la IL-1, su sinergismo con otras moléculas reguladoras y su capacidad de acelerar la recuperación hematopoyética en casos de mielosupresión, hacen que este factor presente gran interés como agente mielopotenciador, en casos de daño hematopoyético medular como consecuencia de tratamientos antitumorales.

#### 1.3.2.- **Radioprotectores.**

En los últimos años, se han descrito toda una serie de sustancias de naturaleza muy diversa, capaces de estimular o proteger al sistema hematopoyético frente a una irradiación externa.

#### 1.3.2.1.- Aminotioles.

Hasta el momento, la molécula que ha presentado un mayor efecto radioprotector es el aminotiol WR2721. Este compuesto es un análogo de la  $\beta$ -mercaptoetilamina (MEA) con un grupo tiol sustituido: ácido S-2-(3-aminopropilamino)etilfosforotioico.

Esta molécula ha puesto de manifiesto la importancia que tienen en la radioprotección aquellos compuestos que poseen cubiertos los grupos sulfuro y tienen adiciones en los grupos nitrogenados.

Su administración "i.p." a ratones irradiados produce una elevada radioprotección, la cual tiene una duración de más de tres horas (Yuhás, 1978). Además, se ha demostrado su eficacia en una gran variedad de especies.

#### 1.3.2.2.- Extractos de plantas medicinales.

A partir de distintas plantas medicinales, se han obtenido una serie de extractos naturales con actividad radioprotectora sobre el sistema hematopoyético.

El extracto de Ginseng obtenido de una planta medicinal de la familia Acanthopanax senticosus Harms, protege a los animales del daño producido por la radiación en la médula ósea, acelerando la recuperación hematopoyética (Takeda y col, 1981).

El extracto de Shigoka obtenido de una planta de la misma familia que el Ginseng, ha mostrado capacidad radioprotectora en animales sometidos a dosis potencialmente letales de radiación. Asimismo, es capaz de estimular los precursores pluripotentes en animales subletalmente irradiados (Miyanomae y Frindel, 1988).

#### 1.3.2.3.- Polisacáridos.

En esta introducción merecen una atención especial, los radioprotectores de naturaleza polisacáridica, por la semejanza con el MRB objeto de esta tesis.

En general los polisacáridos, tanto puros como complejos (glicoproteínas, lipopolisacáridos, etc.), ocupan un papel importante dentro del grupo de los modificadores de la respuesta biológica.

##### A.- Lipopolisacáridos bacterianos (LPS).

Los polisacáridos de origen bacteriano (LPS), constituyen moléculas radioprotectoras clásicas, caracterizadas ya en el año 1958 como productos capaces de actuar sobre el sistema hematopoyético, favoreciendo la recuperación de éste tras ser dañado por

radiaciones (Smith y col, 1958). En estos primeros estudios, no sólo se describió al LPS como un agente radioprotector, sino que se puso de manifiesto la importancia que tenían aquellas sustancias con capacidad de estimular el sistema hematopoyético en el campo de los tratamientos antitumorales. Asimismo, se determinó que la eficacia del tratamiento aplicado era fuertemente dependiente del tiempo transcurrido entre la aplicación del tratamiento antitumoral y la administración del LPS. Este hecho ha sido confirmado en estudios posteriores con moléculas de muy distinta naturaleza (IL-s; CSFs; glucanos etc.).

Pese a la capacidad radioprotectora del LPS, su aplicación clínica es muy limitada, ya que presenta una alta toxicidad produciendo toda una serie de efectos secundarios no deseados (Sparks y col, 1973).

#### B.- Dextrán sulfato.

El dextrán sulfato, un polianión heparinoideo sintético, es capaz de inducir radioprotección en animales, siendo este efecto altamente dependiente de la dosis de dextrán sulfato y del momento de la administración. El máximo efecto radioprotector se obtiene tras la administración "i.p." de 50 mg/Kg de dextrán sulfato, tres días antes de la irradiación (Ross y Peeke, 1986a; Ross y Peeke, 1986b).

#### C. Glucanos.

A partir de la pared celular de levaduras, se han aislado un gran número de poliglicanos con capacidad radioprotectora (Patchen y col, 1984a). Entre ellos se encuentra el glucano-P, que ha sido el más estudiado (Di Luzio, 1985).

El glucano-P es un MRB aislado de la pared celular de la levadura Saccharomyces cerevisiae.

La administración intravenosa de glucano-P a ratones normales, produce una fuerte estimulación de la hematopoyesis en bazo, tanto a nivel de precursores pluripotentes como comprometidos, si bien la hematopoyesis medular no se ve alterada (Patchen y Lotzova, 1980).

En ratones sometidos a dosis de radiación subletal, el tratamiento con glucano-P acelera la recuperación hematopoyética a nivel de precursores pluripotentes y comprometidos, independientemente de que el tratamiento se realice antes o después de la irradiación (Pospisil y col, 1982; Patchen y col, 1984b).

El glucano-P también actúa a nivel de sistema inmune, aumentando las respuestas tanto humorales como celulares de éste, así como sobre el sistema reticuloendotelial. El aumento de la funcionalidad del sistema reticuloendotelial se va a traducir en un

aumento de la resistencia a infecciones inespecíficas (Reynolds y col, 1980; Di Luzio, 1983).

Ambos efectos del glucano, la estimulación de la hematopoyesis y el aumento de las defensas frente a infecciones inespecíficas, hacen de él un producto con uso potencial en clínica para prevención y terapia de daños causados por tratamientos de quimio-radio-terapia.

Sin embargo, su uso en clínica está muy restringido, ya que por la naturaleza particulada del producto, presenta efectos secundarios como formación de granulomas y hepatoesplenomegalia (Deimann y Fahimi, 1980).

Se ha descrito un glucano con la misma estructura que el glucano-P, pero en forma soluble, el glucano-F. El glucano-F tiene los mismos efectos que el glucano-P sobre el sistema hematopoyético, tanto en animales normales como irradiados, pero su condición de molécula soluble hace que no produzca efectos secundarios nocivos (Patchen y Mac Vittie, 1986a; Patchen y Mac Vittie, 1986b).

## **OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

Nuestro principal objetivo en esta tesis, fue evaluar la capacidad de un Modificador de la Respuesta Biológica de naturaleza polisacárido-proteína (AM3 y AM5), para estimular la hematopoyesis murina.

Para alcanzar este objetivo, abordamos una serie de aproximaciones experimentales, tendentes a obtener información sobre diferentes aspectos relacionados con la vía de administración del producto, el órgano hematopoyético implicado, su actividad sobre los distintos compartimientos, capacidad radioprotectora etc.. Lo que se concretó en los siguientes objetivos parciales:

- Cuantificar la respuesta hematopoyética tras la administración del producto, en función de su forma galénica y por tanto de su vía de administración (AM3 vía oral, y AM5 vía intravenosa).
- Caracterizar la capacidad del producto para estimular la hematopoyesis de animales no irradiados, analizando su acción sobre los distintos compartimientos (precursores pluripotentes y comprometidos).
- Comprobar si su acción estimuladora es órgano dependiente, o si por el contrario el producto es capaz de actuar tanto sobre la hematopoyesis medular como sobre la hematopoyesis esplénica.
- Evaluar su capacidad radioprotectora en animales sometidos tanto a dosis potencialmente letales como subletales de radiación.
- Analizar su efecto estimulador sobre la hematopoyesis que tiene lugar en los cultivos de larga duración de médula ósea, tras su administración "in vitro", y si esta estimulación es compatible con la permanencia del cultivo.
- Examinar si su actividad estimuladora está mediada por alguno de los factores de crecimiento hematopoyéticos (CSFs) descritos hasta el momento.

La consecución de estos objetivos parciales, no sólo nos permite caracterizar en profundidad la actividad estimuladora sobre el sistema hematopoyético del MRB, objetivo de esta tesis, sino que también supone la base para la implantación de una metodología de trabajo en el análisis de nuevos fármacos potencialmente activos sobre el sistema hematopoyético.

**MATERIALES  
Y METODOS**

### 3.1.- MODIFICADORES DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA.

El Modificador de la Respuesta Biológica (MRB) objeto del trabajo presentado en esta tesis, ha sido proporcionado por Laboratorios Andrómaco S.A.(Patente Española de Procedimiento nº P 9003173).

El fármaco, es una asociación no covalente polisacárido-proteína, formada por un polisacárido glucomanano de peso molecular próximo a 150 Kd, procedente de la pared celular de Cándida utilis, y una proteína de almacenamiento de semillas no germinadas maduras de Ricinus communis, de peso molecular de 11 Kd, obtenido tras un proceso fermentativo-extractivo.

Este compuesto ha sido utilizado en dos formas galénicas diferentes:

**AM3:** Asociación no covalente polisacárido-proteína adsorbida en una matriz inorgánica de sulfato-fosfato cálcico, compuesto en forma de adsorbato, lo que permite su administración vía oral.

**AM5:** Asociación no covalente polisacárido-proteína en forma soluble, ya que no se encuentra absorbida en matriz inorgánica, permitiendo que su administración sea vía intravenosa.

### 3.2.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

El trabajo experimental presentado en esta memoria se llevó a cabo con ratones macho adultos, de la especie Mus musculus, producidos en el estabulario de la U.O. de Efectos Biológicos del Instituto de Protección Radiológica y Medio Ambiente del CIEMAT.

Excepto en los casos que se indica, se utilizó la cepa híbrida F1 resultado del cruce de hembra C57Bl con macho Balb/C ó la cepa pura C57Bl. En estudios específicos sobre LPS, se utilizó la cepa C3H/HeJ (IFFA Credo).

Los animales fueron mantenidos a 22°C de temperatura ambiente y 50% de humedad, con fotoperíodos de luz-oscuridad de 12 horas, agua y pienso Sandermus (Sanders) "ad libitum". Los ratones no producidos en el estabulario (C3H/HeJ), permanecieron en cuarentena al menos durante 15 días antes de ser utilizados para experimentación.

La edad de los ratones utilizados dependió del ensayo. Así, para la cuantificación de precursores hematopoyéticos se utilizaron ratones de 11-14 semanas de edad. Para realizar los cultivos de larga duración de médula ósea los ratones donadores fueron de 8 semanas.

Los animales receptores para el ensayo "in vivo" de formación de colonias en bazo (CFU-S) tenían una edad comprendida entre 12 y 24 semanas.

### **3.3.- SUSPENSIONES CELULARES.**

Las suspensiones celulares utilizadas en los distintos protocolos experimentales, procedían del bazo, médula ósea o sangre periférica de tres ratones donadores.

La extracción de la médula ósea y el bazo se realizó en condiciones asépticas, tras el sacrificio del animal por dislocación cervical. Para la extracción de sangre periférica, el animal fue previamente anestesiado con eter etílico.

#### **3.3.1.- Suspensiones celulares de médula ósea.**

En la preparación de suspensiones de médula ósea se utilizaron únicamente fémures. Con ayuda de una jeringa con aguja, se pasó Medio Iscove Modificado por Dulbecco (IMDM) (Gibco) por el interior del hueso para extraer de esta manera la médula ósea. Posteriormente, para eliminar los agregados celulares, la suspensión se dispersó con una jeringa con aguja de 0,5 x 16 mm.

#### **3.3.2.- Suspensiones celulares de bazo.**

Los bazos extraídos quirúrgicamente, eran sumergidos en IMDM y con ayuda de un homogeneizador Potter, se disgregaron eliminando su cubierta conectiva. Al igual que en la médula ósea, la suspensión de bazo se pasó finalmente por una jeringa con aguja de 0,5 x 16 mm, para eliminar los agregados celulares.

#### **3.3.3.- Suspensiones celulares de sangre periférica.**

La sangre periférica fue obtenida del seno retroorbital de los ratones, con ayuda de una pipeta Pasteur con heparina al 1% libre de conservantes (Lab. LEO, S.A.).

Todas las suspensiones celulares se mantuvieron en baño de hielo (0-4°C) desde su preparación hasta su uso.

La concentración de células nucleadas en cada tipo de suspensión se determinó utilizando un contador de partículas Coulter (Counter Coulter ZM), seleccionando un rango de tamaño de partículas entre 4 y 12  $\mu\text{m}$  de diámetro.

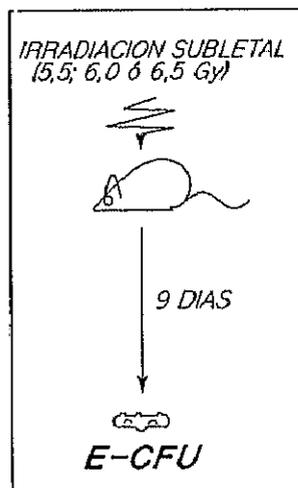
A la suspensión celular diluida en electrolito Isotón II (Coulter) se le añadió saponina, para lisar las células no nucleadas (10  $\mu\text{l}$  de saponina por ml de isotón)

### 3.4.- CUANTIFICACION DE PRECURSORES Y CELULAS HEMATOPOYETICAS.

La capacidad para estimular el sistema hematopoyético de los MRB descritos, se ha determinado analizando el efecto de éstos a nivel de precursores y células hematopoyéticas.

#### 3.4.1.- Unidad formadora de colonias endógenas en bazo (E-CFU).

Mediante el ensayo de formación de colonias endógenas en bazo (E-CFU) (Till y McCulloch, 1963), se puede estimar el número de precursores hematopoyéticos pluripotentes que sobreviven a una irradiación subletal. El ensayo se basa en la capacidad de las células ceпа supervivientes, para formar colonias macroscópicas en la superficie del bazo del animal irradiado.



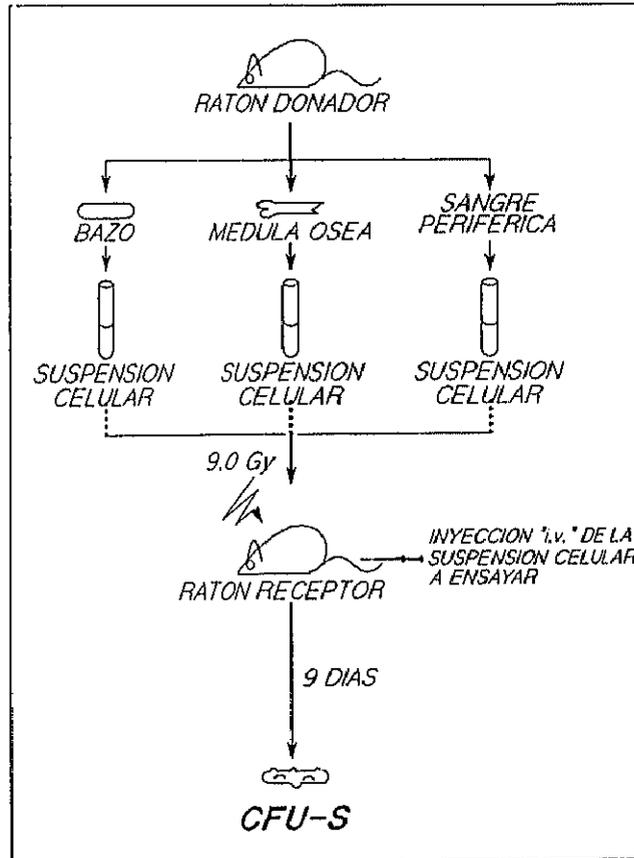
**Figura 4:** Ensayo de formación de colonias endógenas en bazo (E-CFU).

Ratones de las cepas C57Bl, ó F1(C57BlxBalb/C)(al menos 10 por lote) se irradiaron subletalmente (5,5; 6,0 ó 6,5 Gy). Nueve días después de la irradiación los animales eran sacrificados y tras fijar los bazo con Bouin, se contó el número de colonias macroscópicas formadas en su superficie con ayuda de un microscopio estereoscópico Nikon (SMZ-2) (Figura 4).

### 3.4.2.- Unidad formadora de colonias exógenas en bazo (CFU-S)

El ensayo de la Unidad formadora de colonias en bazo (CFU-S) fué descrito por Till y Mc Culloch ya en 1961 (Till y Mc Culloch, 1961). Durante años, la CFU-S se ha considerado el precursor hematopoyético más indiferenciado que se ha conseguido cultivar (Lord y Schofield, 1985).

A diferencia de otros precursores hematopoyéticos, la CFU-S se ensaya "in vivo", mediante la inyección intravenosa de un número apropiado de células hematopoyéticas a un ratón receptor isogénico, irradiado previamente con una dosis que esterilice su sistema hematopoyético.



**Figura 5:** Ensayo de formación de colonias exógenas en bazo (CFU-S).

Los ratones receptores, de 12 a 24 semanas de edad, fueron irradiados con una dosis de 9,0 Gy. Con esta dosis se asegura la supervivencia del animal durante los 9 días que dura el ensayo, impidiéndose a su vez la formación de colonias de origen endógeno. La edad de los ratones receptores (12-24 semanas), no influye en la eficiencia del ensayo (Maganto, 1985).

Tras la irradiación se procedió al trasplante de la suspensión hematopoyética a analizar. El intervalo de tiempo entre ambas etapas nunca fue superior a 4 horas.

Transcurridos 9 días desde el trasplante, los animales se sacrificaron y se procedió a la extracción del bazo, pudiéndose apreciar en su superficie nódulos redondeados u ovals tras su fijación en Bouin (Figura 5).

El conteo de colonias CFU-S se realizó con ayuda de un microscopio estereoscópico (Nikon, SMZ2). En todos los experimentos se utilizaron al menos 10 ratones receptores por lote.

#### **3.4.3.- Unidad formadora de colonias granulo-macrofágica (CFU-GM).**

Los precursores CFU-GM, que dan lugar a colonias de granulocitos y macrófagos, fueron los primeros precursores hematopoyéticos crecidos "in vitro" en un ensayo clonal (Bradley y Metcalf, 1966).

Es uno de los ensayos más utilizados, pudiendo llevarse a cabo sobre distintas matrices semisólidas (metilcelulosa, agar o gel de colágeno), con medio sintético suplementado con suero fetal bovino o suero de caballo y en presencia de factores estimulantes de colonias.

En nuestro caso, los cultivos de CFU-GM se realizaron sobre matriz semisólida de agar (Bactoagar, Difco. Concentración final 0,3%), utilizando como medio de cultivo IMDM suplementado con 25% de suero de caballo, previamente inactivado (baño a 56°C durante 30 minutos). La fuente de factores estimulantes de colonias utilizada, fue medio condicionado de bazo (SCM) (Metcalf y Johnson, 1978) o medio condicionado de la línea mielomonocítica Wehi-3b (WCM) (Dexter y col, 1980) (10% v/v).

Una vez mezclados los componentes arriba mencionados con la suspensión celular preparada en IMDM, se sembró 1 ml por placa de cultivo de 35 mm (Nunc). Entre 5 y 10 placas fueron sembradas por lote (Figura 6).

Con objeto de facilitar la gelificación del agar las placas se mantuvieron en el frigorífico durante 10 minutos, incubándose posteriormente a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

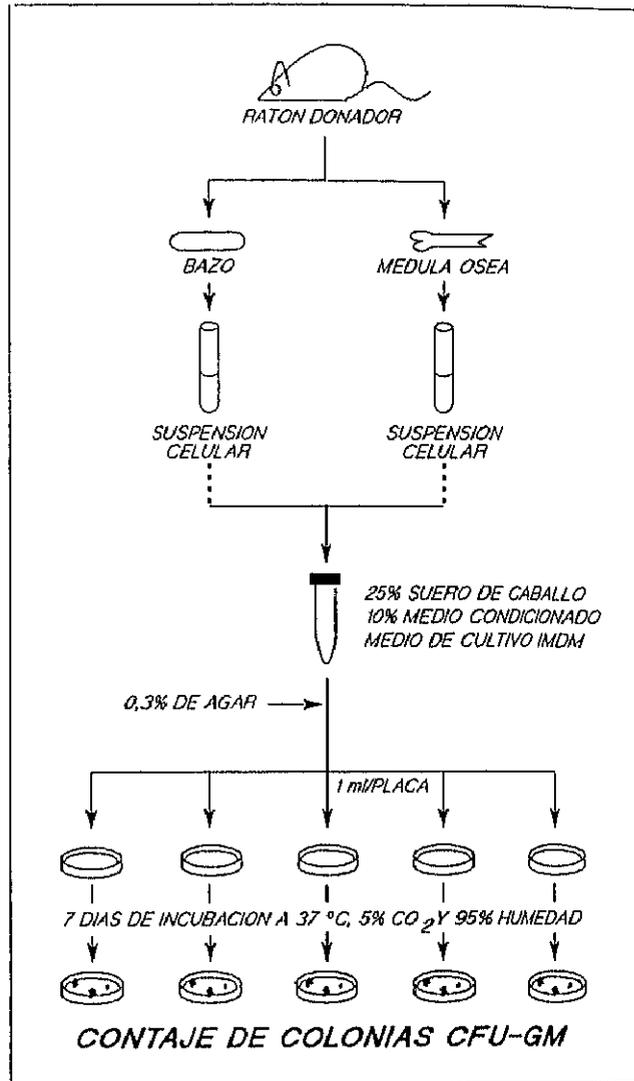


Figura 6: Cultivo de precursores granulomacrofágicos (CFU- GM).

La colonias CFU-GM se contaron tras 7 días de incubación, con ayuda de un microscopio (Olympus stereo-zoom). Sólo fueron consideradas colonias aquellas agrupaciones que contaban con más de 50 células.

El análisis de la composición celular de las colonias se realizó tras su tinción con hematoxilina eosina (Grande, 1988).

#### 3.4.4.- Unidad formadora de "burst" eritroides (BFU-E).

La BFU-E requiere para su crecimiento "in vitro" dos tipos de factores estimulantes: actividad promotora de "burst" (BPA), necesaria para que el cultivo proliferare en los

primeros estadios del desarrollo de las colonias y eritropoyetina (Epo), necesaria para que tenga lugar una maduración completa de las células eritroides (Axelrad y col, 1973).

El protocolo seguido para el cultivo de BFU-E fue una modificación del descrito por Metcalf (Metcalf y col, 1979; Tejero y col, 1984).

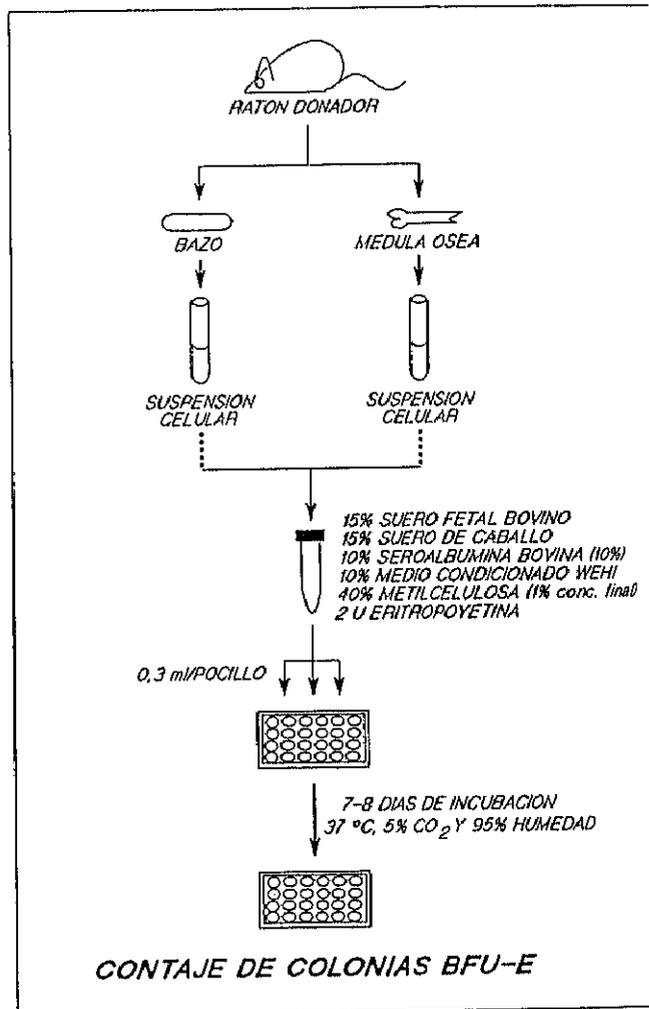


Figura 7: Cultivo de precursores eritroides (BFU-E).

El cultivo de BFU-E se realizó sobre matriz semisólida de metilcelulosa (Dow). Ésta se preparó en medio IMDM a una concentración del 2.5%, suplementándose con 0.25% de  $\alpha$ -tioglicerol 0.01M (Fluka S.A.), 2% de L-glutamina 0.2M (Flow) y 2% de selenito sódico  $10^{-5}$ M (Sigma).

En un tubo estéril conteniendo 15% de suero de caballo, 15% de suero fetal bovino, 10% de medio condicionado Wehi-3b (como fuente de BPA), 10% de seroalbúmina bovina (Sigma), 2 U/ml de eritropoyetina (Terry Fox Laboratory. Vancouver. Canada) y 40% de metilcelulosa previamente suplementada (concentración final 1%), se añadió la suspensión celular preparada en medio IMDM a la concentración adecuada. La mezcla se homogeneizó con ayuda de una jeringa con aguja de 0,8 x 40 mm, sembrándose 0,3 ml por pocillo, en una placa de cultivo de 24 pocillos (Costar) (Figura 7).

La incubación se realizó a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad, siendo la estabilidad de estas condiciones durante el tiempo que dura el cultivo, crítica para el buen crecimiento y hemoglobinización de las colonias BFU-E. Transcurridos 7-8 días, se contaron las colonias con ayuda de un microscopio invertido Diaphot-TMD (Nikon).

#### **3.4.5.- Células maduras circulantes.**

Los valores de hematocrito se determinaron con ayuda de una centrífuga Radial (Orto).

El conteo de leucocitos se realizó en el contador de partículas Coulter, diluyendo la sangre en electrolito Isotón II, el cual contenía saponina para lisar las células no nucleadas.

#### **3.5.- CULTIVO DE LARGA DURACION DE MEDULA OSEA (LTBMC).**

El cultivo de larga duración de médula ósea permite reproducir "in vitro" la hematopoyesis medular, ya que análogamente a lo que ocurre "in vivo", sobre un microambiente permisivo formado por distintas poblaciones de células del estroma tiene lugar la proliferación y diferenciación de los distintos precursores hematopoyéticos. En el LTBMC se mantiene la hematopoyesis por períodos superiores a 40 semanas, durante los cuales se pueden cuantificar periódicamente los procesos de proliferación y diferenciación sufridos por los distintos precursores hematopoyéticos.

El protocolo de cultivo de Larga Duración de Médula Osea utilizado fue el descrito por Dexter (Dexter y col, 1977).

La médula, procedente de 1 tibia y 1 fémur de ratones híbridos de 8 semanas de edad, se perfundió directamente en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (Nunc) con 10 ml de medio de cultivo Fischer (Gibco) suplementado con 20% (v/v) de suero de caballo,

previamente inactivado, y  $10^{-6}$  M de hemisuccinato sódico de hidrocortisona (Sigma). Previamente a su incubación a  $33^{\circ}\text{C}$ , los frascos fueron gaseados con  $\text{CO}_2$  al 5% en aire (Figura 8).

Semanalmente se cambió la totalidad del medio, sustituyéndolo por medio de cultivo fresco.

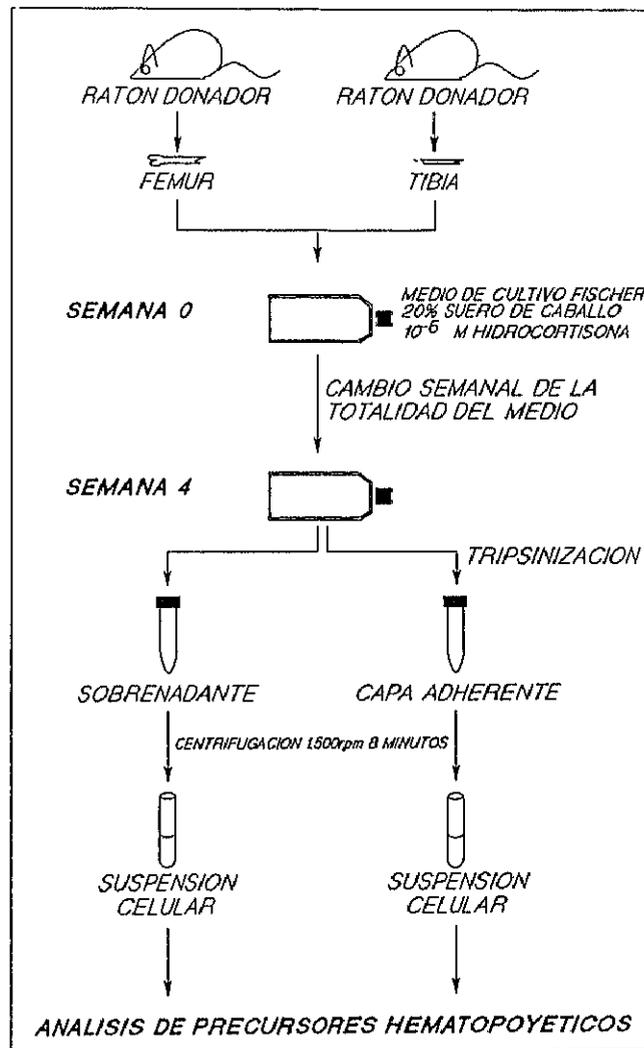


Figura 8: Cultivo de larga duración de médula ósea (LTBMC).

### 3.5.1.- Obtención de suspensiones celulares a partir de LTBMC.

En este cultivo la actividad hematopoyética se localiza fundamentalmente en la capa adherente. En dicha capa, las células del estroma generan un microambiente adecuado para que tenga lugar la proliferación y diferenciación de los distintos precursores

hematopoyéticos, los cuales a medida que se van generando migran al sobrenadante (capa no adherente).

La valoración de las diferentes poblaciones hematopoyéticas se hizo tanto en el sobrenadante como en la capa adherente (Figura 8).

En el primer caso, tras agitar suavemente la botella se procedió a la extracción del sobrenadante con ayuda de una pipeta esteril. Tras la determinación de la concentración celular, esta suspensión se centrifugó a 1500 rpm, resuspendiéndose el sedimento obtenido en IMDM para posibilitar la cuantificación de los precursores hematopoyéticos presentes.

La capa adherente se retiró mediante la adición de tripsina. La tripsinización fue detenida, una vez levantada la capa, añadiendo medio IMDM suplementado con 10% de suero de caballo. La suspensión así obtenida se pasó a través de una jeringa con aguja (0,5 x 16 mm) para eliminar los agregados celulares existentes.

La preparación de la suspensión celular de la capa adherente, para posteriormente cuantificar los precursores hematopoyéticos, se realizó igual que en el caso del sobrenadante, mediante centrifugación y resuspensión del sedimento resultante en medio IMDM.

### **3.5.2.- Determinación de la presencia de actividad estimuladora de colonias (CSA) en el sobrenadante de LT BMC.**

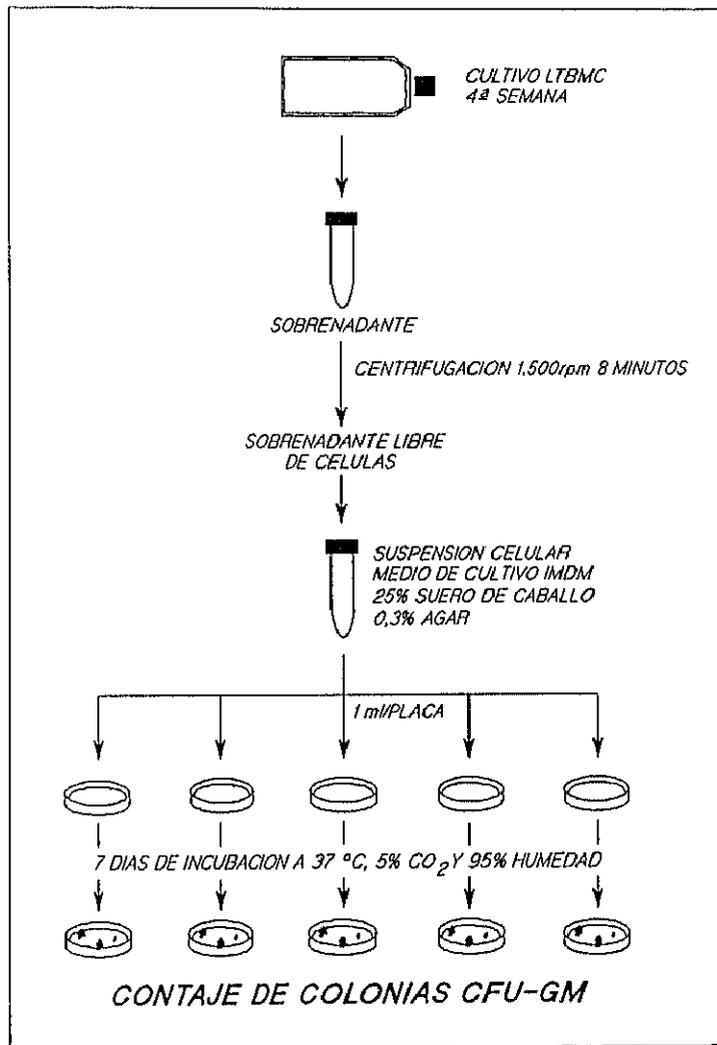
Fundamentalmente son tres los métodos utilizados para detectar presencia de CSAs:

- Ensayos clonales en matriz semisólida, analizándose bien el número de colonias o el tamaño de éstas.
- Ensayos de proliferación celular en suspensiones celulares (Incorporación de Timidina tritiada).
- Estudios de supervivencia celular en cultivos en suspensión.

En este trabajo, se ha estudiado la presencia de GM-CSA en los sobrenadantes libres de células procedentes de los cultivos de larga duración de médula ósea, utilizando el ensayo clonal de formación de colonias CFU-GM.

El ensayo tiene su base en el cultivo convencional de CFU-GM (apartado 3.4.3). La suspensión celular preparada en medio IMDM, se suplementó con 25% de suero de caballo inactivado. En estos cultivos el medio condicionado que aporta los factores estimulantes necesarios (antes WEHI ó SCM), fue sustituido por el sobrenadante del LT BMC libre de células, a una concentración final del 5 al 30% (v/v) (Figura 9).

En algunos casos, los sobrenadantes tanto de cultivos control como tratados, fueron concentrados cinco veces. Para ello se llevó a cabo la ultrafiltración de los sobrenadantes, utilizando una membrana de filtración Amicon que retiene todas aquellas moléculas con peso molecular superior a 10.000 daltons.



**Figura 9:** Ensayo de actividad estimuladora de colonias (GM-CSA) en los sobrenadantes de LT BMC.

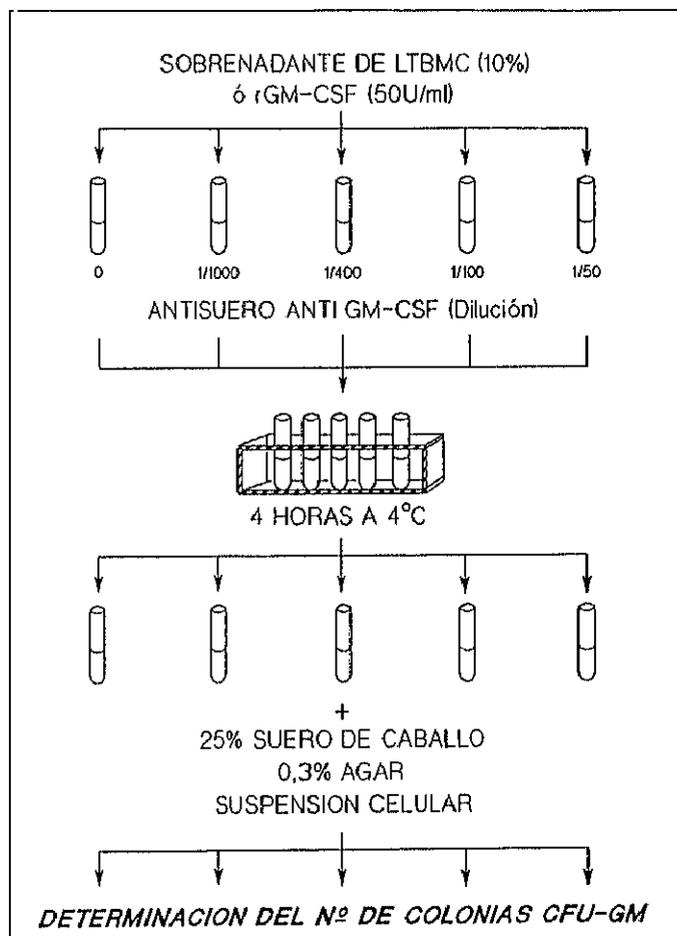
### 3.5.3.- Inhibición del GM-CSA presente en el sobrenadante de LT BMC con antisuero anti GM-CSF.

En aquellos sobrenadantes que mostraron actividad estimuladora de colonias, se procedió a la caracterización del tipo de factor hematopoyético responsable de esta actividad.

La aproximación en este campo, se centró en el Factor estimulante de colonias granulo-macrofágicas (GM-CSF), analizándose la inhibición de su actividad, tras el tratamiento de los sobrenadantes con suero específico anti GM-CSF.

Los sobrenadantes de LTBMC, fueron incubados con distintas diluciones de antisuero anti GM-CSF durante 4 horas a 4°C. Transcurrido el período de incubación, el sobrenadante fue suplementado con suero de caballo (25%), añadiéndose la suspensión celular de médula ósea preparada en medio IMDM y agar (concentración final 0,3%). La siembra de la mezcla se realizó en una placa de 24 pocillos (Costar), sembrándose 0,3 ml/ pocillo (3 pocillos por muestra). La incubación se realizó a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad durante 7 días, transcurridos los cuales se cuantificaron con ayuda de un microscopio (Olympus stereo-zoom) las colonias CFU-GM.

Como control positivo, se utilizó rGM-CSF (50U/ml), el cual era procesado en paralelo a las muestras de sobrenadante (Figura 10).



**Figura 10:** Protocolo de neutralización de GM-CSA con suero específico anti GM-CSF.

### 3.6.- IRRADIACION

En este trabajo, la irradiación ha sido utilizada con dos objetivos diferentes:

- Como herramienta experimental, necesaria para la cuantificación de precursores pluripotentes (E-CFU y CFU-S).
- Para evaluar la capacidad de los MRB para paliar el daño hematopoyético causado por la radiación.

#### 3.6.1.- Equipo de irradiación.

La irradiación de los animales se llevó a cabo con un equipo de rayos X MG323 de Philips, en la instalación radiactiva IR-04 del CIEMAT, siguiendo los criterios y normas de Protección Radiológica que recoge la legislación (Reglamento sobre Instalaciones Nucleares y Radiactivas, 21/7/72; Reglamento sobre protección sanitaria contra radiaciones ionizantes 12/8/82-25/11/87).

Las condiciones de irradiación fueron de 300 KV y 12,8 mA, siendo la filtración inherente nominal del tubo de 2,2 mm Be +3 mm Al y la filtración adicional de 0,4 mm Sn, 0,25 mm Cu y 1 mm Al. La capa hemirreductora (HVL) resultante fue de 3,2 mm Cu.

Para su irradiación, los animales en grupos no superiores a 25, fueron introducidos en recipientes de metacrilato diseñados y construidos para este propósito en el CIEMAT. Durante el período de irradiación el recipiente se encontraba situado en una mesa giratoria, situada a 43 cm del foco de irradiación, consiguiéndose una tasa de dosis uniforme de 1,05 Gy/min, resultando las variaciones de la dosis absorbida en los animales, inferior al 2%.

#### 3.6.2.- Dosimetrías.

La medida de exposición, necesaria para determinar la tasa de dosis absorbida en tejido, se realizó con el dosímetro Farmer 2570 de Nuclear Enterprises y la cámara de ionización de 0,6 cm<sup>3</sup> modelo 2571 de la misma firma.

La cámara fué calibrada en el laboratorio de Nuclear Enterprises y posteriormente, en el Laboratorio Oficial de Calibración de la División de Metrología del CIEMAT, a una calidad de 100 KV y capa hemirreductora de 4,03 mm Al.

La estabilidad de la cámara se comprobó mensualmente por el operador de la IR-04, mediante una fuente de  $^{90}\text{Sr}$  tipo 2503/3 (Nuclear Enterprises).

### 3.6.3.- Respuesta hematopoyética a la radiación.

En el rango de dosis de radiación entre 2,0 y 10,0 Gy, tiene lugar el síndrome hematopoyético o de la médula ósea, que provoca la muerte del individuo pocas semanas después de la irradiación.

En este apartado se contemplan dos tipos de estudios, los relacionados con la supervivencia del animal tras una irradiación potencialmente letal y la recuperación hematopoyética tras dosis subletales.

En los estudios de supervivencia, las dosis administradas fueron de 7,6 Gy (LD90/30: Dosis de radiación que provoca la muerte del 90% de los animales a 30 días). Los animales, 10 por lote, se mantuvieron tras la irradiación en jaulas individuales, administrándoseles agua y pienso esteril "ad libitum", durante los 30 días que duró el ensayo.

En los estudios de recuperación hematopoyética tras dosis subletales de radiación (entre 3,0 y 6,5 Gy), se analizaron las cinéticas de recuperación de distintos precursores procedentes de diferentes órganos hematopoyéticos.

### 3.7.- ANALISIS ESTADISTICO.

Los datos experimentales que se presentan en el capítulo de resultados, son la media de al menos tres experimentos. En todos los casos este valor medio va acompañado del error estandar.

La determinación de la existencia o no de diferencias significativas entre los valores de los lotes control y los lotes tratados en los distintos experimentos, se realizó mediante el test estadístico de Student. Dicho método es válido para muestras de pequeño tamaño, como las utilizadas en este trabajo.

A partir del valor de "t" se calculó el nivel de significación (p), estableciéndose el criterio:

Significativo:	$p < 0,05$ (*)
No significativo:	$p > 0,05$

## **RESULTADOS**

#### **4.1.- ESTIMULACION HEMATOPOYETICA INDUCIDA POR AM3.**

El estudio de la capacidad de un determinado compuesto para estimular el sistema hematopoyético, se realiza con frecuencia en animales sometidos a una agresión. En estas condiciones el sistema hematopoyético al estar deplecionado, es más susceptible a ser estimulado.

El sistema hematopoyético tiene una cierta capacidad de recuperación espontánea frente a las radiaciones ionizantes, al menos dentro de un rango de dosis de radiación. Lógicamente cualquier agente que promueva esta recuperación, va a presentar una actividad radioprotectora de indudable interés en clínica.

Los resultados que se describen en este apartado, se refieren al efecto del AM3 sobre:

- Precursores hematopoyéticos pluripotentes endógenos en bazo (E-CFU) tras una irradiación subletal.
- Recuperación hematopoyética de precursores tanto pluripotentes como comprometidos, de médula ósea y bazo, tras una irradiación subletal.
- Supervivencia de animales sometidos a dosis de radiación potencialmente letales.

##### **4.1.1.- Efecto del tratamiento con AM3 sobre el número de colonias endógenas en bazo (E-CFU).**

La evaluación de la capacidad estimuladora del AM3 sobre los precursores hematopoyéticos pluripotentes, se abordó mediante el ensayo de formación de colonias endógenas (E-CFU).

Puesto que el número de E-CFU supervivientes en bazo, es inversamente proporcional a la dosis de radiación aplicada, a una dosis de radiación determinada, el incremento en el número de E-CFU como consecuencia del tratamiento con AM3, reflejaría su capacidad para estimular este precursor.

Se estableció como **factor de recuperación de E-CFU** al cociente entre el número de colonias que aparecen en la superficie del bazo de ratones irradiados y tratados con AM3, y el número de colonias presentes en el bazo de ratones control irradiados, multiplicado por 100.

En este apartado, también se describen los resultados relacionados con la influencia que sobre esta capacidad estimuladora tenían variables tales como, número de dosis de AM3 administradas, pauta de administración del producto, dosis de radiación subletal y cepa de ratón utilizadas.

La dosis de AM3 a administrar se fijó en 150 mg/Kg/día, a partir de resultados previos de Laboratorios Andrómaco. Estos datos sugerían también un cierto efecto estimulador del AM3 sobre el sistema hematopoyético, cuando éste se administraba después de la irradiación.

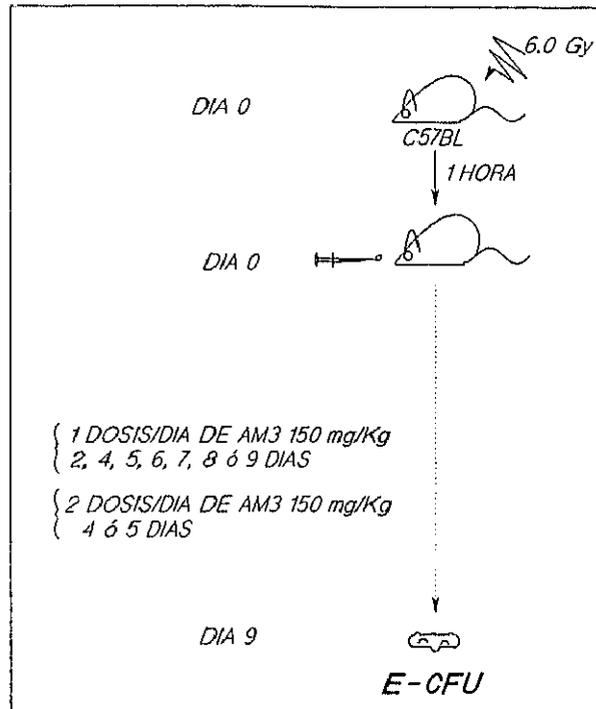
#### 4.1.1.1.- Influencia del número de dosis de AM3 administradas.

Con objeto de evaluar el número de dosis de AM3 necesarias para inducir la máxima estimulación de precursores pluripotentes, así como la influencia de este parámetro en el efecto producido, ratones adultos de la cepa C57Bl fueron irradiados con 6,0 Gy, iniciándose una hora después de la irradiación el tratamiento con AM3. Éste consistió en la administración "vía oral" de una dosis al día de 150 mg/Kg de AM3 durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ó 9 días, ó la misma dosis administrada dos veces al día durante 4 y 5 días (Figura 11).

Los ratones control recibieron un volumen equivalente de agua, durante el tiempo que duró el tratamiento con AM3.

Como puede observarse en la Tabla II, sólo se obtuvo un **factor de recuperación significativo (156%)** cuando el AM3 fue administrado durante 6 días consecutivos, con una dosis al día. Por el contrario, la administración de dos dosis diarias durante 4 días, provocó un efecto negativo, disminuyendo el número de E-CFU en el lote tratado en relación al control (60%).

A partir de estos resultados, se estableció como **tratamiento óptimo** la administración de 150 mg/Kg/día de AM3 durante 6 días, utilizándose esta dosificación en estudios posteriores.



**Figura 11:** Protocolo para evaluar la influencia del número de dosis de AM3 administradas sobre la estimulación de precursores pluripotentes E-CFU.

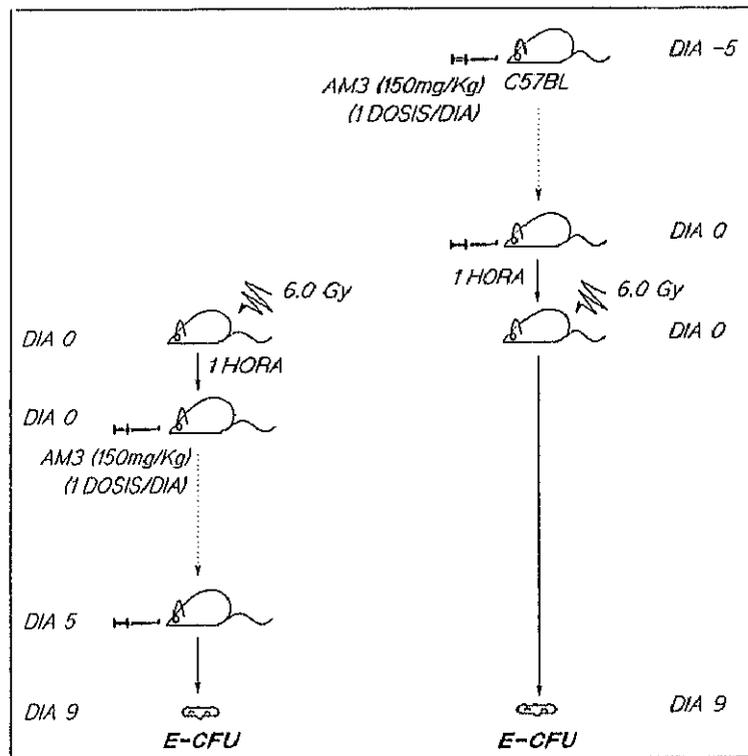
TRATAMIENTO CON AM3		E-CFU/BAZO	FACTOR DE RECUPERACION
N DE DOSIS/DIA	N DE DIAS		
0	-	8,2 ± 1,1	100
1	2	10,0 ± 1,7	122
1	4	10,5 ± 2,3	128
1	5	10,2 ± 1,5	125
1	6	13,1 ± 2,0	156 *
1	7	8,7 ± 3,0	106
1	8	11,7 ± 4,0	143
1	9	8,9 ± 2,3	108
2	4	5,3 ± 0,8	60 *
2	5	7,1 ± 0,3	90

**Tabla II:** Influencia del número de dosis de AM3 en la estimulación de E-CFU. (\*) Incremento significativo respecto al control ( $p < 0,05$ ).

4.1.1.2.- Influencia de la pauta de administración de AM3.

Debido a que la pauta de administración utilizada, tratamiento con el producto antes o después de la irradiación, suele ser crítica en el efecto observado (Patchen y col, 1984b), se procedió a evaluar la influencia de esta variable sobre el factor de recuperación de E-CFU inducido por AM3.

Para ello, ratones C57Bl fueron tratados con 150 mg/Kg/día de AM3 durante 6 días, bien antes o después de ser irradiados con 6,0 Gy, determinándose posteriormente el número de E-CFU (Figura 12).



**Figura 12:** Protocolo para evaluar la influencia de la pauta de administración de AM3, sobre la estimulación de precursores pluripotentes E-CFU.

Los resultados, recogidos en la Tabla III, indicaron que el tratamiento con AM3 tanto antes como después de la irradiación dió lugar a un incremento en el número de colonias endógenas en bazo. En ambos casos los incrementos observados son estadísticamente significativos en relación a los controles, irradiados y no tratados. Cuando los comparamos entre sí, no muestran diferencias significativas, por lo que no es posible atribuir efecto alguno a la pauta de administración.

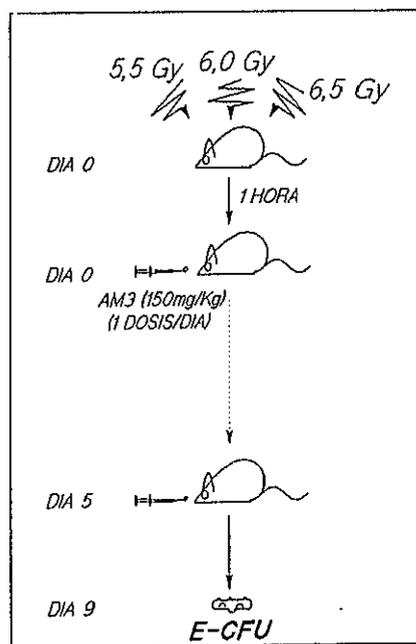
TRATAMIENTO	E-CFU/BAZO	FACTOR DE RECUPERACION
CONTROL	10,5 ± 0,4	100
PRE-IRRADIACION	14,4 ± 0,8	137 *
POST-IRRADIACION	16,4 ± 1,7	156 *

**Tabla III:** Influencia de la pauta de administración sobre la estimulación de E-CFU inducida por AM3.

4.1.1.3.- Influencia de la dosis de radiación.

En el ensayo de formación de colonias endógenas en bazo, la dosis subletal de radiación administrada, condiciona el número de E-CFU presentes en el bazo a los 9 días, ya que cada E-CFU representa un precursor pluripotente que ha sobrevivido a la irradiación. Así pues, cuanto mayor sea la dosis de radiación menor será el número de precursores que sobreviven y por tanto, el número de E-CFU formadas en la superficie del bazo. Este hecho podría alterar el factor de recuperación promovido por el tratamiento con AM3.

Con objeto de evaluar la influencia de este parámetro, ratones adultos C57Bl fueron irradiados con distintas dosis subletales de radiación (5,5; 6,0 ó 6,5 Gy), tratándose después de la irradiación con AM3, 150 mg/Kg/día durante 6 días, cuantificándose posteriormente el número de E-CFU (Figura 13).



**Figura 13:** Protocolo para evaluar la influencia de la dosis de radiación sobre el efecto estimulador del AM3 sobre las E-CFU.

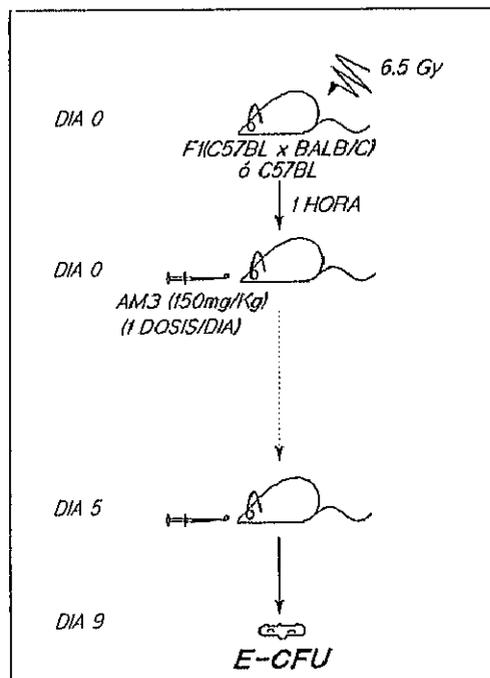
En los resultados obtenidos se observó, como era previsible, que a medida que se aumentó la dosis de radiación el número de E-CFU disminuía, no observándose, sin embargo, diferencias significativas en los factores de recuperación, como consecuencia de la dosis de radiación empleada (Tabla IV).

<i>DOSIS DE RADIACION (Gy)</i>	<i>5,5 Gy</i>	<i>6,0 Gy</i>	<i>6,5 Gy</i>
<i>TRATAMIENTO</i>			
<i>CONTROL</i>	13,2 ± 1,0	10,5 ± 0,4	7,9 ± 1,4
<i>POST-IRRADIACION</i>	22,6 ± 1,5 (171) *	16,4 ± 2,9 (156) *	13,0 ± 1,3 (164) *

**Tabla IV:** Influencia de la dosis de radiación en la estimulación inducida por el tratamiento con AM3 sobre las E-CFU. Entre paréntesis se indican los factores de recuperación. (\*)  $p < 0,05$ .

#### 4.1.1.4.- Influencia de la cepa de ratón.

Por motivos puramente experimentales y de disponibilidad de animales, nos planteamos evaluar la influencia de la cepa de ratón (cepa pura o cepa híbrida) sobre el efecto estimulador del AM3 a nivel de E-CFU.



**Figura 14:** Protocolo para evaluar la influencia de la cepa de ratón, en la estimulación inducida por el tratamiento con AM3 sobre las E-CFU.

En este caso, ratones adultos de las cepas C57BL ó F1(C57BlxBalb/C) fueron tratados, después de someterlos a una dosis de radiación subletal (6,5 Gy), con 150 mg/Kg/día de AM3 durante 6 días, analizándose posteriormente el número de E-CFU (Figura 14).

Como se muestra en la Tabla V, los factores de recuperación de E-CFU producidos por el tratamiento con AM3, no se vieron afectados por la cepa de ratón utilizada, con valores de 164% y 169% para C57BL e híbridos respectivamente.

TRATAMIENTO \ CEPA DE RATON	C57BL	F1(C57BL x BALB/C)
	CONTROL	7,9 ± 1,4
POST-IRRADIACION	13,0 ± 1,3 (164)*	14,0 ± 0,4 (169)*

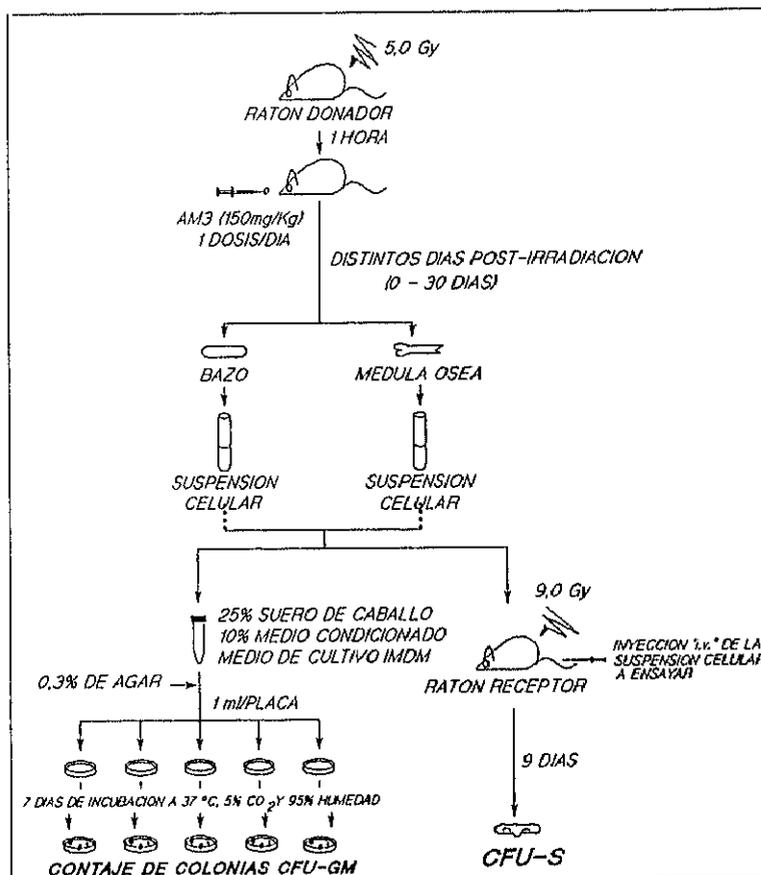
**Tabla V:** Influencia de la cepa de ratón, sobre la estimulación de E-CFU inducida por el tratamiento con AM3. Entre paréntesis se indican los factores de recuperación. (\*)  $p < 0,05$ .

#### 4.1.2.- Efecto del tratamiento con AM3 sobre la recuperación hematopoyética en ratones subletalmente irradiados.

Cuando un animal de experimentación es sometido a una irradiación subletal (3-5 Gy), se produce una elevada mortalidad de sus precursores hematopoyéticos. En concreto, con dosis de 4,5 Gy, el número de células cepa (CFU-S) y precursores granulo-macrofágicos (CFU-GM) se reduce respectivamente al 0,3 y 0,4% respecto a los valores en animales control, no irradiados, (Guzman y Lajtha, 1979). Si bien durante el primer día post-irradiación todavía se observa una reducción del número de precursores, posteriormente éstos inician una etapa de regeneración exponencial, que se mantiene durante 13 a 15 días hasta alcanzar un plató que se sitúa aproximadamente a un 80% de los valores obtenidos para ratones no irradiados.

En este contexto, se evaluó el efecto del AM3 sobre la cinética y nivel de recuperación de distintos precursores hematopoyéticos tras una dosis de radiación de 5,0 Gy. Como representante del compartimiento de células pluripotentes se eligió a la CFU-S y como precursor comprometido se analizó la CFU-GM. Asimismo, se determinó el efecto del AM3 sobre la celularidad total de los órganos hematopoyéticos.

El protocolo utilizado se muestra en la Figura 15. Una hora después de la irradiación se inició el tratamiento con AM3 (150 mg/Kg/día), evaluándose la recuperación hematopoyética a distintos tiempos post-irradiación, hasta un período de 30 días.



**Figura 15:** Protocolo para evaluar el efecto del AM3 sobre la recuperación hematopoyética tras una irradiación subletal.

La cinética de recuperación de la médula ósea, a nivel de precursores pluripotentes y comprometidos, fue muy similar en ratones control y tratados con AM3, no observándose diferencias significativas entre ellas (Figura 16 y 17). En ambos lotes, la recuperación de precursores pluripotentes y comprometidos fue incompleta, mostrando niveles del 30% respecto al valor control sin irradiar, 30 días después de la irradiación. Asimismo, la recuperación de la celularidad de la médula ósea tampoco se vio favorecida como consecuencia del tratamiento con AM3 (Figura 18).

En lo que respecta a la hematopoyesis esplénica, debido a dificultades experimentales, al existir un porcentaje excesivamente bajo de precursores tras la irradiación, las primeras cuantificaciones de éstos se realizaron el día 10, analizándose en este órgano únicamente precursores pluripotentes (CFU-S).

Al igual que en la médula ósea, no se observaron diferencias significativas en las cinéticas de recuperación de celularidad de bazo entre ratones tratados con AM3 y controles irradiados no tratados (Figura 19).

Sin embargo, a nivel de CFU-S esplénicas en el lote tratado con AM3, se observó un incremento significativo (158%) diez días después de la irradiación (Figura 20). Los análisis realizados en días posteriores no mostraron diferencias en los niveles de CFU-S entre el lote control y el tratado con AM3.

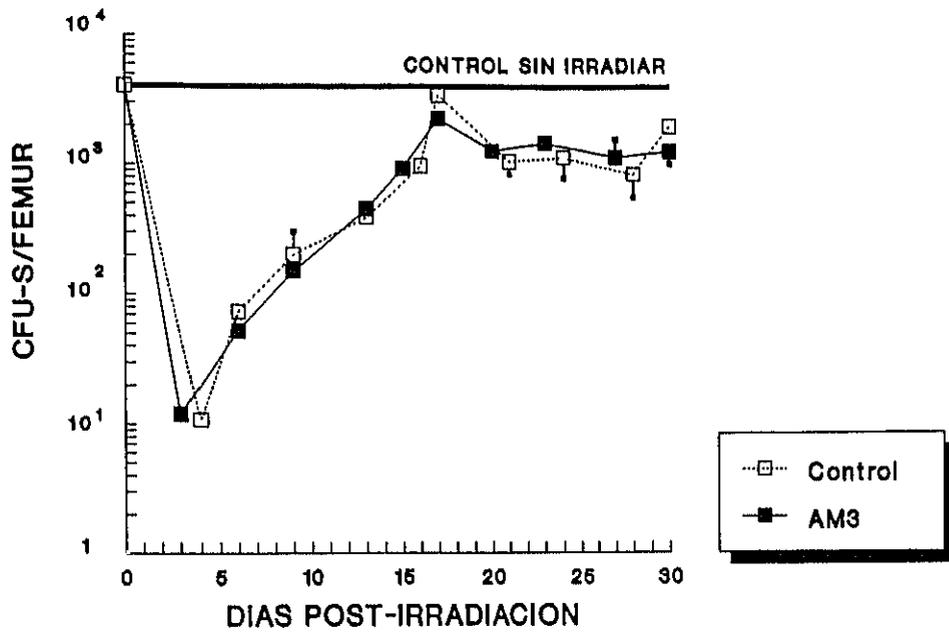


Figura 16: Cinética de precursores CFU-S de médula ósea, tras una irradiación subletal (5,0 Gy), en ratones control o tratados con AM3.

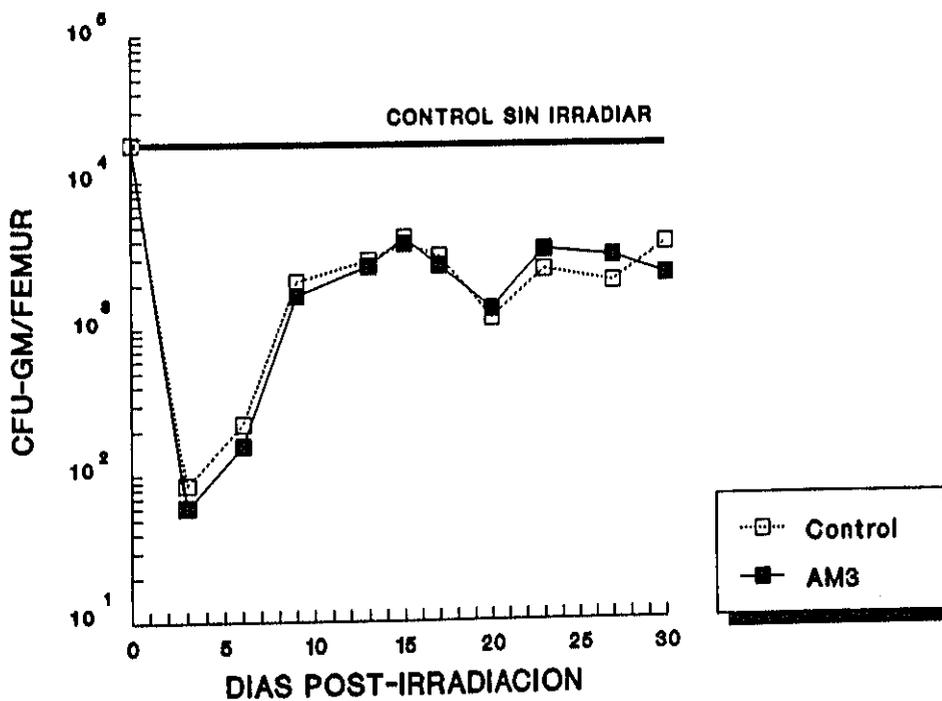


Figura 17: Cinética de precursores CFU-GM de médula ósea, tras una irradiación subletal (5,0 Gy), en ratones control o tratados con AM3.

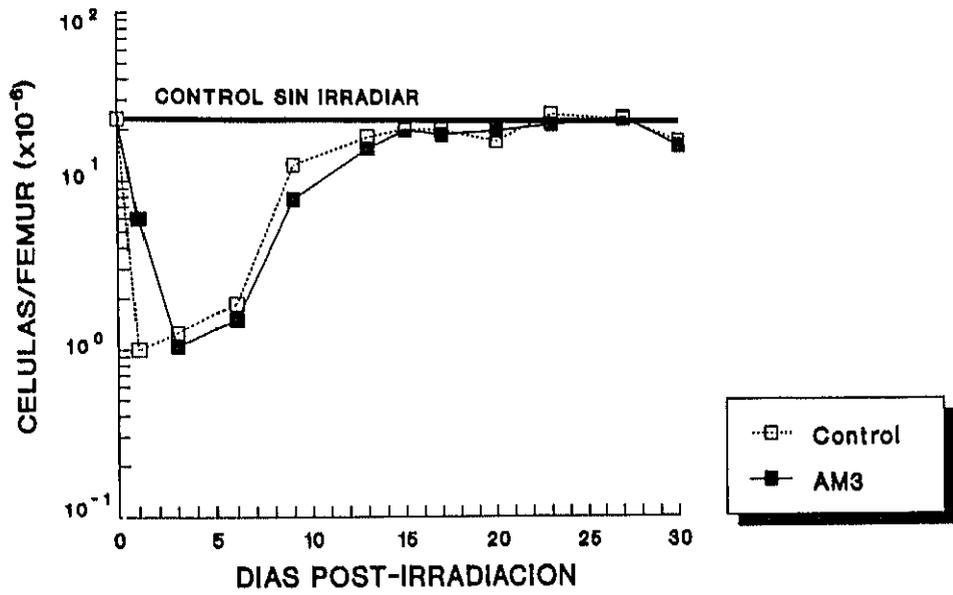


Figura 18: Cinética de celularidad de médula ósea, tras una irradiación subletal (5,0 Gy), en ratones control o tratados con AM3.

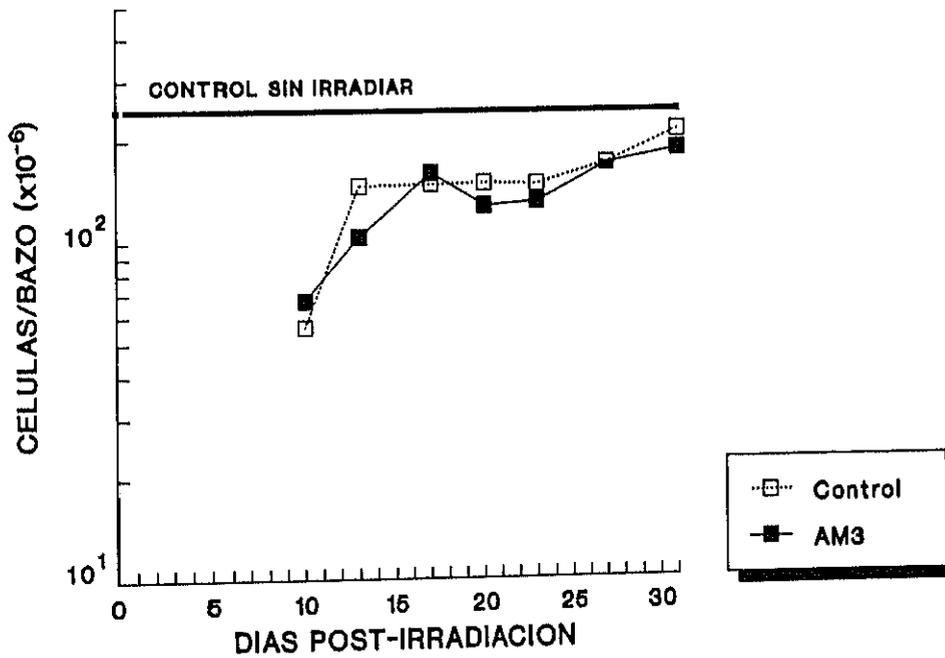
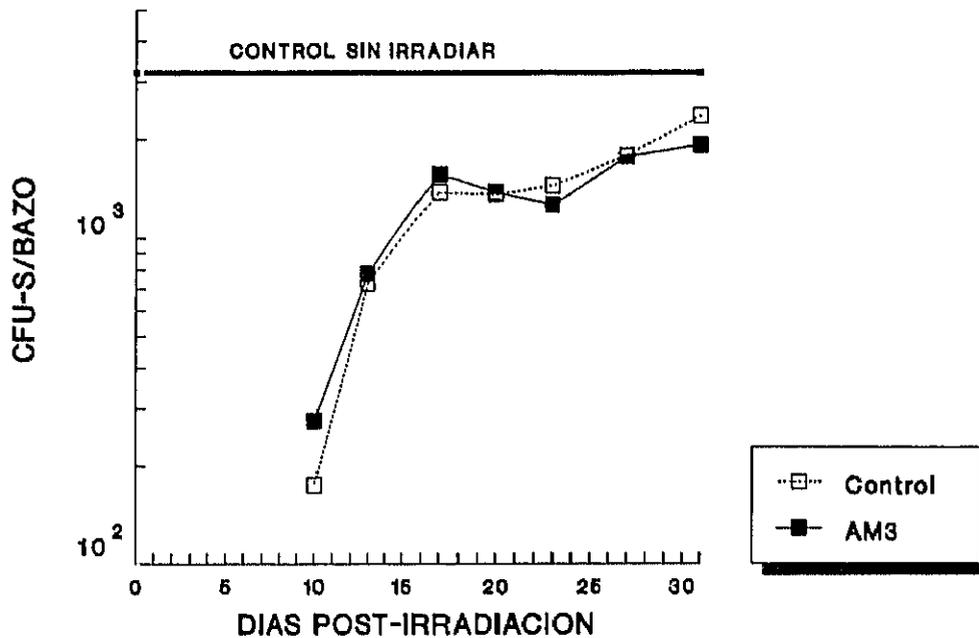


Figura 19: Cinética de celularidad de bazo tras una irradiación subletal (5,0 Gy), en ratones control o tratados con AM3.



**Figura 20:** Cinética de precursores CFU-S de bazo, tras una irradiación subletal (5,0 Gy), en ratones control o tratados con AM3.

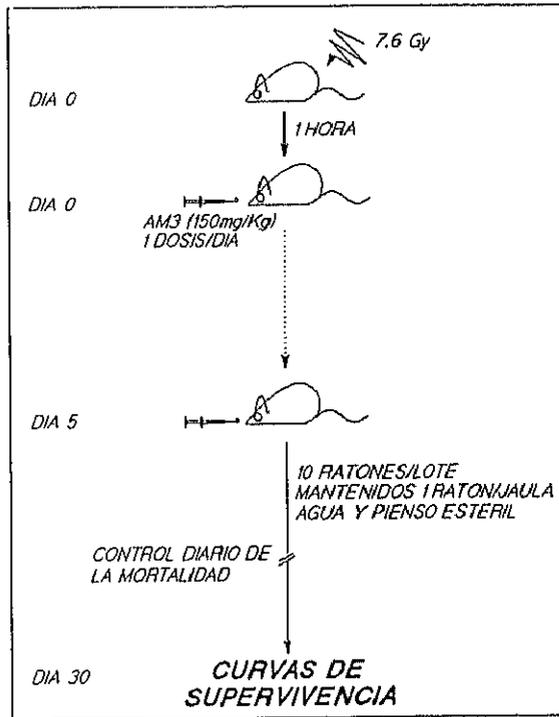
#### 4.1.3.- Efecto del tratamiento con AM3 sobre la supervivencia de ratones irradiados con dosis potencialmente letales.

Como se ha mencionado anteriormente, el síndrome hematopoyético surge tras una irradiación global con dosis entre 2 y 10 Gy. A estas dosis, la supervivencia del animal está condicionada entre otras causas, por la capacidad de recuperación del sistema hematopoyético. Así, la capacidad del AM3 para incrementar el número de precursores pluripotentes (E-CFU), podría verse reflejada en un aumento de la supervivencia de animales sometidos a irradiación potencialmente letal.

Para evaluar esta hipótesis, ratones macho adulto fueron irradiados con 7,6 Gy, dosis que provoca la muerte del animal por síndrome hematopoyético, aunque no la total desaparición de los precursores pluripotentes.

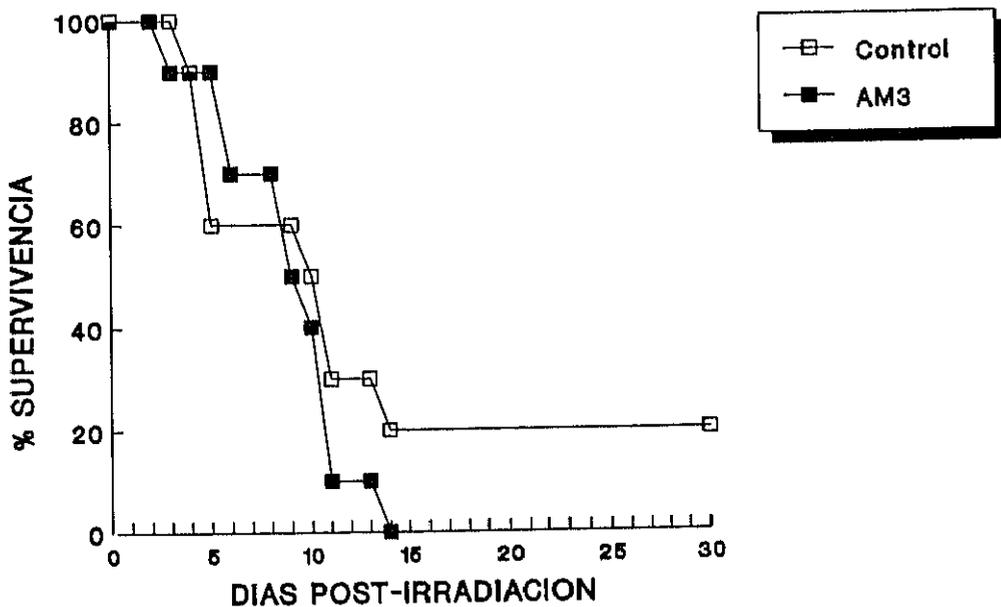
Una hora después de la irradiación se inició el tratamiento con AM3, que consistió en la administración diaria "vía oral", de 150 mg/Kg, durante seis días consecutivos. Como en experimentos anteriores, el lote control fue irradiado con la misma dosis y recibió un volumen de agua equivalente al de AM3 (Figura 21).

Como se observa en la Figura 22, bajo las condiciones experimentales utilizadas en este estudio, no se observaron diferencias significativas en los niveles de supervivencia de los animales tratamiento con AM3 y la del lote control.



**Figura 21:** Protocolo para evaluar el efecto del AM3 sobre supervivencia de ratones irradiados con dosis potencialmente letales.

Este resultado supone, que el protocolo de tratamiento con AM3 óptimo para estimular los precursores pluripotentes en animales sometidos a una irradiación subletal, no ofrece una respuesta positiva frente a dosis de radiación potencialmente letales.



**Figura 22:** Efecto del tratamiento con AM3 sobre la supervivencia de animales irradiados con dosis potencialmente letales.

#### 4.2.- ESTIMULACION HEMATOPOYETICA INDUCIDA POR AM5.

El hecho de que el tratamiento "vía oral" con AM3 produjera una estimulación significativa de los precursores hematopoyéticos pluripotentes, hacía pensar que el tratamiento "i.v." con su forma soluble, el AM5, provocaría una mayor estimulación hematopoyética, que facilitaría profundizar tanto en los diversos efectos asociados a la administración del producto, como en su mecanismo de acción.

Aunque los mecanismos a través de los cuales un MRB actúa cuando es administrado "vía oral", no tienen por que coincidir con los implicados cuando se administra intravenosamente, tampoco debe descartarse a priori esta opción.

En cualquier caso, la información que se obtenga con el producto soluble, sirve como punto de partida para interpretar lo que ocurre tras el tratamiento "vía oral".

Además, existen otros aspectos prácticos asociados a la vía de administración empleada, que facilitan la labor experimental. La administración "i.v." de un compuesto permite una mejor y más sencilla dosificación, ya que no hay que olvidar que estamos trabajando con ratones. Es importante, así mismo, destacar que frente a la necesidad de administrar múltiples dosis de AM3, "vía oral", datos encontrados en la bibliografía apuntan que aquellos compuestos administrados "i.v." son activos tras la administración de una dosis única.

##### 4.2.1.- Determinación de la dosis óptima.

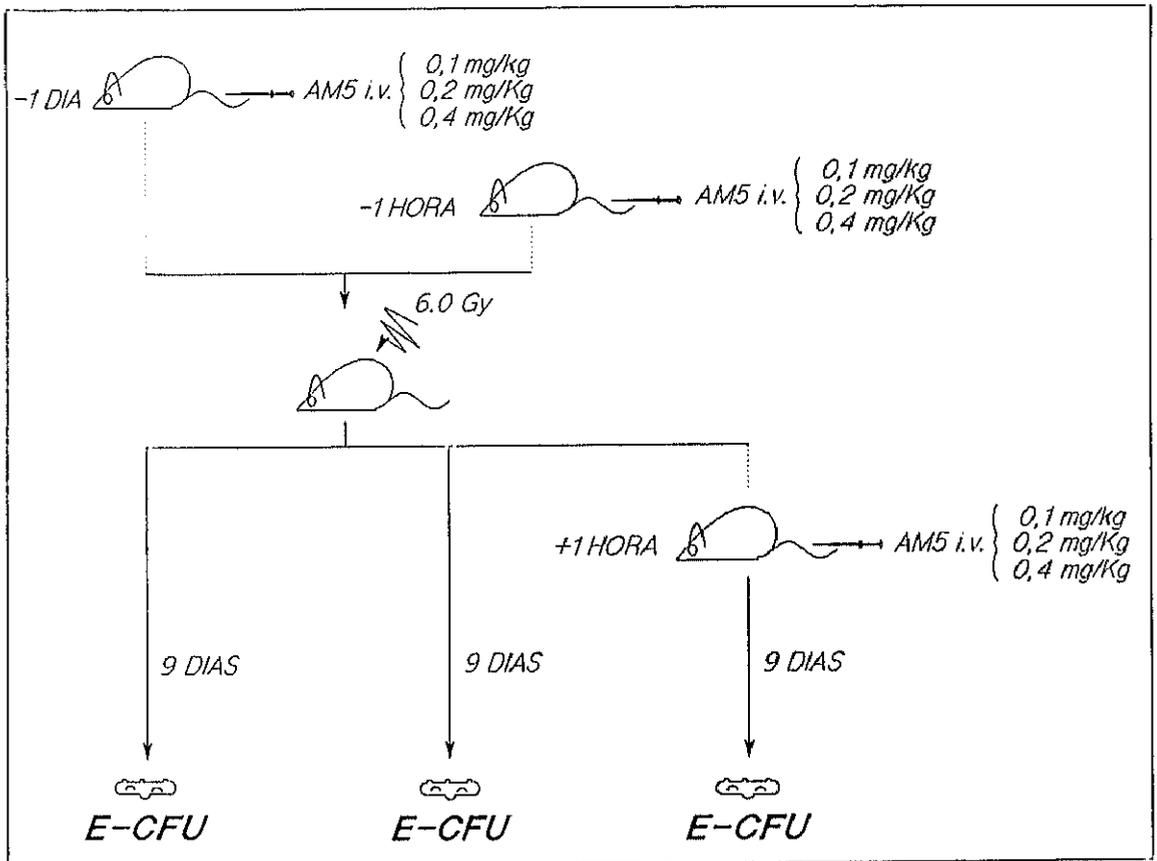
Como en el caso del AM3, los primeros experimentos estuvieron dirigidos a conocer la dosis de AM5 capaz de producir la máxima estimulación hematopoyética. Para ello, se realizaron dos tipos de ensayos, estableciéndose la relación dosis-repuesta entre:

- Dosis de AM5 administrada y estimulación de precursores pluripotentes endógenos en bazo (E-CFU) de ratones subletalmente irradiados.
- Dosis de AM5 administrada y estimulación de precursores pluripotentes y comprometidos en médula ósea y bazo de ratones no irradiados.

##### 4.2.1.1.- Ensayos de formación de colonias endógenas en bazo (E-CFU).

Al igual que en el caso del AM3, mediante el ensayo de formación de colonias endógenas en bazo (E-CFU), se cuantificó la capacidad del AM5 para incrementar el número de precursores pluripotentes, en ratones sometidos a una irradiación subletal.

Así, tras la irradiación de ratones adultos F1(C57BlxBalb/C) con 6,0 Gy, se les administró "i.v." una dosis única de AM5 (0,1; 0,2 ó 0,4 mg/Kg). La administración se realizó 1 día ó 1 hora antes de la irradiación ó bien 1 hora después de la irradiación. Posteriormente se cuantificaron las E-CFU (Figura 23).



**Figura 23:** Protocolo para evaluar la influencia de la dosis de AM5 sobre el número de colonias endógenas en bazo.

Como se muestra en la Figura 24, el mayor factor de recuperación de E-CFU se obtuvo cuando el tratamiento se realizó 1 hora antes de la irradiación, siendo el incremento observado proporcional a la dosis de AM5 administrada.

Cuando el tratamiento con AM5 se realizó 1 día antes de la irradiación, únicamente dosis de 0,4 mg/Kg produjeron un incremento de E-CFU (Figura 24).

Debe destacarse el hecho de que la administración de AM5 (0,2 ó 0,4 mg/Kg) 1 hora después de la irradiación, fuera capaz de aumentar el número de E-CFU en bazo. Este fenómeno ya había sido observado con AM3, si bien los factores de recuperación fueron muy superiores con AM5 (600% respecto al valor control frente a 156% con AM3).

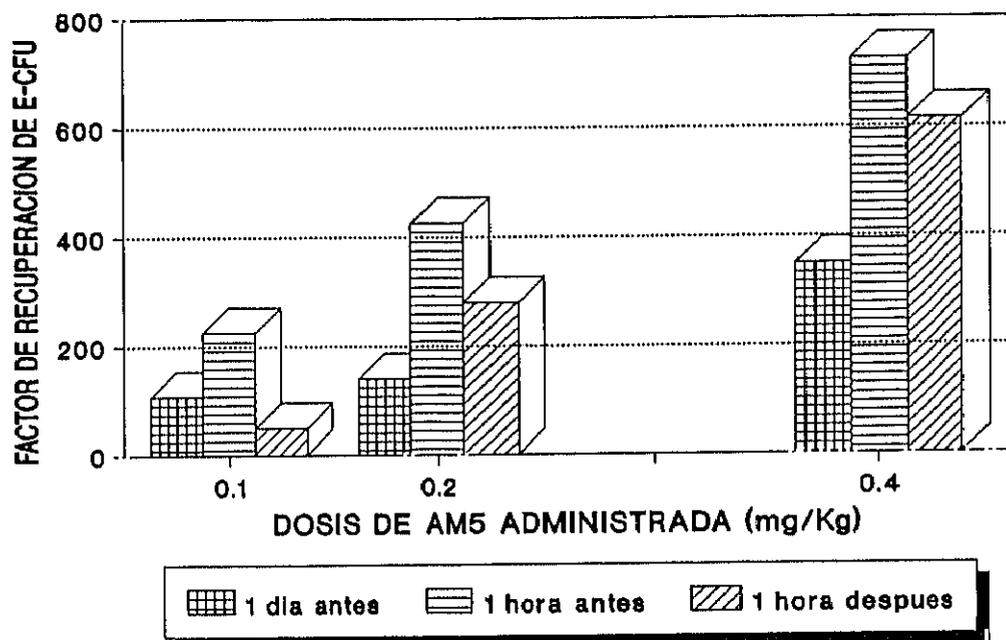


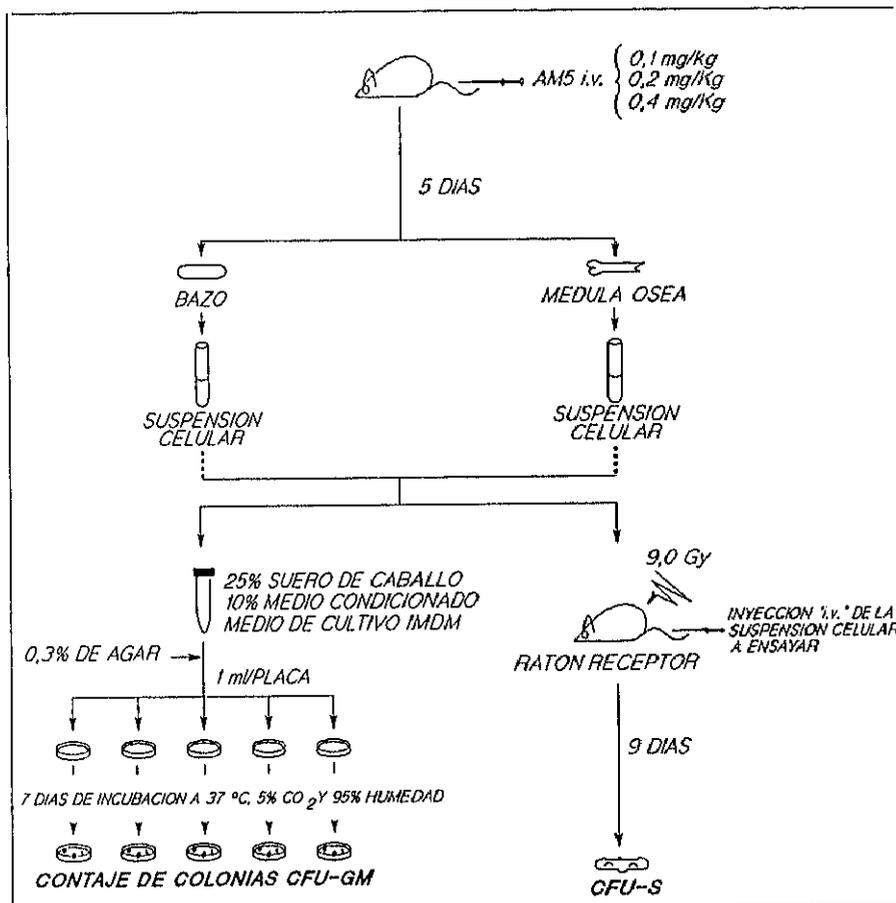
Figura 24: Efecto de diferentes dosis de AM5, y distintas pautas de administración sobre el número de E-CFU.

#### 4.2.1.2.- Ensayos en ratones no irradiados.

Paralelamente a los ensayos de formación de colonias endógenas en bazo, se analizó el efecto del tratamiento con AM5 sobre la hematopoyesis de ratones no irradiados, en función de la dosis de éste administrada.

En este caso, la posible respuesta se independiza de las variables asociadas a la agresión, simplificando el trabajo experimental. En contrapartida, podría esperarse una menor estimulación, debido a que la hematopoyesis en condiciones normales está sometida a una estricta regulación, que tiende a mantener constante el nivel de los distintos precursores. Pese a ello, y a partir de resultados recogidos en la bibliografía, se pone de manifiesto que el análisis de precursores hematopoyéticos en ratones no irradiados es buen indicador de la capacidad estimuladora de un determinado compuesto y que ésta representa una aproximación válida sobre sus efectos radioprotectores.

En ensayos realizados en ratones F1(C57BlxBalb/C), distintas concentraciones de AM5 (0,1; 0,2 ó 0,4 mg/Kg) fueron administradas intravenosamente, determinándose 5 días más tarde tanto la celularidad como el contenido en CFU-S y CFU-GM en médula ósea y bazo (Figura 25). La elección del día 5 se realizó en base a resultados descritos en la bibliografía para otros MRB.



**Figura 25:** Protocolo para evaluar la influencia de la dosis de AM5 sobre la estimulación hematopoyética en ratones no irradiados.

En cuanto a la hematopoyesis en médula ósea, dosis de 0,1 mg/Kg provocaron un incremento significativo en el contenido de CFU-S (140% respecto al valor control), si bien el contenido de células totales y de precursores CFU-GM no se vió modificado. Con dosis más altas de AM5 (0,2 y 0,4 mg/Kg) no se observó estimulación de la hematopoyesis medular (Tabla VI).

DOSIS DE AM5 (mg/Kg)	CELULAS/FEMUR (x10 <sup>-6</sup> )	CFU-S/FEMUR (x10 <sup>-3</sup> )	CFU-GM/FEMUR (x10 <sup>-3</sup> )
—	24,6 ± 0,5	4,5 ± 0,5	18,2 ± 1,9
0,1	26,8 ± 0,5 (109)	6,3 ± 0,2 (139)*	19,6 ± 3,2 (108)
0,2	22,1 ± 3,1 (90)	4,9 ± 0,9 (109)	16,5 ± 3,4 (91)
0,4	22,8 ± 1,2 (93)	3,9 ± 1,0 (88)	15,9 ± 1,5 (87)

**Tabla VI:** Respuesta hematopoyética de la médula ósea en ratones no irradiados, tratados con AM5. Entre paréntesis se indica el % respecto al valor control. (\*) p < 0,05.

Frente a la leve respuesta de la médula ósea, la hematopoyésis esplénica se vio fuertemente estimulada como consecuencia del tratamiento con AM5. Las tres dosis ensayadas, 0,1; 0,2 y 0,4 mg/Kg indujeron un incremento tanto de la celularidad del órgano, como de su contenido en precursores CFU-S y CFU-GM. Este incremento fue dependiente de la dosis de AM5, alcanzándose los valores máximos con 0,4 mg/Kg (125%, 330% y 510% en celularidad, CFU-S y CFU-GM respectivamente (Tabla VII).

Basándonos tanto en estos resultados como en los expuestos anteriormente sobre E-CFU, fijamos como dosis de producto a administrar en experimentos posteriores la de 0,4 mg/Kg de AM5.

<i>DOSIS DE AM5 (mg/Kg)</i>	<i>CELULAS/BAZO (x10<sup>-6</sup>)</i>	<i>CFU-S/BAZO (x10<sup>-3</sup>)</i>	<i>CFU-GM/BAZO (x10<sup>-3</sup>)</i>
—	170,7 ± 12,6	1,6 ± 0,1	3,2 ± 0,7
0,1	188,7 ± 12,0 (110)	2,3 ± 0,1 (144)*	4,3 ± 0,1 (131)
0,2	201,0 ± 0,5 (118)	2,8 ± 0,1 (173)*	5,7 ± 0,3 (175)*
0,4	214,4 ± 13,0 (125)*	5,3 ± 1,6 (331)*	16,3 ± 3,5 (509)*

**Tabla VII:** Respuesta hematopoyética esplénica en ratones no irradiados, tratados con AM5. Entre paréntesis se indica el % respecto al valor control. (\*)  $p < 0,05$ .

#### 4.2.2.- Cinética de estimulación hematopoyética tras el tratamiento con AM5 en ratones no irradiados.

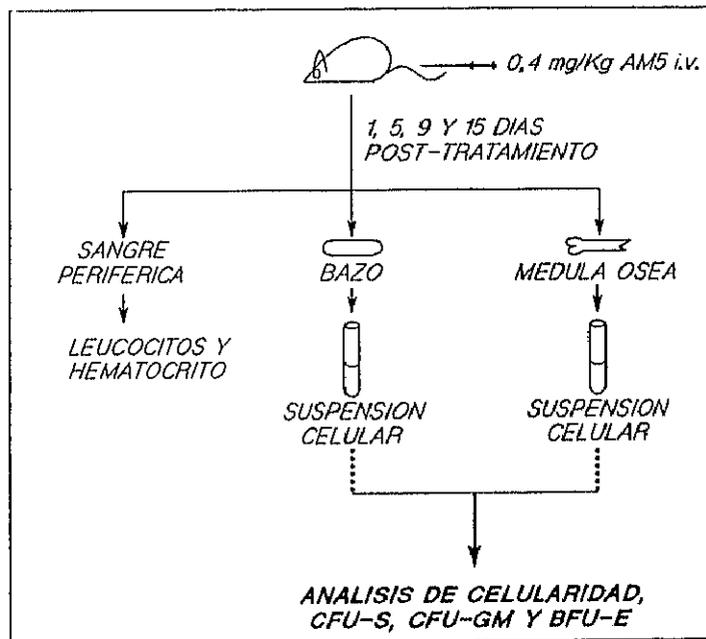
El análisis de precursores hematopoyéticos en ratones no irradiados tras una única administración de AM5, se había llevado a cabo 5 días después de dicha administración. Sin embargo, resulta obvio que si queremos conocer la respuesta hematopoyética tras el tratamiento con AM5, no debemos restringirnos a su efecto en un día determinado, sino que una vez establecida la dosis óptima, debíamos estudiar la cinética seguida por los precursores a diferentes días después de la administración del fármaco.

Así, tras la administración "i.v." de una única dosis de 0,4 mg/Kg de AM5, se determinaron las cinéticas seguidas por distintos precursores hematopoyéticos en médula ósea y bazo, así como por las células maduras de sangre periférica, en ratones no irradiados (F1(C57BlxBalb/C)).

Con ello, se pretendió analizar el efecto del tratamiento con AM5 sobre los distintos compartimientos hematopoyéticos, estando estos representados de la siguiente forma:

COMPARTIMIENTO	REPRESENTANTE
Células cepa	CFU-S
Precursos Comprometidos	CFU-GM BFU-E
Células maduras	Leucocitos Hematocrito

El protocolo utilizado se muestra en la Figura 26. A los días 1, 5, 9 y 15 después de la administración de AM5, se cuantificaron los niveles de precursores y células mencionados, tanto en médula ósea como en bazo y sangre periférica. En todos los casos se analizó en paralelo un lote de ratones control, inyectado con un volumen equivalente de solución salina.



**Figura 26:** Protocolo para evaluar la respuesta hematopoyética tras el tratamiento con AM5 en ratones no irradiados.

#### 4.2.2.1.- Celularidad.

Como se observa en la Figura 27, la celularidad del bazo de ratones tratados con AM5 aumentó progresivamente, alcanzando un máximo en el día 9 post-tratamiento (135% en relación al valor control), descendiendo a valores normales el día 15 post-tratamiento. En cuanto a la celularidad de médula ósea, no se observaron diferencias significativas como consecuencia del tratamiento con AM5, durante el período de tiempo estudiado (Figura 27).

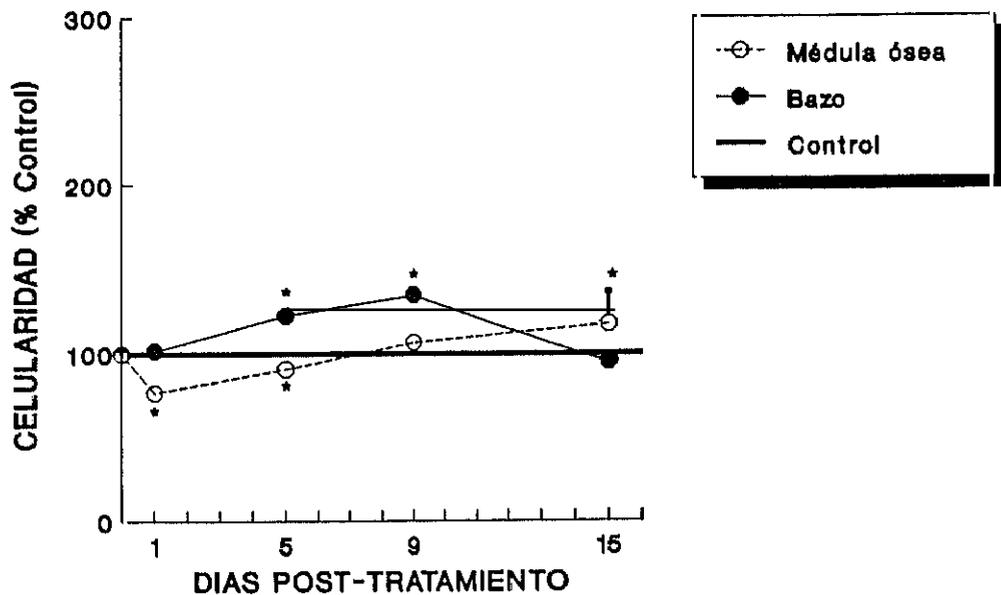


Figura 27: Cinética de celularidad total en médula ósea y bazo de ratones no irradiados, tras el tratamiento con AM5. (\*)  $p < 0,05$ .

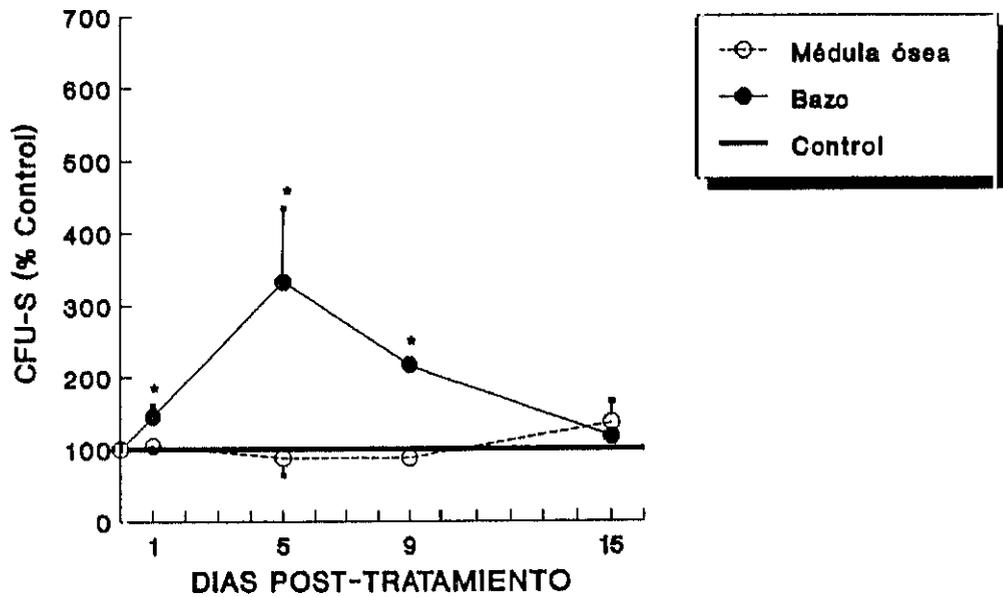
#### 4.2.2.2.- Precusores pluripotentes.

El efecto estimulador del AM5 sobre los precusores pluripotentes (CFU-S) de bazo (Figura 28), se puso de manifiesto ya en el día 1 post-tratamiento, aunque fue en el día 5 cuando la estimulación fue máxima, alcanzándose valores del 330% respecto al valor control. A partir del día 5, los niveles de CFU-S en bazo de ratones tratados disminuyeron, alcanzando valores próximos al control el día 15.

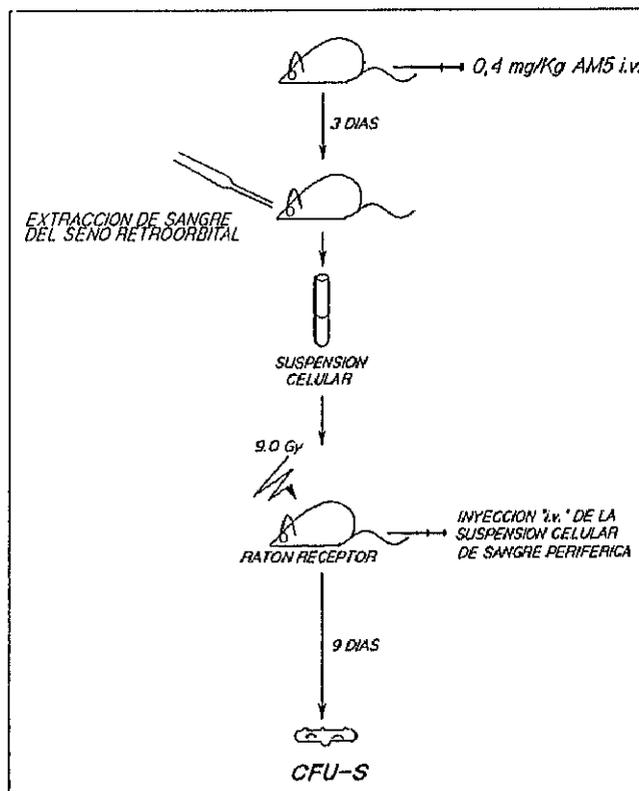
Por el contrario, durante el período de tiempo estudiado, el tratamiento con AM5 no modificó los niveles de precusores pluripotentes de médula ósea (Figura 28).

Puesto que el hecho de no observarse incremento en el número de CFU-S en médula ósea tras el tratamiento con AM5, podría deberse a una migración de precusores desde este órgano a otros focos hematopoyéticos, se estudió el efecto de la administración de AM5 (0,4 mg/Kg) sobre los valores de precusores pluripotentes (CFU-S) en sangre periférica 3 días después del tratamiento, comparándose los resultados con los de un lote control tratado con volúmenes equivalentes de solución salina (Figura 29).

Los resultados mostraron un fuerte incremento en el número de CFU-S en sangre periférica como consecuencia del tratamiento con AM5, alcanzándose valores del 265% en relación a los obtenidos en ratones control (Tabla VIII).



**Figura 28:** Cinética seguida por los precursores pluripotentes (CFU-S) en médula ósea y bazo, tras el tratamiento con AM5, en ratones no irradiados. (\*)  $p < 0,05$ .



**Figura 29:** Protocolo para evaluar el efecto del AM5 sobre el número de CFU-S en sangre periférica de ratones no irradiados.

EXPERIMENTO	GRUPO	CFU-S/10 <sup>6</sup> CELULAS	% DEL VALOR CONTROL
1	CONTROL	2,5 ± 0,3	350 *
	AM5	8,7 ± 1,5	
2	CONTROL	3,3 ± 0,7	206 *
	AM5	6,7 ± 0,2	
3	CONTROL	2,1 ± 0,2	305 *
	AM5	6,3 ± 0,6	
4	CONTROL	2,2 ± 0,2	220 *
	AM5	4,9 ± 0,6	
MEDIA	CONTROL	2,5 ± 0,3	264 *
	AM5	6,6 ± 0,8	

Tabla VIII: Contenido de CFU-S en sangre periférica tras el tratamiento con AM5. (\*) p < 0,05.

4.2.2.3.- Precursores comprometidos.

Las poblaciones de precursores comprometidos, tanto de la línea granulo-macrofágica (CFU-GM) (Figura 30) como eritroide (BFU-E) (Figura 31), se vieron fuertemente estimuladas en el bazo de ratones tratados con AM5, alcanzándose de nuevo 5 días post-tratamiento los valores máximos, que correspondieron a un 510% para las CFU-

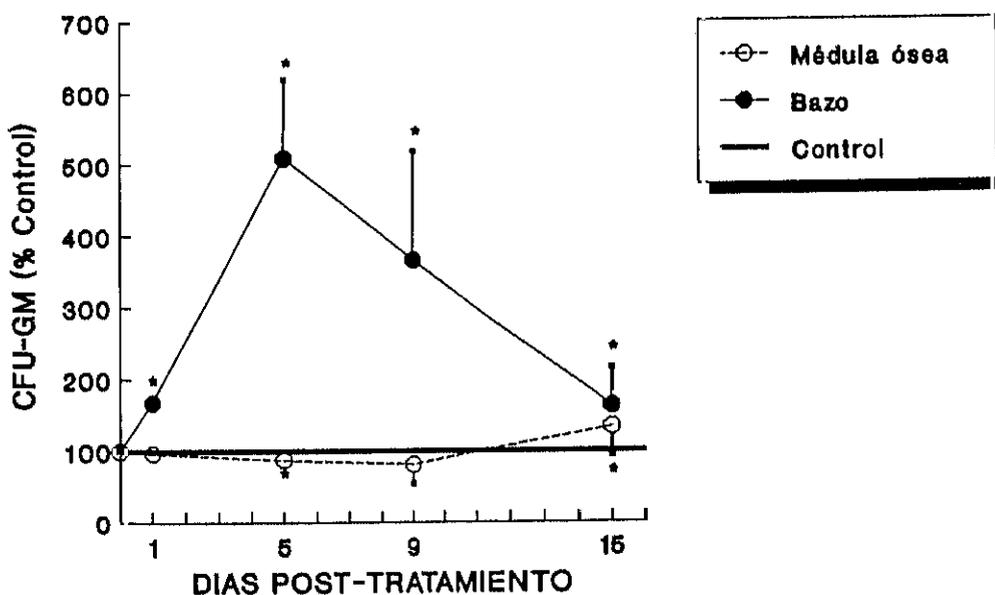


Figura 30: Cinética de precursores CFU-GM en médula ósea y bazo de ratones no irradiados, tras el tratamiento con AM5. (\*) p < 0,05.

GM y a un 430% para las BFU-E, respecto a los valores control. Nuevamente, en días posteriores la estimulación fue disminuyendo alcanzándose valores cercanos al control 15 días después del tratamiento.

Al igual que en el caso de la CFU-S, los niveles de CFU-GM en médula ósea no se vieron incrementados como consecuencia del tratamiento con AM5 (Figura 30), observándose un descenso significativo en el número de BFU-E el día 5 post-tratamiento, si bien en el día 9 este precursor volvía a valores control (Figuras 31).

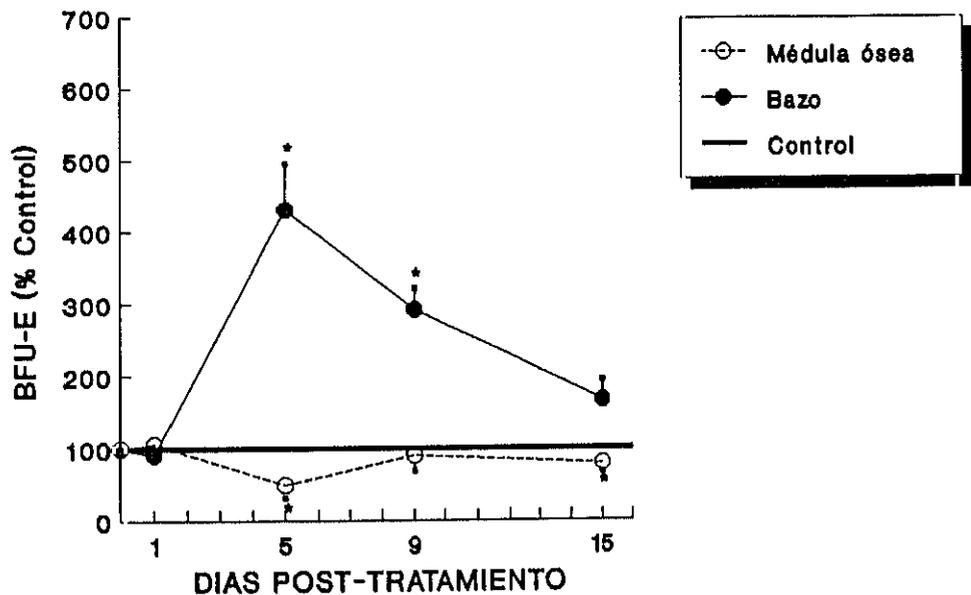
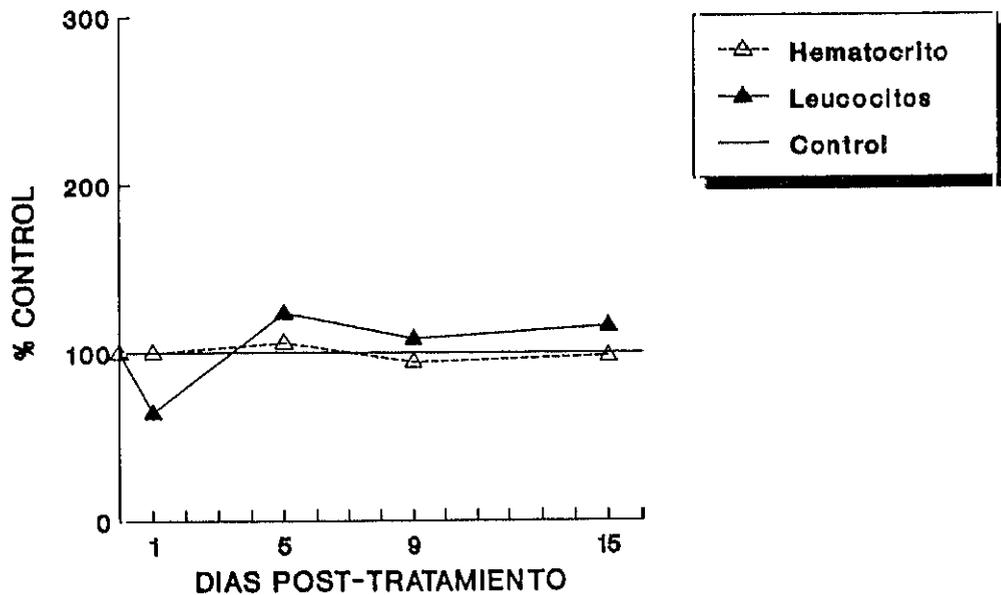


Figura 31: Cinética de precursores BFU-e en médula ósea y bazo de ratones no irradiados tras el tratamiento con AM5. (\*)  $p < 0,05$ .

#### 4.2.2.4.- Células maduras circulantes.

En lo que respecta al compartimento de células maduras, los valores de hematocrito y leucocitos en sangre periférica de ratones tratados con AM5, se mantuvieron en torno al valor control durante el período de tiempo estudiado, no siendo significativas las diferencias observadas (Figura 32).



**Figura 32:** Cinética seguida por las células circulantes de ratones no irradiados tratados con AM5.

#### 4.2.3.- Influencia del contenido residual de endotoxina presente en la muestra, en la estimulación hematopoyética inducida por AM5.

El proceso de obtención del AM5, como el de otros compuestos similares, no permite eliminar totalmente la contaminación por endotoxina (LPS), y aunque las concentraciones de LPS en la muestra de AM5 sean puramente residuales, al estar la endotoxina decrita como un potente estimulador de la hematopoyesis (Quesenberry y col, 1973; Lahiri, 1976), fue necesario comprobar que los efectos descritos para el AM5 no eran debidos al LPS residual presente en la muestra.

Con objeto de descartar esta posibilidad, se realizaron dos tipos de experimentos:

- Análisis de precursores hematopoyéticos en ratones tratados con endotoxina (LPS) a dosis similares o superiores a las presentes en las muestras de AM5.
- Análisis de precursores hematopoyéticos en ratones tratados con AM5 sometido a un tratamiento hipertérmico.

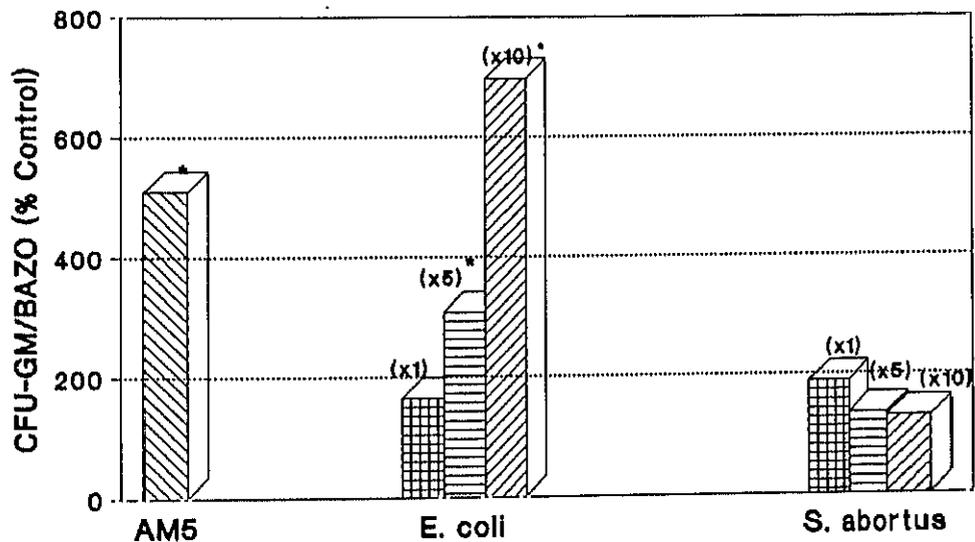
La imposibilidad de obtener muestras de LPS del propio AM5 nos obligó a utilizar LPSs comerciales (Escherichia coli y Salmonella abortus) (Sigma).

4.2.3.1.- Estimulación hematopoyética en ratones no irradiados, tras el tratamiento con endotoxina (LPS).

Ratones híbridos F1(C57BlxBalb/C) fueron inyectados con distintas concentraciones de LPS de E. coli o S. abortus, determinándose 5 días post-tratamiento el contenido de CFU-GM en bazo.

Las dosis de LPS utilizadas fueron equivalentes al LPS existente en la dosis de AM5 administrada (datos facilitados por Laboratorios Andrómaco), así como cinco y diez veces ésta.

La inyección de LPS de E. coli, a la concentración presente en nuestras muestras ó 5 veces superior, no incrementó los valores de CFU-GM en bazo por encima de los valores obtenidos con AM5. Con concentraciones de LPS 10 veces mayores, se consiguieron valores de CFU-GM mayores a los obtenidos tras el tratamiento con 0,4 mg/Kg de AM5 (Figura 33).



**Figura 33:** Efecto de la administración de LPS sobre la hematopoyesis esplénica de ratones híbridos. (x1) representa la dosis de LPS equivalente a la presente en 0,4 mg/Kg de AM5. (\*)  $p < 0,05$ .

La respuesta hematopoyética fue dependiente del tipo de endotoxina administrada, puesto que en el caso del LPS de S. abortus, su efecto sobre los valores de CFU-GM esplénicos fueron siempre muy inferiores al observado con AM5 (Figura 33).

El mismo protocolo experimental se utilizó con ratones poco respondedores a endotoxina C3H/HeJ.

Como se muestra en la Figura 34, el tratamiento con AM5 incrementó de forma significativa el número de CFU-GM esplénicas en ratones C3H/HeJ, si bien el incremento alcanzado fue algo inferior al conseguido en ratones híbridos (C57Blx-Balb/C) (Figura 33). Con LPS de *E. coli*, sólo dosis 10 veces superiores a la presente en el AM5 produjeron un incremento significativo y similar al obtenido con éste.

El LPS de *S. abortus* (Figura 34) no fue capaz de estimular la hematopoyesis esplénica en ratones poco respondedores a endotoxina, a ninguna de las concentraciones ensayadas, produciendo incluso un descenso significativo en los valores de CFU-GM a dosis x10.

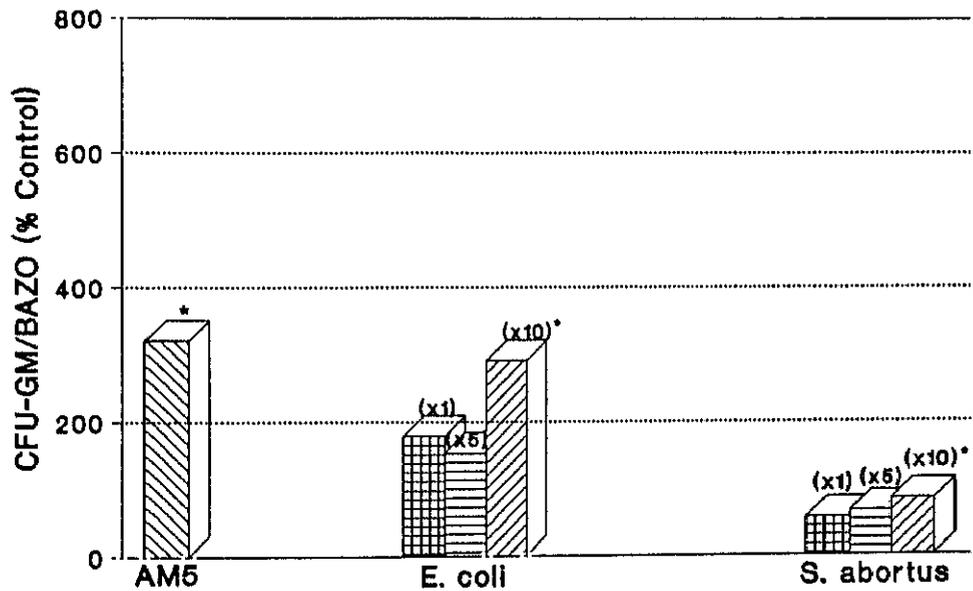


Figura 34: Efecto de la administración de LPS sobre la hematopoyesis esplénica de ratones C3H/HeJ. (\*)  $p < 0,05$ .

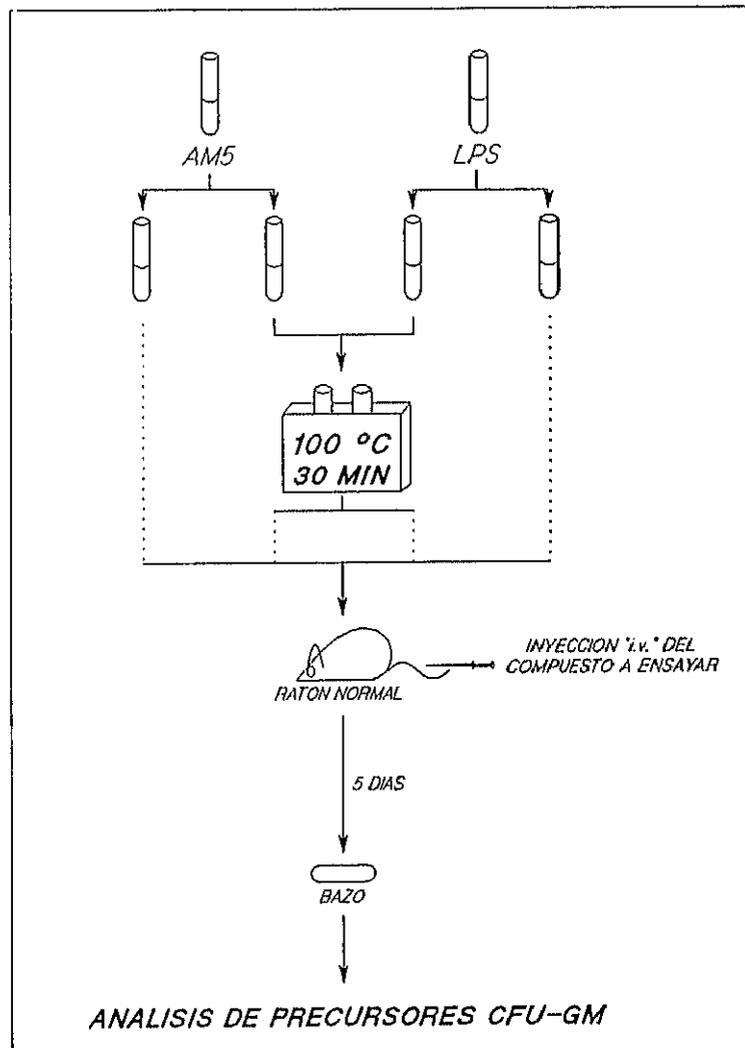
Aunque estos resultados sugerían que el efecto estimulador del AM5 sobre el sistema hematopoyético, no era debido a la endotoxina residual presente en la muestra, la variabilidad de la respuesta observada en función del tipo de LPS no permitió descartar totalmente su implicación.

Los experimentos que se describen a continuación, tenían por objeto ofrecer una confirmación concluyente sobre la no mediación de la endotoxina en el efecto estimulador del AM5 sobre el sistema hematopoyético.

4.2.3.2.- Estimulación hematopoyética en ratones no irradiados tratados con AM5 sometido a tratamiento hipertérmico.

Está descrito que el LPS es altamente resistente a tratamientos térmicos. Para su inactivación se requieren temperaturas muy elevadas, del orden de 180-200°C (Tsuji y Harrison, 1978; Avis y col, 1987).

Por tanto, si mediante un tratamiento térmico a temperaturas inferiores a éstas, en donde el LPS no va a ser inactivado, se consigue una inactivación del AM5, perdiendo éste su capacidad para estimular la hematopoyesis esplénica en ratones no irradiados, se podría concluir que el LPS no interviene en los efectos atribuidos al AM5.



**Figura 35:** Protocolo para el estudio del efecto del tratamiento con AM5 sometido a tratamiento hipertérmico, sobre la hematopoyesis esplénica de ratones no irradiados.

Así, la muestra de AM5 fue sometida a un tratamiento hipertérmico (30 minutos 100°C), determinándose posteriormente si la muestra era capaz de inducir estimulación hematopoyética en bazo de ratones no irradiados. Como en casos anteriores, los análisis de precursores hematopoyéticos se realizaron 5 días después de la inyección "i.v." de la muestra (Figura 35).

Como se observa en la Tabla IX, el tratamiento térmico (100°C 30 minutos), provocó una inactivación del AM5, perdiendo éste su capacidad para estimular la hematopoyesis esplénica de ratones no irradiados. El porcentaje de CFU-GM 5 días después de la administración de AM5 sometido al tratamiento con calor fue del 128%, frente a 439% cuando el AM5 no había sido sometido al tratamiento térmico. Por el contrario, el mismo tratamiento térmico, no afectó la capacidad del LPS (*E. coli*) para estimular la hematopoyesis esplénica, con valores de CFU-GM respecto al control de 330% y 410% con LPS no tratado o sometido al tratamiento hipertérmico respectivamente (Tabla IX).

Estos resultados permiten afirmar que el efecto estimulador del AM5, no se debe a la contaminación residual de endotoxina presente en la muestra.

TRATAMIENTO	CELULAS/BAZO (x10 <sup>-6</sup> )	CFU-GM/BAZO (x10 <sup>-3</sup> )
CONTROL	208,7 ± 11,5	3,5 ± 0,3
AM5	237,7 ± 23,3 (114)	15,3 ± 1,0 (439)*
AM5 30 Min 100 °C	204,9 ± 20,4 ( 98)	4,5 ± 0,8 (128)
LPS (x5)	233,7 ± 16,7 (112)	11,6 ± 1,4 (334)*
LPS (x5) 30 Min 100 °C	234,7 ± 26,6 (112)	12,2 ± 2,0 (408)*

**Tabla IX:** Efecto del tratamiento con AM5 y LPS, sometidos a tratamiento hipertérmico, sobre la hematopoyesis esplénica de ratones no irradiados. (\*) p < 0,05.

#### 4.2.4.- Efecto de la administración de AM5 sobre la hematopoyesis de ratones irradiados.

Los resultados obtenidos sobre el efecto del AM5 a nivel tanto de colonias endógenas en bazo, como de precursores hematopoyéticos en ratones no irradiados, sugerían una potencial capacidad radioprotectora de este compuesto.

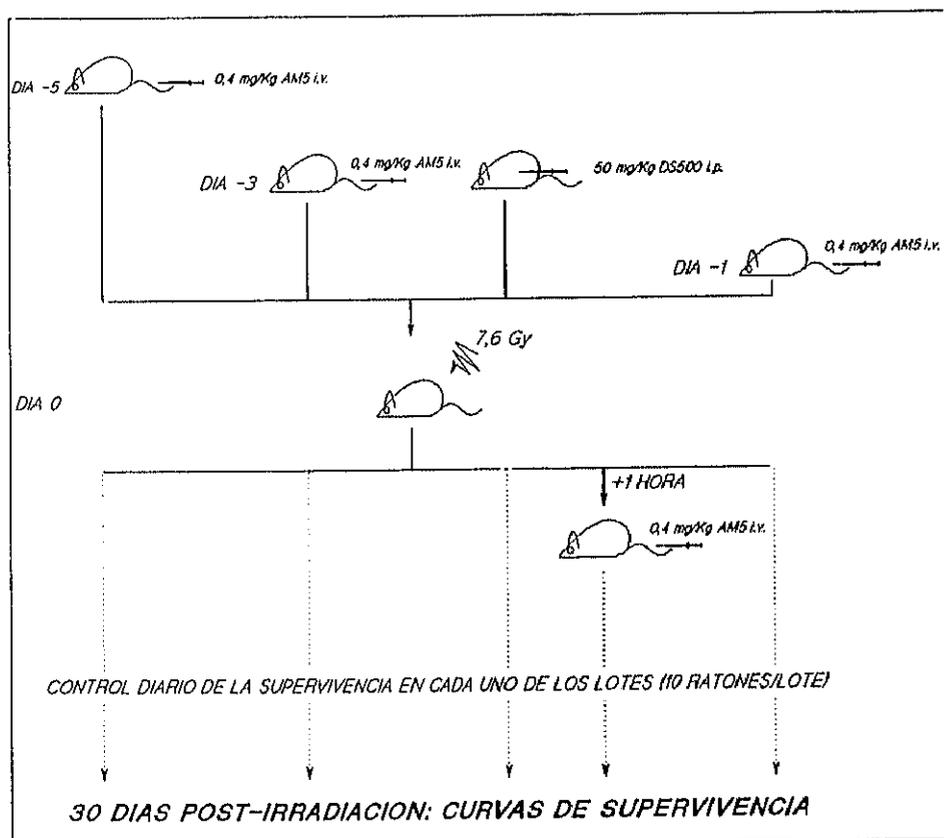
El análisis de esta capacidad se abordó mediante estudios tanto de supervivencia en animales sometidos a dosis potencialmente letales de radiación, como de recuperación hematopoyética en animales subletalmente irradiados.

#### 4.2.4.1.- Efecto del AM5 sobre la supervivencia de ratones irradiados con dosis potencialmente letales.

Los experimentos descritos en este apartado tenían como objetivo comprobar si el AM5 era capaz de aumentar la supervivencia del animal, cuando éste había recibido una irradiación potencialmente letal.

Los protocolos de administración empleados en los estudios de supervivencia, fueron seleccionados en base tanto a los resultados obtenidos en ratones no irradiados tratados con AM5, como a resultados descritos de la bibliografía.

Ratones macho F1(C57BlxBalb/C) de 12 semanas de edad, irradiados con 7,6 Gy (LD90/30), fueron tratados vía "i.v." con 0,4 mg/Kg de AM5, 5, 3 ó 1 día antes ó 1 hora después de la irradiación (Figura 36).



**Figura 36:** Protocolo para evaluar el efecto del tratamiento con AM5 sobre la supervivencia de ratones irradiados con dosis potencialmente letales.

Cada experimento contó con un lote control, irradiado con la misma dosis e inyectado con solución salina, así como con un lote control positivo el cual fue tratado 3 días antes de la irradiación con 50 mg/Kg de dextrán sulfato (DS500) (Sigma), administrado intraperitonealmente. Está descrito que este protocolo de administración del DS500, incrementa la supervivencia frente a irradiación potencialmente letal (Ross y Peeke, 1986b).

El tratamiento con AM5 una hora después de la irradiación no incrementó los niveles de supervivencia de los ratones irradiados (Figura 37).

Los lotes que habían sido tratados con 0,4 mg/Kg de AM5 3 ó 5 días antes de la irradiación, mostraron una supervivencia muy similar (12-18%) a la del lote control (10%) (Figura 37). Sin embargo, la administración de 0,4 mg/Kg de AM5 1 día antes de la irradiación, tuvo como resultado un fuerte incremento de la supervivencia. En estas condiciones, sobrevivieron el 90% de los animales irradiados con una dosis con la que sólo un 10% de los ratones no tratados sobrevivió (Figura 37).

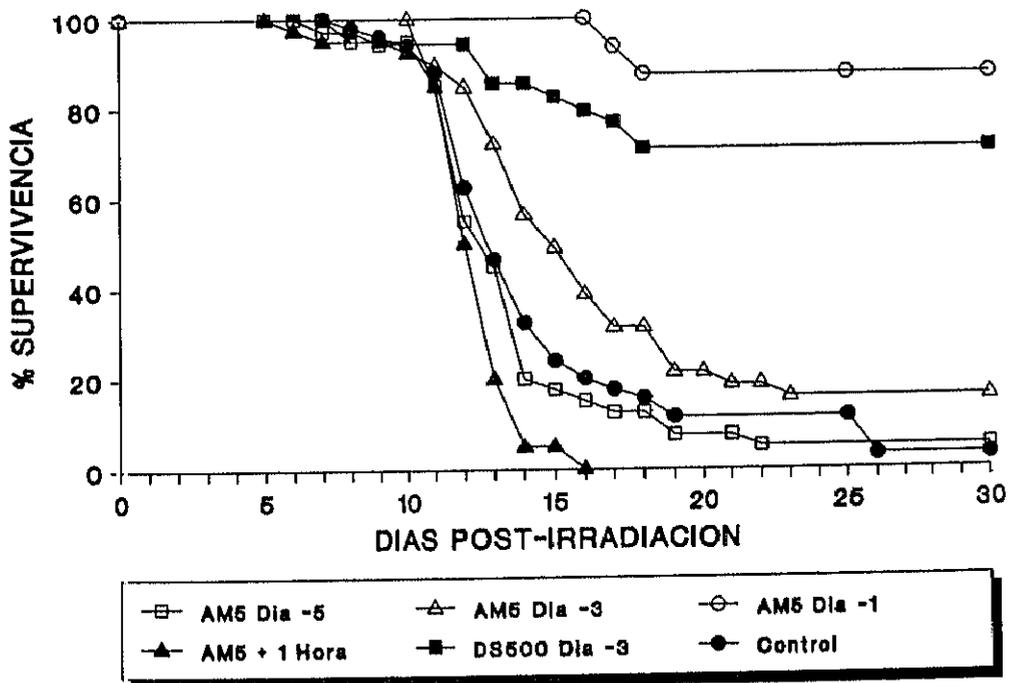


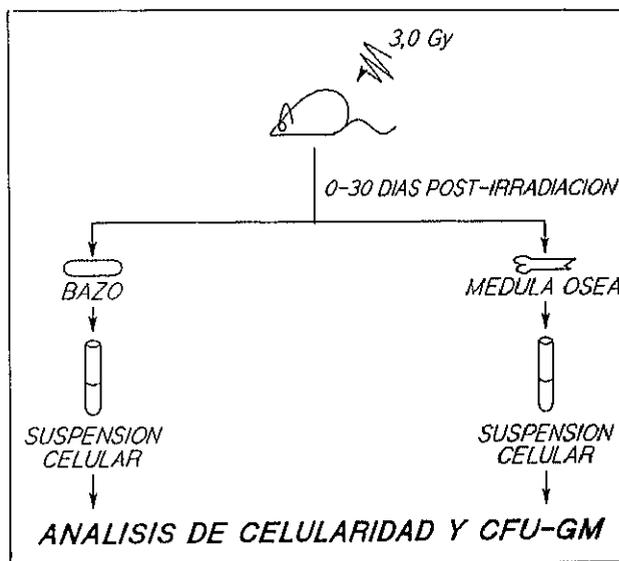
Figura 37: Supervivencia de animales tratados con AM5 y sometidos a una irradiación potencialmente letal.

#### 4.2.4.2.- Efecto del tratamiento con AM5 sobre la recuperación hematopoyética tras una irradiación subletal.

Una vez demostrada la capacidad del AM5 para aumentar la supervivencia de animales sometidos a dosis de radiación potencialmente letales, nos propusimos

determinar si el tratamiento con AM5 era capaz de estimular la recuperación de precursores hematopoyéticos en animales irradiados.

La brusca caída en los niveles de precursores que tiene lugar en ambos órganos hematopoyéticos tras la irradiación, descenso que es proporcional a la dosis de radiación administrada, nos impidió realizar estos estudios en animales sometidos a dosis potencialmente letales, ya que con ellas los análisis de precursores no podrían realizarse hasta muchos días después de la irradiación, lo que nos indujo a utilizar dosis subletales.



**Figura 38:** Protocolo para el estudio de la recuperación hematopoyética espontánea, tras una irradiación subletal.

Previamente al estudio de la recuperación hematopoyética en ratones tratados con AM5, se establecieron las cinéticas de recuperación espontánea a nivel de celularidad y CFU-GM tanto en médula ósea como en bazo de ratones irradiados con 3,0 Gy (Figura 38). Los análisis se realizaron distintos días post-irradiación, hasta los 30 días, momento en el que la recuperación hematopoyética está estabilizada.

En ambos órganos hematopoyéticos el número de células disminuyó drásticamente el primer día post-irradiación, iniciándose posteriormente una recuperación que alcanzó los valores normales alrededor del día 13 (Figura 39).

La irradiación con 3,0 Gy tuvo un efecto sobre los precursores (CFU-GM) muy similar al mostrado sobre celularidad, si bien su reducción tras la irradiación fue mayor, hasta tal punto que en bazo no fue posible experimentalmente cuantificar el número de precursores presentes hasta 6 días post-irradiación. A diferencia de la celularidad y los precursores CFU-GM de médula ósea, que 13 días después de la

irradiación ya mostraron niveles próximos al control, los precursores CFU-GM en bazo aún estaban al 80% del valor control 30 días post-irradiación (Figura 40).

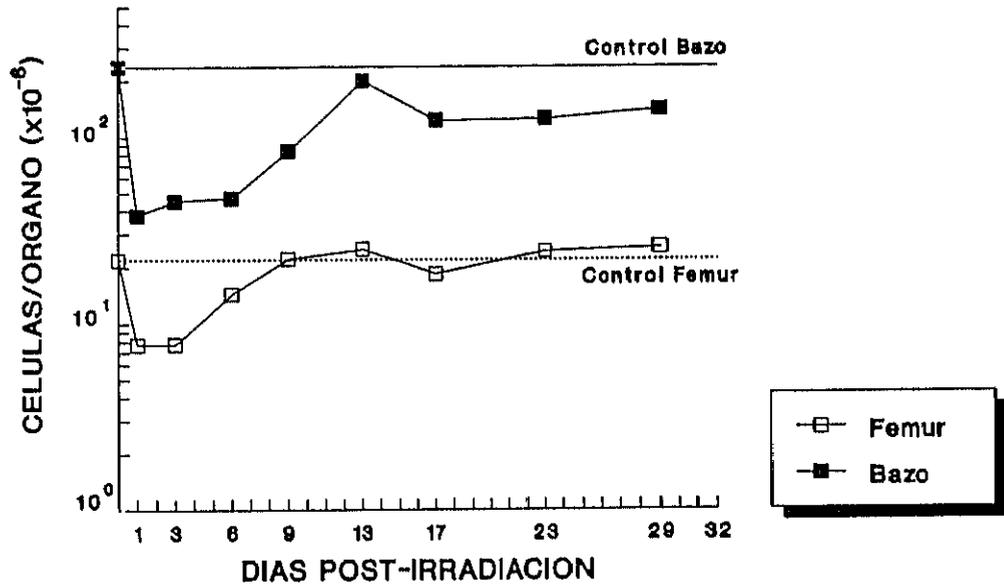


Figura 39: Cinética de recuperación espontánea de la celularidad de médula ósea y bazo tras una irradiación subletal con 3,0 Gy.

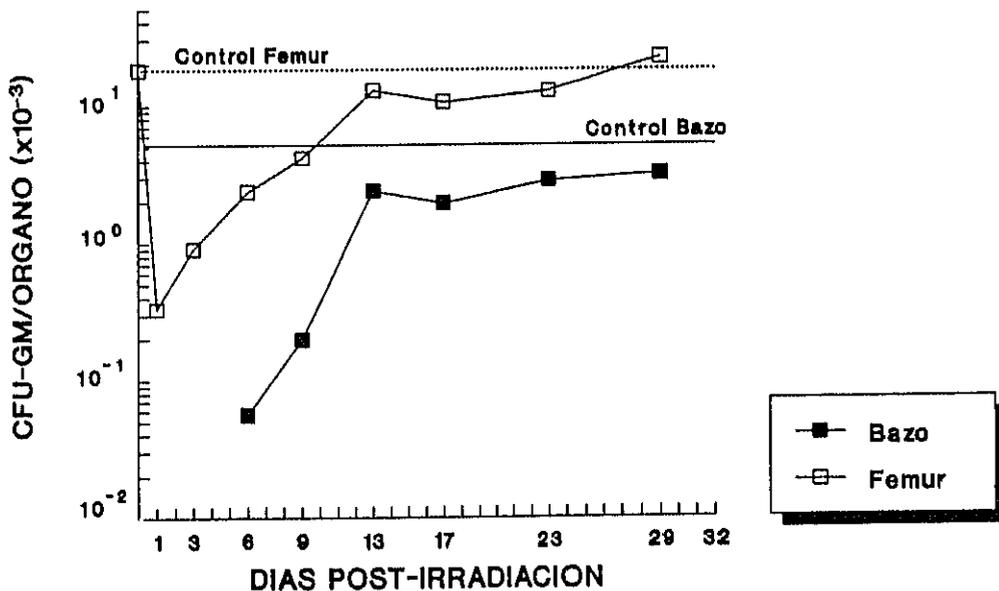
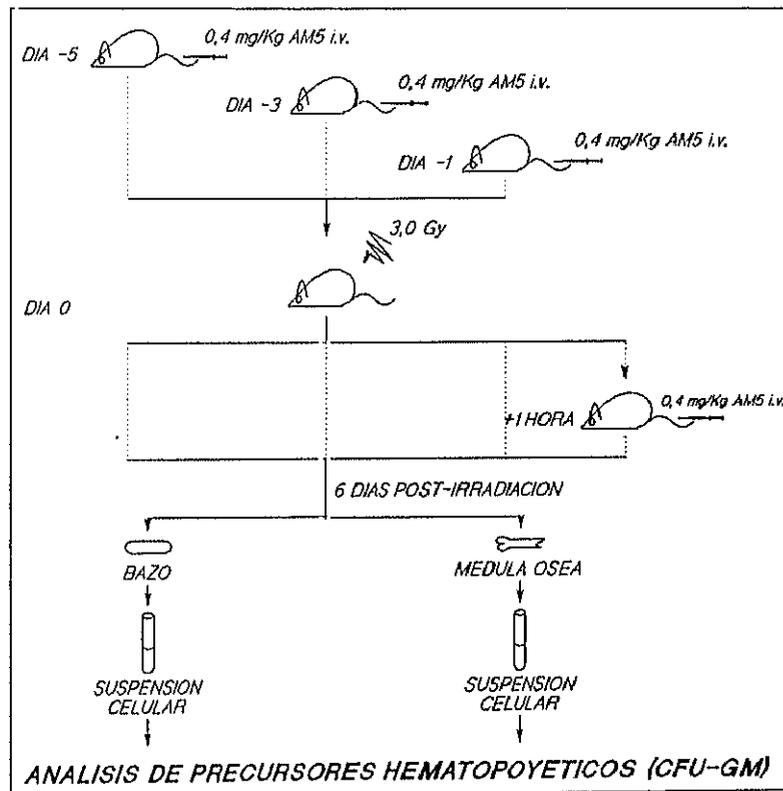


Figura 40: Cinética de recuperación espontánea de precursores CFU-GM de médula ósea y bazo, tras una irradiación subletal con 3,0 Gy.

Posteriormente, se evaluó el efecto del tratamiento con AM5 sobre la recuperación tanto de la celularidad como de precursores comprometidos, en médula ósea y bazo de ratones sometidos a una irradiación subletal de 3,0 Gy.

A la vista de los resultados anteriores, el análisis del efecto del AM5 sobre la recuperación hematopoyética de ratones irradiados subletalmente se realizó 6 días después de la irradiación. Por un lado, en este día es posible experimentalmente cuantificar la población de CFU-GM en ambos órganos. Por otro, el análisis debe realizarse antes de que la recuperación espontánea de dichos precursores alcance valores próximos al control (zona de plató) puesto que ello dificultaría la detección del posible efecto estimulador del AM5.



**Figura 41:** Protocolo para el estudio del efecto del AM5 sobre la recuperación hematopoyética en ratones sometidos a una irradiación subletal.

A ratones F1(C57BlxBalb/C) se les administró vía "i.v." 0,4mg/Kg de AM5 5, 3 ó 1 día antes ó 1 hora después de la irradiación. Las pautas de administración utilizadas fueron las mismas que en los estudios de supervivencia. Al lote control se le inyectó solución salina 1 hora post-irradiación. A los 6 días después de la irradiación, se determinó la celularidad y contenido de CFU-GM tanto en médula ósea como en bazo (Figura 41).

La administración de AM5, 3 días antes de la irradiación fue la única pauta de tratamiento que incrementó significativamente la recuperación de los precursores CFU-GM en médula ósea (130% el valor del control irradiado) (Tabla X).

Sin embargo, la recuperación de CFU-GM en bazo se vió incrementada cuando el tratamiento con AM5 se llevó a cabo tanto 3 como 1 día antes de la irradiación. Además, y al igual que en apartados anteriores, la respuesta esplénica fue mayor que la medular, con valores de CFU-GM en bazo de 250% en relación al control irradiado, cuando el AM5 se administró 3 días antes de la irradiación y de 290% cuando el tratamiento se realizó 1 día antes (Tabla X).

La administración de AM5, 5 días antes ó 1 hora después de la irradiación, no produjo incrementos significativos en la población de CFU-GM ni en médula ósea ni en bazo.

TRATAMIENTO	MEDULA OSEA		BAZO	
	CELULARIDAD (x10 <sup>-6</sup> )	CFU-GM/FEMUR (x10 <sup>-3</sup> )	CELULARIDAD (x10 <sup>-6</sup> )	CFU-GM/BAZO
CONTROL	17,7 ± 0,7	2,2 ± 0,3	60,5 ± 3,9	81,4 ± 20,0
AM5 (-5d)	17,6 ± 0,5 ( 99)	2,8 ± 0,5 (125)	52,2 ± 3,6 ( 86)	72,8 ± 11,7 ( 89)
AM5 (-3d)	18,5 ± 0,6 (104)	2,9 ± 0,4 (131)*	59,2 ± 2,9 ( 98)	205,9 ± 64,0 (253)*
AM5 (-1d)	16,7 ± 0,5 ( 94)	2,3 ± 0,4 (102)	46,7 ± 2,2 ( 77)*	237,4 ± 75,0 (291)*
AM5 (+1 h)	12,8 ± 0,4 ( 72)*	2,1 ± 0,4 ( 95)	42,3 ± 2,2 ( 70)*	117,5 ± 29,0 (144)

**Tabla X:** Efecto del tratamiento con AM5 sobre la recuperación hematopoyética en ratones subletalmente irradiados. Entre paréntesis se indican los datos como % respecto al valor control irradiado. (\*) p < 0,05.

#### 4.2.5.- Efecto del tratamiento "in vitro" con AM5 sobre la hematopoyesis en cultivos de larga duración de médula ósea.

Como hemos expuesto, el tratamiento "in vivo" con AM5 produce un fuerte incremento de la hematopoyesis esplénica en ratones no irradiados, mientras que la hematopoyesis medular no se ve afectada. En virtud de los resultados obtenidos en sangre periférica, que sugieren la existencia de fenómenos de migración de precursores desde la médula, nos planteamos determinar la posibilidad de que el AM5

podiera estimular la hematopoyesis medular en un sistema cerrado, sin posibilidad de migración, como son los cultivos de larga duración de médula ósea (LTBMC).

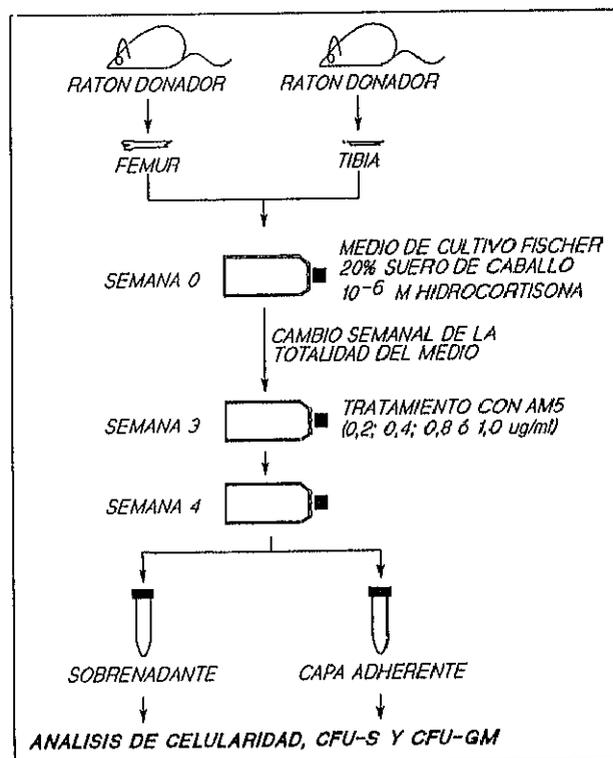
Además, un modelo biológico como el LTBMC constituye un sistema idóneo para profundizar en los mecanismos de acción implicados en la respuesta hematopoyética frente a la administración de un determinado compuesto, en nuestro caso el AM5.

Al ser un sistema "in vitro", el número de variables que intervienen es siempre menor que "in vivo", y en cualquier caso, son siempre más fácilmente controlables por el operador.

Recordemos, que el cultivo de larga duración de médula ósea reproduce "in vitro" la hematopoyesis medular por períodos superiores a 40 semanas, lo que permite cuantificar periódicamente los procesos de proliferación y diferenciación seguidos por los distintos precursores hematopoyéticos, y por tanto evaluar la respuesta hematopoyética a un determinado compuesto.

#### 4.2.5.1.- Relación dosis-efecto.

En este contexto, los primeros estudios fueron dirigidos a determinar la relación entre la dosis de AM5 añadida al cultivo y el efecto estimulador producido.



**Figura 42:** Protocolo para evaluar la relación dosis de AM5 administrada "in vitro" al LTBMC, y estimulación hematopoyética producida.

El protocolo experimental utilizado se muestra en la Figura 42. Tres semanas después de establecido el cultivo, momento en el que la capa adherente ya constituye un microambiente hematopoyético, se realizó el tratamiento "in vitro" con AM5 (0,2; 0,4; 0,8 ó 1,0  $\mu\text{g/ml}$ ) coincidiendo con el cambio de medio. Una semana después, se cuantificaron los niveles de precursores hematopoyéticos (CFU-S y CFU-GM) así como la celularidad total, tanto de la capa adherente o estroma, como de la capa no adherente o sobrenadante de los cultivos.

Como se muestra en la Figura 43, a medida que se incrementó la concentración de AM5 administrada, la celularidad del sobrenadante aumentó, alcanzándose el máximo con 1,0  $\mu\text{g/ml}$  (240% respecto al control). Por el contrario, la celularidad de la capa adherente disminuyó al incrementar la dosis de AM5 alcanzando valores del 40% respecto al control con dosis de 0,8 y 1,0  $\mu\text{g/ml}$ . Cuando se consideró la celularidad total de la botella (sobrenadante + capa adherente), estos efectos se contrarrestaron debido a las diferencias de densidad celular en ambos componentes del cultivo, no observándose cambios significativos con respecto al control como consecuencia del tratamiento con AM5 (Figura 44).

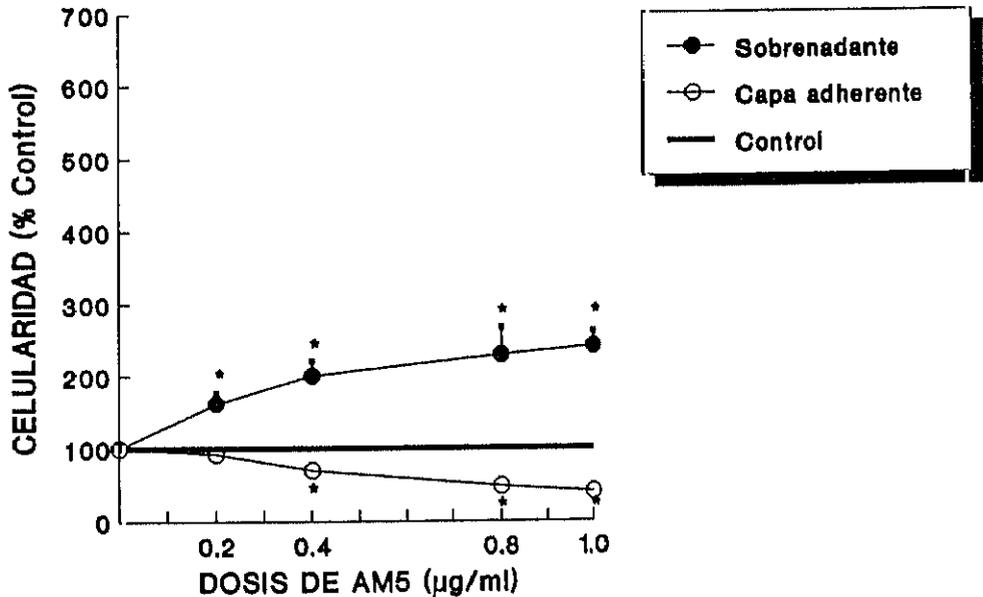
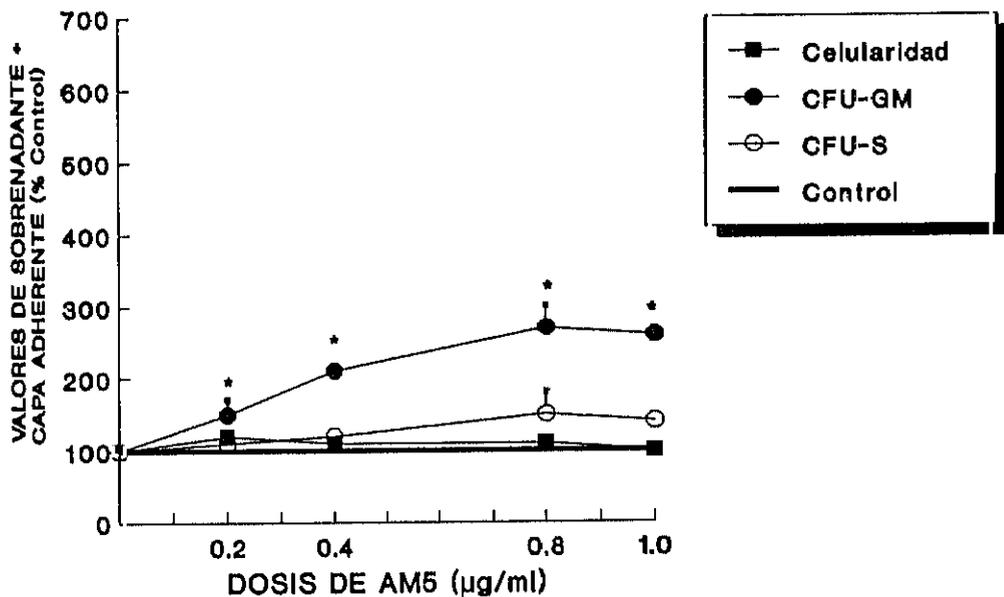


Figura 43: Efecto del tratamiento "in vitro" con AM5 sobre la celularidad del LTBM. (\*)  $p < 0,05$ .



**Figura 44:** Efecto del tratamiento "in vitro" con AM5 sobre la hematopoyesis de LTBM: celularidad, CFU-S y CFU-GM por botella. (\*)  $p < 0,05$ .

En cuanto a los precursores pluripotentes (CFU-S) (Figura 45), a medida que se aumentó la dosis de AM5 se observó un incremento progresivo de los mismos en el sobrenadante, alcanzándose valores de 240% y 250%, con respecto al control, a dosis de 0,8 y 1,0  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. A diferencia de lo que ocurrió con la celularidad, los niveles de CFU-S no sólo no decrecieron en la capa adherente como consecuencia del tratamiento con AM5, sino que con dosis de 0,8  $\mu\text{g/ml}$  aumentaron (130%) aún cuando el número de células era sólo del 40% respecto al control. A estas dosis de AM5 (0,8  $\mu\text{g/ml}$ ) los valores de CFU-S por frasco aumentaron a un 150% (Figura 44).

Al igual que en el caso de los precursores pluripotentes, el número de precursores comprometidos hacia la línea granulo-macrofágica (CFU-GM) aumentó en función de la dosis de AM5, alcanzando valores máximos tanto en el sobrenadante como en la capa adherente, tras un tratamiento con 0,8  $\mu\text{g/ml}$  de AM5 (545% y 235% respectivamente) (Figura 46). Asimismo, los niveles de CFU-GM por botella también aumentaron (270%) tras 0,8  $\mu\text{g/ml}$  de AM5 (Figura 44).

Estos resultados confirmaban la capacidad del AM5 para estimular la hematopoyesis medular y ponían de manifiesto una relación entre dosis de AM5 administrada "in vitro" al cultivo y el factor de estimulación hematopoyético observado en el sobrenadante, tanto a nivel de precursores pluripotentes como comprometidos. Sin

embargo, no se observó esta relación cuando se analizó la hematopoyesis en la capa adherente.

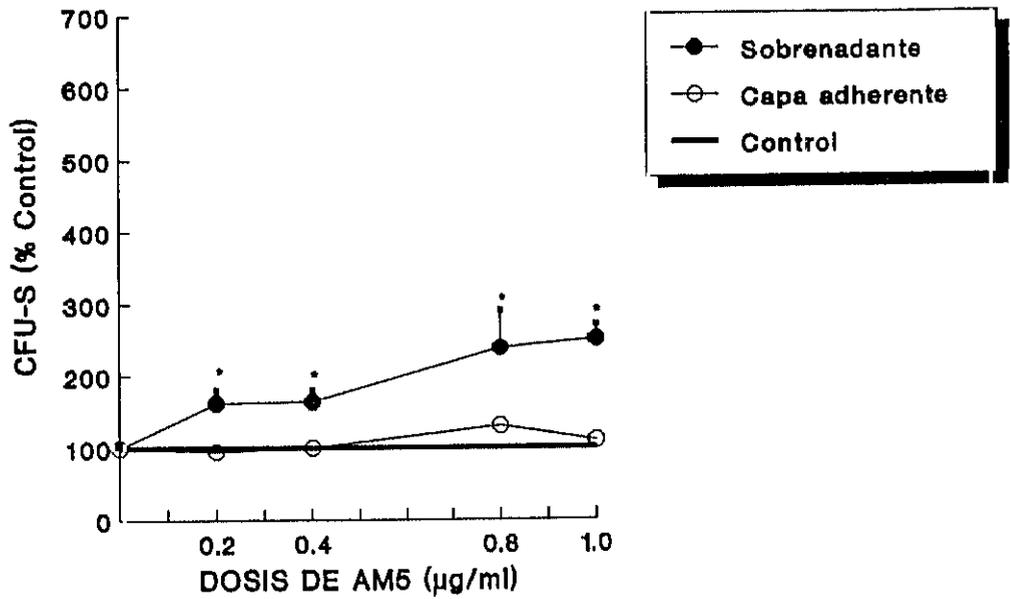


Figura 45: Efecto del tratamiento "in vitro" con AM5 sobre el contenido de CFU-S en LT BMC. (\*)  $p < 0,05$ .

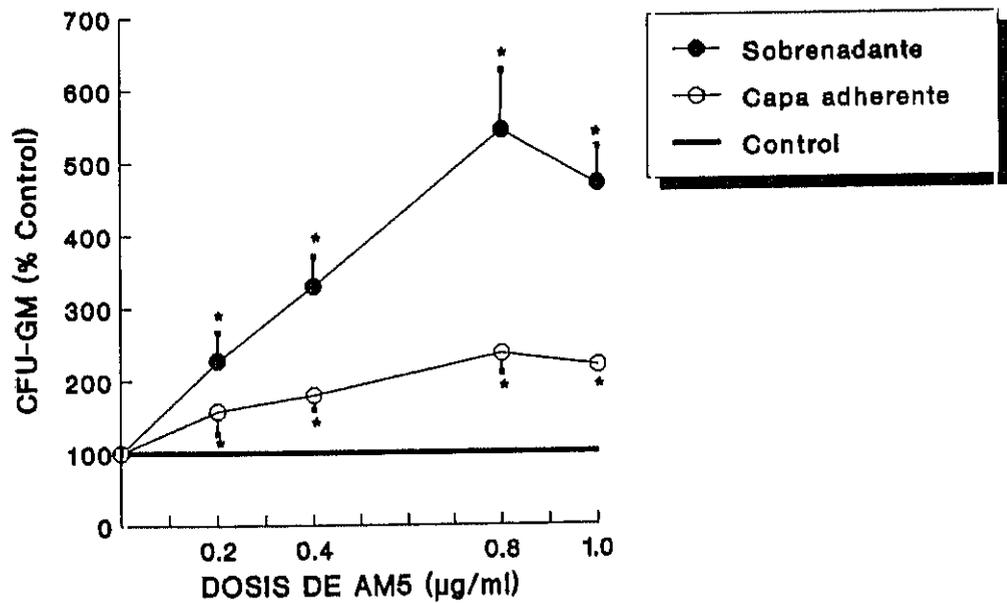


Figura 46: Efecto del tratamiento "in vitro" con AM5 sobre el contenido de CFU-GM en el LT BMC. (\*)  $p < 0,05$ .

4.2.5.2.- Efecto del tratamiento con múltiples dosis de AM5, sobre la hematopoyesis de LT BMC.

Una vez demostrada la capacidad del AM5 para estimular la hematopoyesis en LT BMCs, nos propusimos evaluar el efecto que la administración de múltiples dosis de AM5 tenía sobre la hematopoyesis de dicho cultivo.

La presencia de una relación dosis-respuesta entre concentración de AM5 y estimulación, sugería que la administración de múltiples dosis podría conducir a una mayor estimulación hematopoyética. Pero por el contrario, la pérdida de celularidad en la capa adherente, también dependiente de la dosis, podría contrarrestar este incremento por "agotamiento" prematuro del cultivo.

Coincidiendo con el cambio de medio, se realizó el tratamiento con AM5, utilizando dos concentraciones 0,2 ó 0,8  $\mu\text{g/ml}$ . Como en el apartado anterior, el primer tratamiento se llevó a cabo a la tercera semana de cultivo (Figura 47).

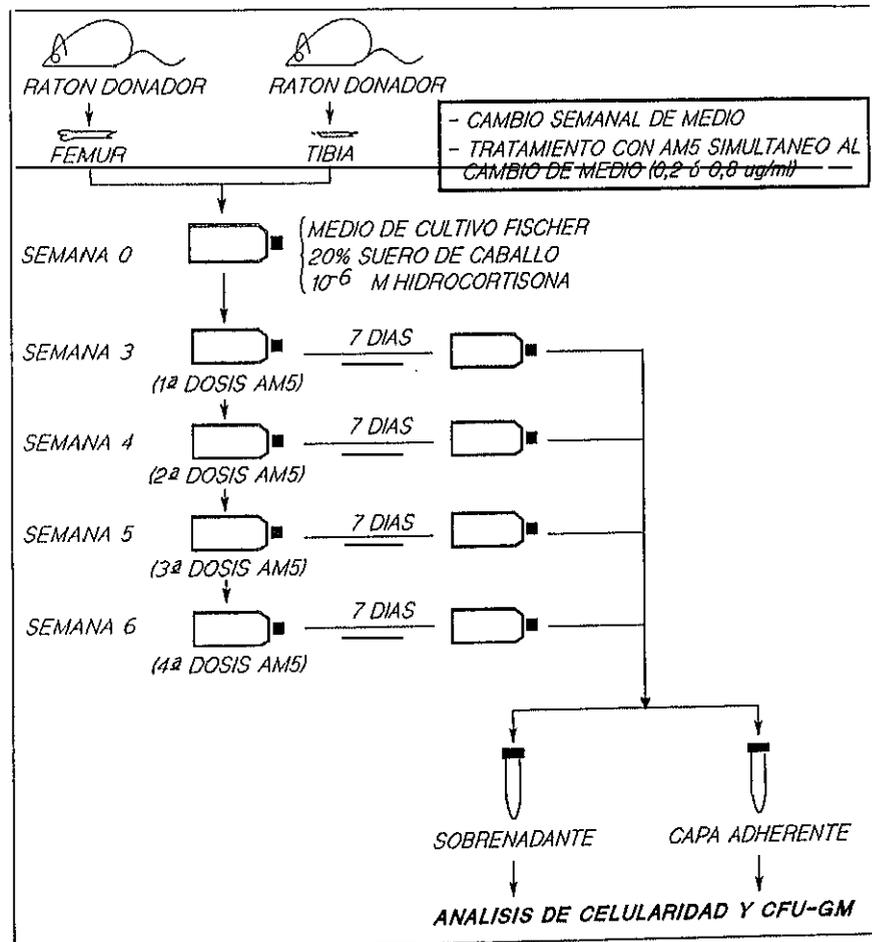


Figura 47: Protocolo para el estudio del efecto de la administración "in vitro" de múltiples dosis de AM5 sobre la hematopoyesis de LT BMC.

Las dosis de 0,2 y 0,8  $\mu\text{g/ml}$  fueron seleccionadas en base a los resultados descritos en el apartado anterior. Con ellas se pretendió cubrir dos tipos de respuesta, dosis que produciendo incremento en el número de precursores hematopoyéticos en el sobrenadante, no afectaran a la capa adherente, y dosis que aún produciendo una reducción en la capa adherente ofrecieran un incremento máximo de precursores hematopoyéticos.

Con dosis de 0,2  $\mu\text{g/ml}$ , se produjo un ligero incremento en el número de precursores en el sobrenadante y no disminuyó la celularidad de la capa adherente. Por el contrario, dosis de 0,8  $\mu\text{g/ml}$  de AM5, si bien producían una estimulación muy elevada en los niveles de precursores del sobrenadante, reducían la celularidad de la capa adherente a un 40% en relación al valor control, es decir tenía lugar una despoblación del estroma que podría estar indicando un "agotamiento" del cultivo.

Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con múltiples dosis de AM5 a concentraciones de 0,2  $\mu\text{g/ml}$ , produjo un incremento progresivo tanto de la celularidad (Figura 48), como del número de CFU-GM (Figura 49) del sobrenadante. En ambos casos existió una relación entre los incrementos observados y el número de dosis administradas. En relación a la capa adherente, este tratamiento produjo un ligero descenso en el número de células nucleadas (70-80% respecto al valor control), y un incremento en el número de CFU-GM (180%) (Figuras 48 y 49).

Tras la administración de dosis múltiples de 0,8  $\mu\text{g/ml}$  de AM5, el sobrenadante mostró un incremento progresivo en la celularidad hasta la tercera dosis, permaneciendo estable este incremento con cuatro dosis (Figura 48). En relación al número de CFU-GM, la administración de dos y tres dosis incrementó ligeramente el factor

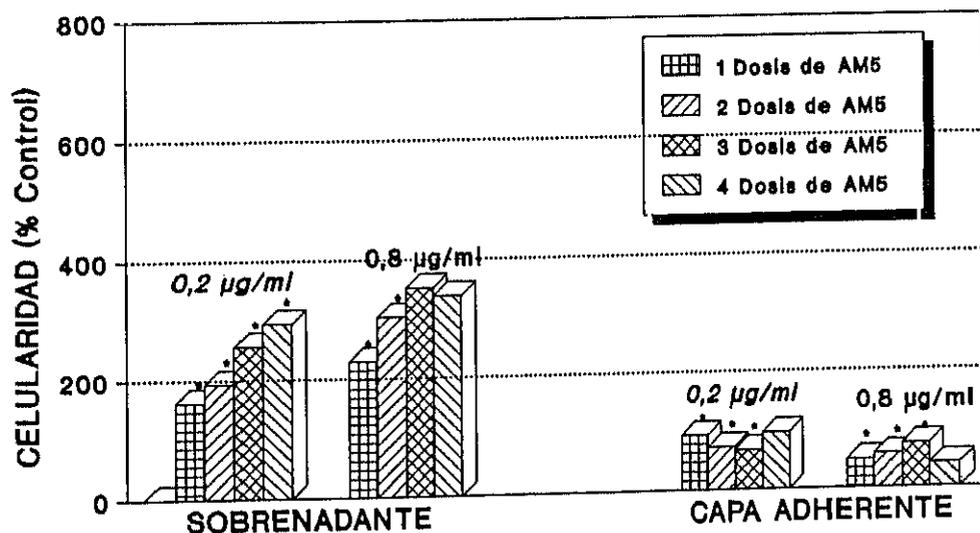
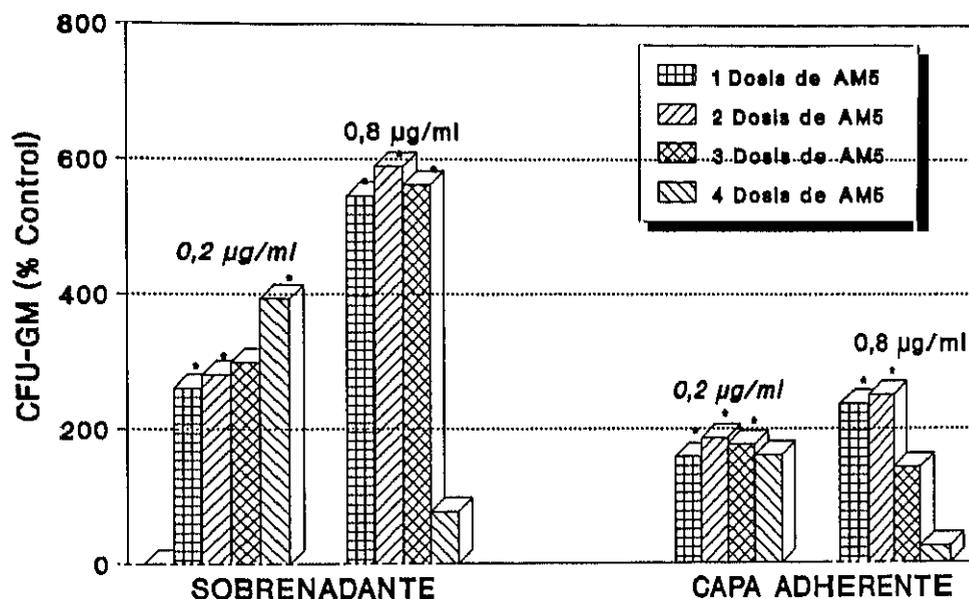


Figura 48: Efecto del tratamiento "in vitro" con múltiples dosis de AM5 sobre la celularidad de LTBMC. (\*)  $p < 0,05$ .



**Figura 49:** Efecto del tratamiento "in vitro" con múltiples dosis de AM5 sobre el contenido de precursores CFU-GM en LT BMC. (\*)  $p < 0,05$ .

obtenido con una única dosis, siendo en cualquier caso este factor superior al observado con dosis de  $0,2 \mu\text{g/ml}$ , con valores respecto al control del 590% y 560%, tras 2 y 3 dosis de  $0,8 \mu\text{g/ml}$  respectivamente, frente a 390% tras 4 dosis de  $0,2 \mu\text{g/ml}$ . Una cuarta dosis de AM5 de  $0,8 \mu\text{g/ml}$ , tuvo como consecuencia una brusca caída de los niveles de CFU-GM en el sobrenadante (75% respecto al valor control) (Figura 49).

En el estroma (Figura 48), múltiples dosis de  $0,8 \mu\text{g/ml}$  provocaron un descenso de la celularidad muy similar al observado tras una única dosis (40-70% del control). En relación al contenido de precursores, si bien el tratamiento con dos dosis produjo un incremento en los niveles de CFU-GM similar al obtenido tras una única dosis, 3 ó 4 dosis de  $0,8 \mu\text{g/ml}$  de AM5 indujeron un descenso en los niveles de CFU-GM del estroma (24% tras cuatro dosis) (Figura 49).

#### 4.2.6.- Mediadores de la estimulación hematopoyética inducida por AM5 en LT BMC.

Una vez puesto de manifiesto la capacidad del AM5 para estimular la hematopoyesis en LT BMCs, nos propusimos analizar los factores mediadores de este efecto.

Puesto que los CSFs son agentes implicados en la regulación hematopoyética, la fuerte estimulación observada tras el tratamiento "in vitro" con AM5 en LT BMC, nos

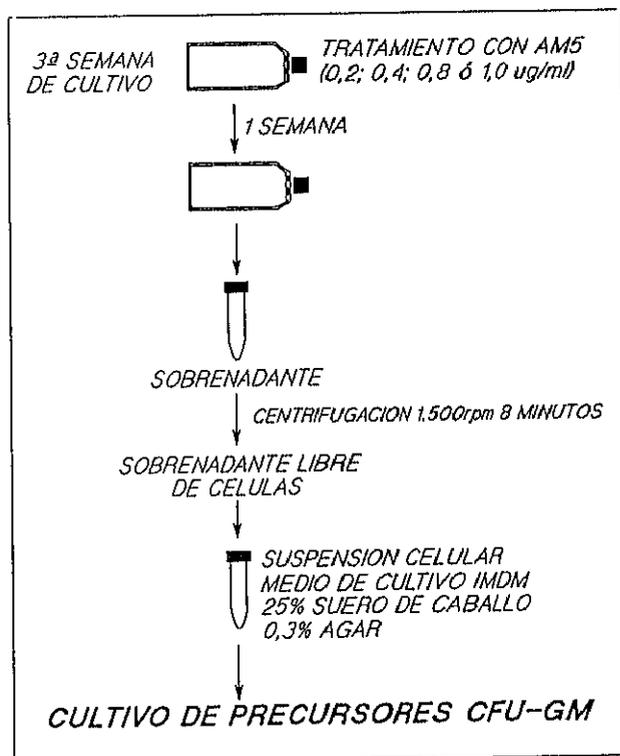
indujo a pensar que ésta podría estar mediada por un incremento en los niveles de CSFs presentes en el cultivo.

#### 4.2.6.1.- Liberación de actividad estimuladora de colonias en LTBMC tras el tratamiento con AM5.

Los precursores hematopoyéticos necesitan la continua presencia de factores de crecimiento para proliferar "in vitro". Una aproximación válida para comprobar la presencia de estos factores en LTBMC, es determinar si el sobrenadante de éste es capaz de inducir la formación de colonias "in vitro" a partir de precursores hematopoyéticos, en ausencia de factores exógenos. Es por ello que se habla de Actividad Estimuladora de Colonias (CSA).

En este apartado, se describen los resultados sobre la presencia de GM-CSA (actividad estimuladora de colonias granulо-macrofágicas) en sobrenadantes de LTBMCs tratados con AM5.

En el protocolo seguido, a la tercera semana de cultivo y coincidiendo con el cambio de medio, se realizó el tratamiento con AM5 (0,2; 0,4; 0,8 ó 1,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), recogiendo una semana después los sobrenadantes, los cuales eran centrifugados para eliminar las células existentes y almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.



**Figura 50:** Protocolo para evaluar la presencia de GM-CSA en LTBMC, como consecuencia del tratamiento con AM5.

La presencia de CSA se determinó mediante el ensayo de formación de colonias CFU-GM, tal como se ha descrito anteriormente (apartado 3.5.2.), sustituyendo el medio condicionado por el sobrenadante libres de células procedentes de los LTBMC tratados con AM5 o control (Figura 50).

En un primer ensayo, distintas cantidades de sobrenadante libre de células (5-30% v/v), procedente de un LTBMC tratado con 0,8  $\mu\text{g/ml}$  de AM5, fueron ensayadas en cuanto a su contenido en GM-CSA.

Los resultados (Figura 51) muestran que el número de colonias CFU-GM formadas "in vitro" dependió de la cantidad de sobrenadante añadida, alcanzándose un plató a partir de cantidades de sobrenadante del 10% (v/v). No se observó inhibición en la formación de colonias en el rango de concentraciones estudiada.

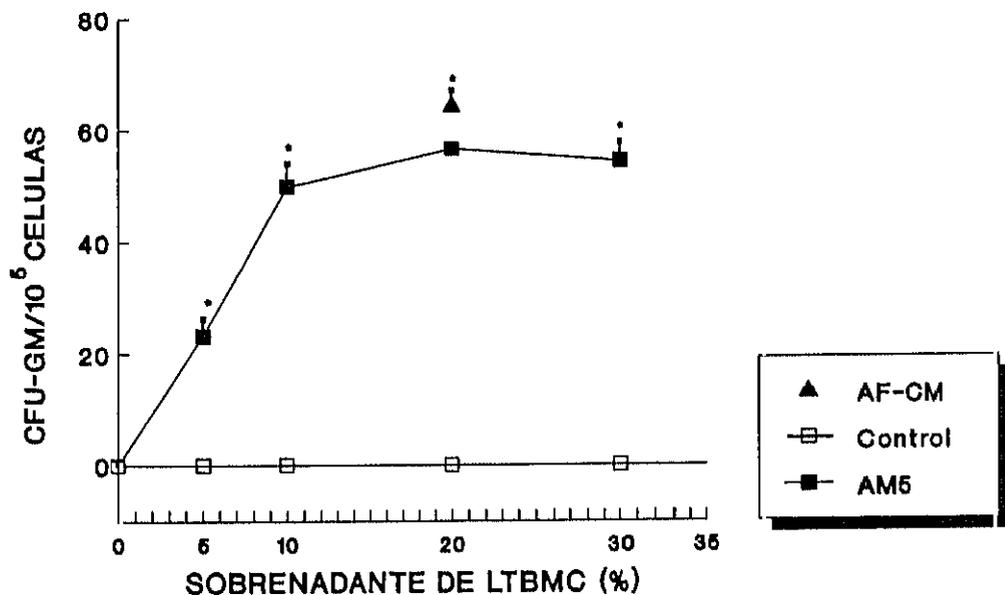


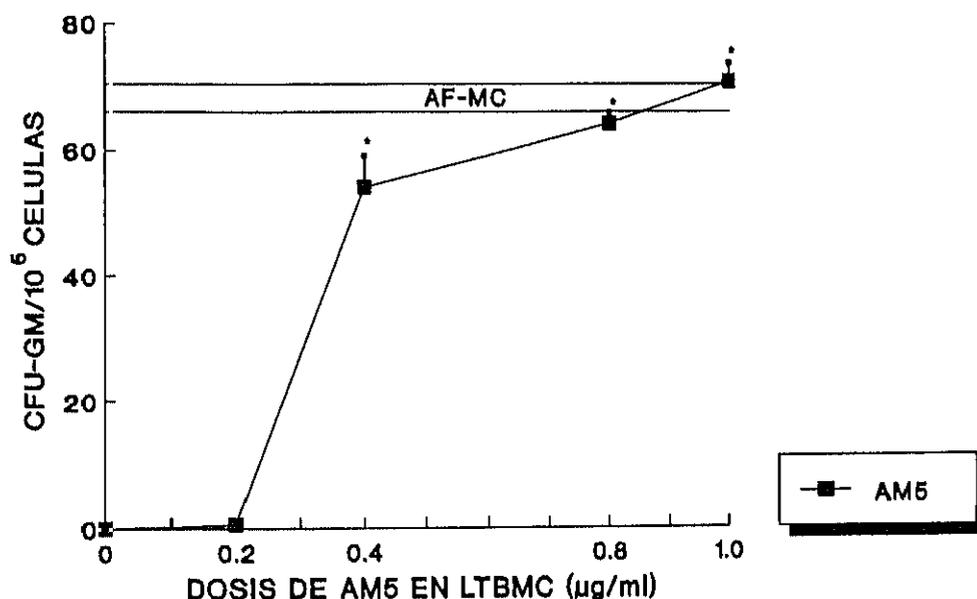
Figura 51: Relación % de sobrenadante (v/v) de LTBMC añadido-número de colonias CFU-GM formadas. (\*)  $p < 0,05$ .

Hay que destacar que con cantidades de sobrenadante del 20% (v/v), el número de colonias CFU-GM formadas, fue muy similar al obtenido con el medio condicionado AF-MC utilizado como control positivo, el cual contiene mayoritariamente GM-CSF.

Basándonos en los resultados obtenidos, en experimentos posteriores se utilizó el sobrenadante de LTBMC al 20% (v/v) por encontrarse esta cantidad en el plató de máxima estimulación.

Comprobada la existencia de GM-CSA en los sobrenadantes de LTBMCS tratados con AM5, los siguientes estudios fueron dirigidos a determinar si existía una relación entre dosis de AM5 añadida al cultivo y GM-CSA presente en el sobrenadante.

Así, se ensayó el contenido de GM-CSA en sobrenadantes de cultivos tratados con 0,2; 0,4; 0,8 ó 1,0  $\mu\text{g/ml}$  de AM5. Todos los sobrenadantes fueron recogidos 7 días después del tratamiento, coincidiendo con el cambio de medio. Asimismo, la cantidad de sobrenadante utilizada fue en todos los casos del 20% (v/v).



**Figura 52:** Influencia de la dosis de AM5 administrada al LTBMC, sobre la cantidad de GM-CSA presente. (\*)  $p < 0,05$ .

Como puede observarse en la Figura 52, todos los sobrenadantes de cultivo de larga duración tratados con AM5 contenían GM-CSA, siendo la cantidad de ésta dependiente de la dosis de AM5 administrada al cultivo. Así, los sobrenadantes de LTBMC tratados con 0,2  $\mu\text{g/ml}$  de AM5, indujeron la formación de un número bajo de colonias CFU-GM (0,3 colonias/ $10^5$  células). Con dosis de 0,4; 0,8 y 1,0  $\mu\text{g/ml}$  el número de colonias CFU-GM formadas se incrementó fuertemente (54-71 colonias/ $10^5$  células de médula ósea) con valores próximos a los obtenidos con el medio condicionado AF-MC.

Por el contrario, cuando se utilizaron los sobrenadantes procedentes de cultivos control sin tratar, no se observó en ningún caso la formación de colonias CFU-GM (Figura 52).

Posteriormente, se analizaron los sobrenadantes de cultivos tratados con  $0,2 \mu\text{g/ml}$  de AM5 ó cultivos control, concentrados cinco veces mediante membranas de ultrafiltración de 10.000 daltons.

Era de esperar que los factores liberados en el cultivo de larga duración como consecuencia del tratamiento con AM5, fueran factores de crecimiento hematopoyético ya descritos en la bibliografía, los cuales en el caso del ratón poseen pesos moleculares superiores a 10.000 daltons (23-70 Kd).

Frente a sobrenadantes de LTBMCS tratados con  $0,2 \mu\text{g/ml}$  no concentrados, que mostraron cantidades muy bajas de GM-CSA, aquellos que habían sido concentrados 5 veces (30% v/v) mostraron niveles de GM-CSA muy similares a los observados en el medio condicionado AF, utilizado como control positivo (Figura 53).

Estos resultados confirmaban que el peso molecular de la actividad estimuladora presente en el LTBMCS tras el tratamiento con AM5 era superior a 10.000 daltons.

Por el contrario, en sobrenadantes procedentes de cultivos control concentrados 5 veces, no fue posible detectar GM-CSA, ni siquiera cuando se utilizaron cantidades de sobrenadante 5x del 30% (v/v).

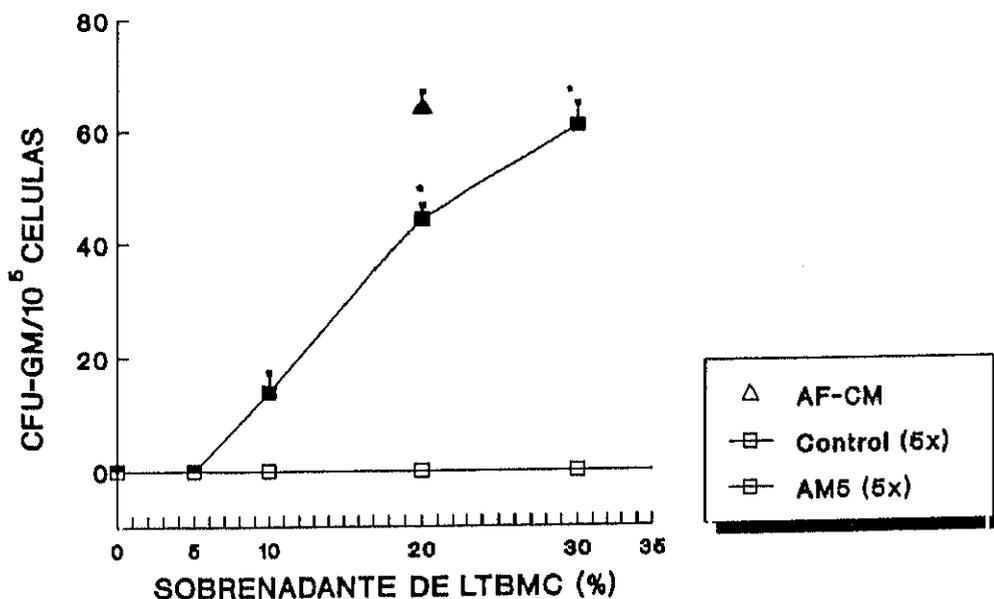
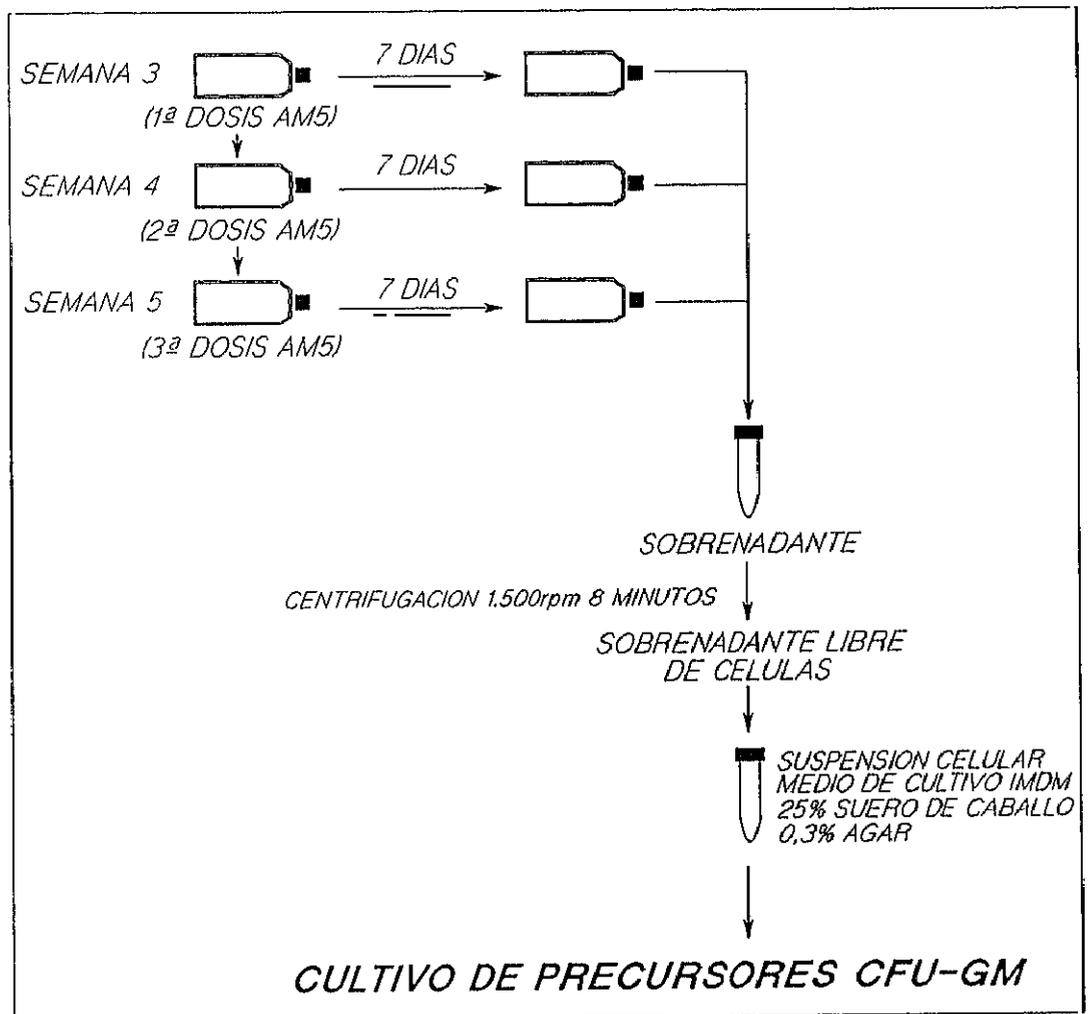


Figura 53: Presencia de GM-CSA en sobrenadantes concentrados 5 veces, procedentes de LTBMCS tratados con  $0,2 \mu\text{g/ml}$  de AM5 ó control. (\*)  $p < 0,05$ .

Como hemos visto en el apartado 4.2.5.2., el tratamiento del LTBMCS con múltiples dosis de  $0,8 \mu\text{g/ml}$  de AM5 provoca una disminución en el contenido de CFU-GM,

sobre todo en la capa adherente. Con objeto de determinar si este fenómeno guarda alguna relación con el contenido de GM-CSA presente en el cultivo, se analizó la presencia de GM-CSA en los sobrenadantes de cultivos de larga duración de médula ósea tratados con múltiples dosis de AM5 (0,8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Figura 54). Para ello, fueron ensayadas distintas cantidades de sobrenadantes procedentes de cultivos tratados con 1, 2 ó 3 dosis de producto.



**Figura 54:** Protocolo para evaluar la presencia de GM-CSA en sobrenadantes de LTBMCS tratados con múltiples dosis de AM5.

Los sobrenadantes procedentes de cultivos tratados con 0,8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , mostraron una relación inversa entre actividad GM-CSA y número de dosis de AM5 administradas al cultivo (Figura 55). Así, tras la administración de dos o tres dosis de AM5, las concentraciones de GM-CSA presentes en el sobrenadante fueron menores a las observadas en sobrenadantes de LTBMCS tratados con una dosis única de AM5.

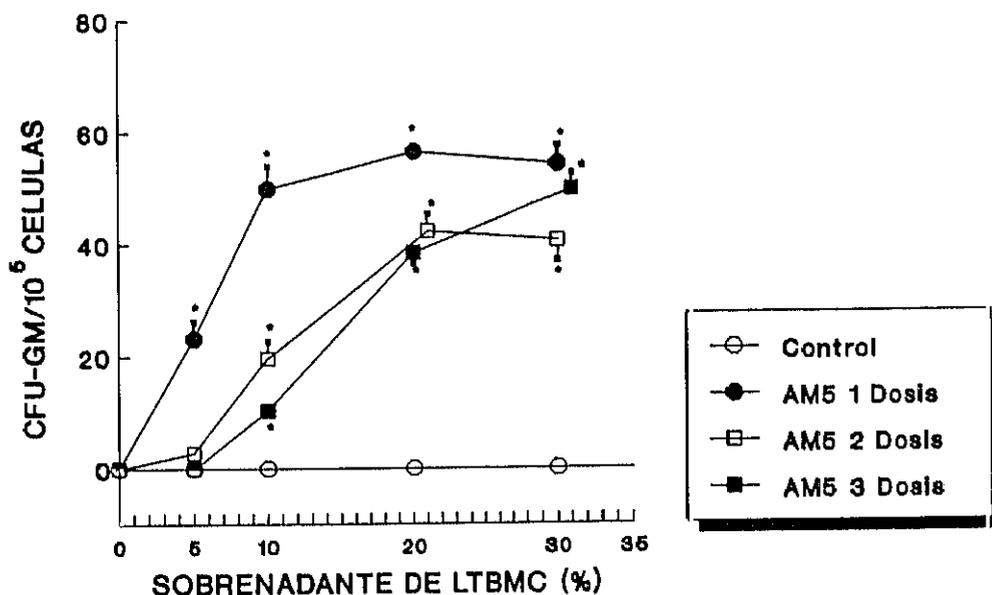


Figura 55: Liberación de GM-CSA en LTBM tras el tratamiento con múltiples dosis de AM5 (0,8µg/ml). (\*) p < 0,05.

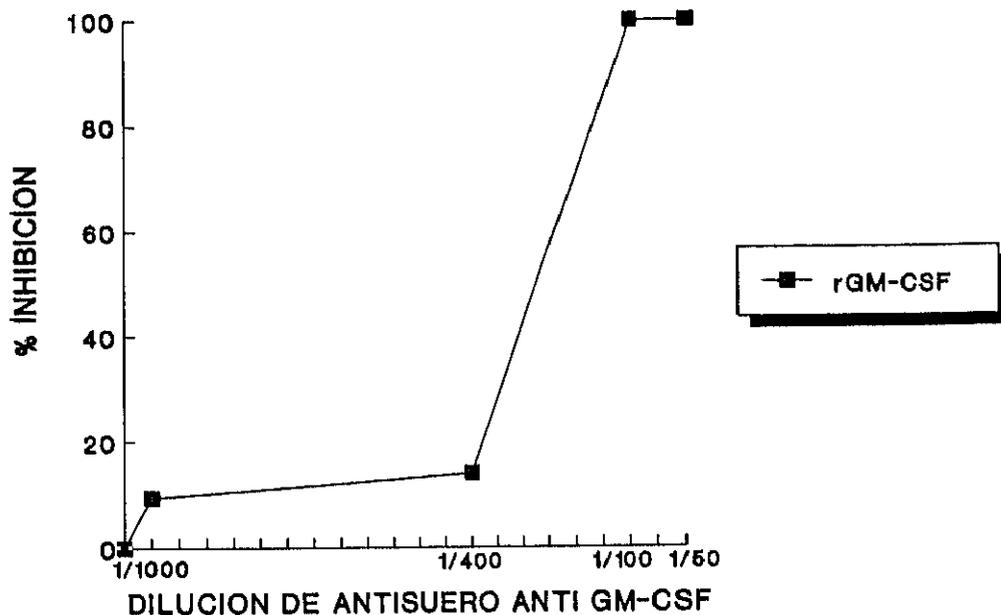
#### 4.2.6.2.- Caracterización de los CSFs presentes en el LTBM tras el tratamiento con AM5.

Los resultados mostrados en el apartado anterior, confirmaban la existencia de factores estimulantes hematopoyéticos en el cultivos de larga duración de médula ósea tratados con AM5. Nos propusimos posteriormente comprobar si como consecuencia del tratamiento con AM5 se liberaba en el cultivo GM-CSF.

La aproximación experimental utilizada, consistió en determinar si la actividad estimuladora de colonias detectada en el sobrenadante de LTBMcs tratados con AM5, era inhibida por el antisuero anti GM-CSF.

En primer lugar, se realizó una curva patrón de inhibición con rGM-CSF y su antisuero. La cantidad de rGM-CSF utilizada (50U/ml) es capaz de promover la formación de un número máximo de colonias CFU-GM en cultivo "in vitro" (50U = 1 ng). El rGM-CSF fue incubado 4 horas a 4 ° C con distintas diluciones de antisuero, determinándose posteriormente su capacidad para inducir la formación de colonias CFU-GM "in vitro".

Como se muestra en la figura 56, diluciones de antisuero de 1/100 inhibieron el 100% de la actividad estimuladora de colonias presente en 50U/ml de rGM-CSF, mientras que diluciones de 1/400 unicamente produjeron un 20% de inhibición.



**Figura 56:** Curva patrón de inhibición del rGM-CSF (50 U/ml) con su suero específico anti GM-CSF.

Los sobrenadantes de LTBMCS tratados con 0,8 µg/ml de AM5 fueron incubados en presencia de diferentes diluciones de antisuero (1/50, 1/100; 1/400 y 1/1000), determinándose posteriormente la actividad estimuladora de colonias presentes en ellos, mediante cultivo de CFU-GM en ausencia de factores estimulantes exógenos. En todos los experimentos se incluyó un control positivo de rGM-CSF (50U/ml) en presencia de una dilución 1/100 de antisuero.

DILUCION DE SUERO ANTI GM-CSF	rGM-CSF		SOBRENADANTE DE LTBMCS	
	CFU-GM/10 <sup>5</sup> CELS	% INHIBICION	CFU-GM/10 <sup>5</sup> CELS	% INHIBICION
—	72,2 ± 10,3	—	74,1 ± 15,7	—
1/50	0	100	42,2 ± 5,1	56,9*
1/100	0	100	20,4 ± 2,5	27,6*

**Tabla XI:** Inhibición con antisuero anti GM-CSF, de la actividad estimuladora de colonias granulo-macrofágicas presente en sobrenadantes de LTBMCS tratados con AM5. (\*) p < 0,05.

Los resultados muestran (Tabla XI) una inhibición de la actividad estimuladora de colonias presentes en los sobrenadantes de LTBMCs tratados con AM5, por antisuero anti GM-CSF. Así, una dilución 1/100 de antisuero provocó la inhibición del 30% de la actividad estimuladora de colonias presente en el sobrenadante. Con ninguna de las diluciones empleadas se alcanzó una inhibición del 100%. Incluso con diluciones de 1/50 sólo se obtuvo una inhibición del 60% de la actividad estimuladora presente en el cultivo, mientras que esta dilución inhibió el 100% de la actividad del rGM-CSF (50 U/ml).

Estos resultados confirmaban que el tratamiento con AM5 induce la liberación de GM-CSF en cultivos de larga duración.

**DISCUSSION**

En las dos últimas décadas, se ha dedicado un gran esfuerzo al estudio de compuestos capaces de estimular el sistema hematopoyético, ya que la disfunción de este sistema es, por un lado limitante a la hora de aplicar un tratamiento antitumoral, y por otro, causa de muerte en accidentes radiológicos.

En clínica oncológica, la eficacia de un tratamiento está directamente relacionada con la agresividad de éste. Desafortunadamente, la aplicación de tratamientos tanto de quimio- como de radio-terapia está limitada por la mielosupresión que estos provocan. La exposición de un individuo a radiación, conlleva un descenso en los niveles de precursores hematopoyéticos, que se va a reflejar en neutropenias, granulocitopenias y trombopenias, estados patológicos que favorecen la aparición de infecciones oportunistas y hemorragias, causa frecuente de la muerte del paciente.

El descenso de precursores hematopoyéticos y en consecuencia de células de la sangre, va a impedir en muchos casos que el tratamiento pueda seguir aplicándose, reduciendo enormemente su eficacia.

En este sentido, es indiscutible la importancia de compuestos con capacidad para estimular el sistema hematopoyético a nivel de precursores pluripotentes, ya que a partir de éstos, mediante procesos de proliferación y diferenciación, se va a poder reconstituir el compartimento de células maduras circulantes.

En accidentes radiológicos, la disfunción hematopoyética es una de las causas de muerte cuando el individuo recibe dosis moderadas de radiación.

El trasplante de médula, una técnica con indudables aplicaciones, no siempre resulta la idónea en accidentes radiológicos, ya que es una terapia muy agresiva, y requiere donantes compatibles, lo que no siempre es factible.

Tanto en clínica oncológica como en accidentes radiológicos, se ha demostrado recientemente la eficacia de compuestos capaces de estimular el sistema hematopoyético. En concreto, la disponibilidad de factores de crecimiento hematopoyéticos (CSFs) recombinantes, está potenciando esta vía.

Resulta de gran interés el estudio de nuevos compuestos con capacidad para estimular la hematopoyesis a través de la liberación endógena de CSFs, ya que los distintos factores pueden actuar de forma sinérgica, produciendo efectos muy beneficiosos.

Sobre esta problemática se ha centrado este trabajo, cuyo objetivo principal radica en evaluar el efecto estimulador de un Modificador de la Respuesta Biológica de naturaleza polisacárido-proteína, sobre el sistema hematopoyético de ratón.

### **5.1.- EFECTO ESTIMULADOR DEL AM3 SOBRE EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO.**

Previamente a la realización de este trabajo, diversas actividades del AM3 se han relacionado con el sistema hematopoyético. En ratones infectados con *Candida albicans*, el tratamiento con AM3 produce un incremento en el número de linfocitos y macrófagos en el foco infeccioso (fenómeno "homing"), atribuyéndose sus efectos antiinfecciosos, a un aumento en la capacidad fagocítica de los macrófagos (Gillissen y Breuer-Werle, 1984).

Asimismo, el AM3 ha mostrado capacidad para aumentar la actividad de células "natural killer" y de células inductoras de Interferón (Moya y col, 1987).

En esta tesis el estudio sobre el AM3, asociación no covalente polisacárido proteína en forma de absorbato, activo "vía oral", se ha centrado en la caracterización de sus efectos sobre el sistema hematopoyético de ratón, fundamentalmente en lo que se refiere a su acción sobre los precursores hematopoyéticos en relación con su potencial actividad estimuladora tras una agresión con radiaciones ionizantes.

#### **5.1.1.- Estimulación de precursores hematopoyéticos pluripotentes (E-CFU) en animales subletalmente irradiados.**

Entre las aproximaciones que pueden seguirse a la hora de determinar la capacidad de un compuesto para estimular el sistema hematopoyético tras una agresión, como puede ser la exposición a radiaciones ionizantes, hay dos que se emplean habitualmente:

- Determinar si el tratamiento con el compuesto es capaz de incrementar la supervivencia de animales sometidos a dosis de radiación potencialmente letales, en el rango de dosis del síndrome hematopoyético.
- Analizar la estimulación inducida por el producto sobre precursores hematopoyéticos pluripotentes (E-CFU) de ratones subletalmente irradiados.

Si bien son dos aproximaciones complementarias, que ofrecen información sobre la acción del producto en dos rangos de dosis de radiación, letal y subletal, el análisis de precursores E-CFU está más extendido, entre otras causas por la duración del

ensayo (Kinnamon y col, 1980). En el caso de los estudios de supervivencia, se requieren períodos de 30 días, frente a los 9 que dura el ensayo de E-CFU.

Por ello, en este trabajo, la evaluación de la capacidad estimuladora del AM3 se inició utilizando el ensayo de formación de colonias endógenas en bazo (E-CFU).

Cuando a ratones C57Bl adultos se les administró AM3 "vía oral", a una concentración de 150 mg/Kg/día durante 6 días después de una irradiación subletal, éstos mostraron un incremento significativo en los valores de E-CFU (156%) en relación a los valores control (animales irradiados con la misma dosis) (Tabla II). Este factor no se vió potenciado al incrementar el número de dosis de AM3 administradas (7, 8 ó 9 días).

La administración de un número menor de dosis de AM3 (2, 4 ó 5 días) no consiguió estimular los precursores pluripotentes endógenos en bazo (Tabla II).

En otro bloque de experimentos, el AM3 (150 mg/Kg) fue administrado 2 veces al día durante 4 ó 5 días. En ellos, no sólo no se observó incremento en los valores de E-CFU sino que incluso éstos disminuyeron al 90 y 60% del valor control tras 4 y 5 días de tratamiento respectivamente (Tabla II).

A partir de estos resultados podemos concluir, que el AM3 es capaz de actuar sobre los precursores pluripotentes supervivientes a una dosis de radiación subletal, incrementando significativamente su número. El efecto observado es dependiente del número de dosis de AM3 administradas.

La necesidad de administrar varias dosis de producto para que éste sea activo, se ha observado también en otros compuestos como el rG-CSF (Patchen y col, 1990), si bien este último es administrado subcutáneamente mientras que el AM3 se administra vía oral.

Resulta difícil de interpretar el hecho de que el efecto desaparezca si se continúa administrando AM3 por encima de un determinado número de dosis.

En cuanto a la influencia de la pauta de administración, se puso de manifiesto la existencia de una estimulación significativa en los niveles de precursores pluripotentes en bazo, independientemente de que el tratamiento con AM3 se realizase antes o después de la irradiación (Tabla III). Las diferencias entre los factores de recuperación obtenidos con las distintas pautas de tratamiento no fueron estadísticamente significativas.

Está profusamente documentado, que la pauta de administración de un producto en relación con el momento de la irradiación, va a influir de manera decisiva en la eficacia del tratamiento (Nishiguchi y col, 1990). Sin embargo, el AM3 actúa de forma diferente a la mayoría de los MRB descritos en la bibliografía. En general,

éstos únicamente presentan actividad estimuladora cuando son administrados antes de la irradiación (Ross y Peeke, 1986a). Sólo algunos MRB, como el glucano F, muestran actividad cuando son administrados después de la irradiación (Patchen y Mac Vittie, 1986a).

Si comparamos los factores de recuperación obtenidos con AM3 y con otros MRB como glucanos o CSFs, los factores obtenidos con AM3 son más bajos, aunque hay que tener en cuenta que su administración es "vía oral", mientras que éstos últimos son administrados "i.v."

La dosis y vía de administración adecuada depende de cada producto, influyendo de manera decisiva en el efecto producido (Burgaleta y Golde, 1977; Patchen y Lotzova, 1980). Las vías de administración más utilizadas son la intravenosa (i.v.), intraperitoneal (i.p.) y subcutánea (s.c.).

Por lo general, la administración "vía oral" de un producto reduce su actividad, si bien no suele presentar problemas de toxicidad y ofrece ventajas prácticas a la hora de su aplicación en humanos.

Sólo hemos encontrado en la bibliografía revisada un MRB, el TJ-48, capaz de estimular el sistema hematopoyético de ratones subletalmente irradiados, cuando se administra "vía oral". El TJ-48, una hierba medicinal china, administrado en el agua de los biberones (aproximadamente 25-50 mg/ratón) durante una semana después de la irradiación, produce un factor de recuperación de precursores pluripotentes de 200%, no observándose como consecuencia del tratamiento estimulación de CFU-GM ni de CFU-E (Ohnishi y col, 1990).

El aminotiol WR2721 administrado "i.p." es el radioprotector más eficaz descrito hasta el momento. Sin embargo, no presenta actividad radioprotectora cuando se administra "vía oral" (Yuhas, 1978; Mori y col, 1983).

Las razones de la menor actividad de un compuesto cuando es administrado vía oral, se encuentran relacionadas, bien con su escasa absorción o bien con su desnaturalización por los ácidos ó enzimas digestivas, o por el metabolismo hepático.

El uso de micropartículas, microemulsiones o liposomas, los cuales son capaces de incrementar tanto la interacción con el epitelio intestinal, como la absorción del producto, así como vehiculizar drogas hacia la médula ósea (Davis y col, 1986), pueden ser fórmulas galénicas alternativas en el caso del AM3, que potencien los efectos observados.

Otros parámetros, como variaciones en la dosis de radiación aplicada, no afectaron la capacidad estimuladora del AM3 sobre las E-CFU (Tabla IV). Resultados semejantes se han descrito por otros autores para diferentes compuestos (Ross y Peeke, 1986b; Patchen y Mac Vittie, 1986b).

Tampoco se observaron diferencias significativas en los factores de recuperación obtenidos como consecuencia de la cepa de ratón utilizada (Tabla V).

Como resumen de estos experimentos podemos concluir que el tratamiento "vía oral" con AM3, 150 mg/Kg/día durante 6 días, es capaz de estimular los precursores pluripotentes endógenos en bazo, siendo esta estimulación independiente del momento en que se administre el AM3 respecto a la irradiación, así como de la dosis de radiación y de la cepa de ratón utilizada.

Posteriormente, con este mismo protocolo de administración de AM3, se evaluó su efecto sobre la recuperación de diferentes precursores hematopoyéticos (CFU-S y CFU-GM) procedentes de distintos órganos (médula ósea y bazo) y a distintos días después de una irradiación subletal.

Nuestros resultados indican, que el tratamiento con AM3 no modificó los niveles de precursores en médula ósea. Así, la cinética de recuperación espontánea de CFU-S y CFU-GM tras la irradiación subletal, no se vió favorecida por el tratamiento con AM3 (Figura 16 y 17).

Por el contrario, la recuperación de CFU-S esplénicas se vio favorecida por dicho tratamiento. El factor de recuperación de 158% respecto al control, a los diez días de la irradiación (Figura 20), fue coincidente con el encontrado para E-CFU.

Estos resultados corroboraban, por tanto, el que el AM3 actúa a nivel de precursores pluripotentes, favoreciendo su recuperación tras la irradiación.

#### **5.1.2.- ¿El incremento de E-CFU tras el tratamiento con AM3 se ve reflejado en un aumento de la supervivencia de animales sometidos a irradiación potencialmente letal?.**

Partiendo de resultados anteriores, en los que se puso de manifiesto la eficacia del AM3 para recuperar la población de precursores pluripotentes sometidos a radiación subletal, nos planteamos determinar si esta recuperación se traducía en un incremento de la supervivencia de animales irradiados con dosis potencialmente letales.

Con objeto de comprobar esta posibilidad, ratones irradiados con 7,6 Gy fueron tratados con la dosis óptima de AM3 (150 mg/Kg/día, durante 6 días), manteniéndose el análisis de supervivencia durante 30 días después de la irradiación.

Bajo las condiciones experimentales descritas, se observó que el tratamiento con AM3 no fue capaz de aumentar la supervivencia de los animales (Figura 22).

También se ha descrito este mismo comportamiento con el glucano-P, el cual a pesar de estimular las E-CFU cuando se administra después de la irradiación, reduce la supervivencia de animales irradiados con dosis potencialmente letales por debajo de los valores control (Patchen y Mac Vittie, 1985).

De estos resultados se puede concluir que, o bien los factores de recuperación de E-CFU inducidos por AM3 no son suficientes para proteger a un animal que ha sufrido una irradiación con dosis tan altas como las empleadas, o que el protocolo que induce un factor máximo de acumulación de precursores hematopoyéticos, no guarda relación con el tratamiento que rinde una mayor radioprotección.

La muerte del animal tras una irradiación, acontece como un conjunto de disfunciones entre las que el daño hematopoyético juega un papel indiscutible. Sin embargo, un incremento en el número de precursores pluripotentes no es una garantía de supervivencia, aunque éste resulte ser imprescindible para asegurar a largo plazo la misma.

## **5.2.- ESTIMULACION HEMATOPOYÉTICA INDUCIDA POR AM5.**

Desde un punto de vista experimental, la utilización de la forma soluble del AM3, el AM5, ofrece claras ventajas. Entre ellas cabe destacar:

- Productos solubles administrados "i.v." suelen ser activos tras la administración de una única dosis.
- Si bien el mecanismo de acción del AM5 no tiene porque coincidir con el del AM3, su esclarecimiento facilitaría la aproximación experimental para conocer el de éste último.

Las características del tratamiento (pauta y vía de administración), así como los factores de recuperación mostrados por el AM3, desaconsejan una aproximación experimental directa sobre el mecanismo de acción.

Existen otras razones adicionales que aconsejaban la utilización del AM5:

- El hecho de que su vía de administración fuera "i.v.", posibilitaba que su actividad estimuladora fuera mayor que la del AM3, ya que a este respecto la bibliografía pone de manifiesto que aquellos compuestos administrados oralmente presentan un menor efecto estimulador (Yuhás, 1978).
- Existe un gran número de MRB descritos en la bibliografía con actividad estimuladora sobre el sistema hematopoyético cuando son administrados "i.v.", lo que nos permitiría comparar cualitativa y cuantitativamente los resultados obtenidos con el AM5 con los de otros MRB.

Estas razones nos indujeron a utilizar el AM5 para profundizar en los efectos de este MRB sobre el tejido hematopoyético.

#### 5.2.1.- Estimulación hematopoyética tras el tratamiento con AM5: relación dosis-efecto.

Los trabajos iniciales con AM5 estuvieron dirigidos a establecer la dosis óptima de producto a administrar, entendiendo por dosis óptima aquella que produce la máxima estimulación hematopoyética.

Para ello se realizaron dos tipos de ensayos:

- Formación de colonias endógenas en bazo (E-CFU), con el que se analizaría la capacidad del AM5 para estimular precursores hematopoyéticos pluripotentes, en animales que han sufrido una agresión con radiación.
- Análisis de precursores hematopoyéticos en ratones no irradiados, que pondrían de manifiesto la capacidad del AM5 para inducir acumulación de precursores hematopoyéticos en animales que no han sufrido una agresión. Este parámetro, ha sido utilizado en muchos estudios de MRB, poniéndose de manifiesto que aquellos compuestos capaces de estimular la hematopoyesis en ratones no irradiados, suelen presentar actividad radioprotectora.

##### 5.2.1.1.- Ensayos de formación de colonias endógenas en bazo (E-CFU).

Puesto que en los estudios de formación de colonias endógenas en bazo, influyen de manera decisiva no sólo la dosis de producto administrada, sino también el intervalo

de tiempo entre la administración del compuesto y la irradiación, se escogieron diferentes dosis y pautas de administración de AM5.

La pauta de administración de AM5, 1 día y 1 hora antes de la irradiación, fue seleccionada en base a datos recogidos en la bibliografía, los cuales describen estos protocolos de administración, como los más efectivos para inducir radioprotección con la mayoría de los MRB.

No debemos olvidar que el AM3, forma galénica activa "vía oral" de igual composición que el AM5, era capaz de estimular los precursores pluripotentes en bazo, independientemente de que se administrara antes o después de la irradiación, lo que unido a las aplicaciones clínicas que tendría un compuesto activo cuando se administra después de la irradiación, nos llevó a incluir el protocolo de administración de AM5 1 hora post-irradiación.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento "i.v." con una única dosis de AM5 en ratones subletalmente irradiados, produce una fuerte estimulación a nivel de E-CFU. Confirmándose que esta estimulación, no sólo es dependiente de la dosis de AM5 administrada, sino también del momento en el que se realiza el tratamiento (Figura 24).

Para cada una de las pautas de administración utilizadas, existía una clara relación entre dosis de AM5 y factor de recuperación de E-CFU producido.

El tratamiento con AM5 (0,2 ó 0,4 mg/Kg) después de la irradiación, fue capaz de estimular las E-CFU (Figura 24). Este comportamiento coincidía con el mostrado por el AM3, si bien los factores de recuperación observados con AM5 (600%) superan ampliamente los obtenidos con AM3 (156%).

Estos resultados confirmaban una de las razones aducidas para trabajar con AM5. La administración intravenosa ofrece un mayor efecto y por tanto facilita la labor experimental.

Los factores de recuperación de E-CFU observados en ratones tratados con 0,4 mg/Kg de AM5, 1 hora después de la irradiación (600%), son superiores a los descritos para glucanos, mananos o fructanos (300-500%) (Patchen y col, 1984a).

La administración de AM5 (0,4 mg/Kg) 1 día antes de la irradiación, produjo así mismo un incremento significativo en los valores de E-CFU (350% respecto al valor control)(Figura 24). Sin embargo, fue el tratamiento con AM5 1 hora antes de la irradiación el que produjo el mayor factor de recuperación con dosis de 0,4 mg/Kg (700%).

Cuando comparamos los factores de recuperación obtenidos como consecuencia del tratamiento pre-irradiación con AM5, con los descritos para otro tipo de moléculas,

comprobamos que éstos son superiores a los obtenidos con glucanos, mananos o fructanos (500%) (Patchen y col, 1984a) cuando el tratamiento con AM5 se realiza 1 hora antes de la irradiación (700%), y ligeramente inferiores en el caso de que el tratamiento con AM5 se realice 1 día pre-irradiación (400%).

Otro tipo de moléculas, como por ejemplo el rG-CSF, dan factores de recuperación superiores a 1000%. Sin embargo, estos incrementos son consecuencia de una administración continua del MRB. Así, el factor de recuperación de 1000% descrito para el rG-CSF, es el resultado de la administración del producto durante 12 días consecutivos (2,5 µg/día) (Patchen y col, 1990).

Podemos por tanto afirmar que el incremento en el número de colonias endógenas en bazo, promovido por el tratamiento con AM5, está entre los más elevados de los descritos en la bibliografía tras una única dosis.

#### 5.2.1.2.- Estudios de precursores hematopoyéticos en ratones no irradiados.

En este apartado se discuten los resultados obtenidos sobre ratones no irradiados. Es decir, sobre la capacidad del AM5 para incrementar el número de precursores hematopoyéticos pluripotentes (CFU-S), y comprometidos (CFU-GM), en ratones que no han sido sometidos a una agresión. En este contexto, un resultado positivo supone aumentar el número de precursores, más allá de lo que es estrictamente necesario para mantener la hematopoyesis en sus niveles fisiológicos.

Además, es posible obtener dos tipos diferentes de respuesta, la de médula ósea y la esplénica.

La médula ósea al encontrarse dentro del hueso, posee una capacidad limitada de expansión frente a un estímulo, lo que hace que sea difícil detectar incrementos de precursores hematopoyéticos en este órgano. Sin embargo, es importante el análisis del comportamiento de la médula frente a un MRB, ya que ésta puede mostrar descensos en sus niveles de precursores, que indicarían efectos nocivos asociados al tratamiento con el producto.

Por el contrario, el bazo posee cierta capacidad de expansión. De hecho, se sabe que este órgano, al menos en el ratón, en situaciones de estrés que conllevan una estimulación del sistema hematopoyético, se expande, acumulando un mayor número de precursores (Staber y Johnson, 1980).

Los resultados obtenidos en ratones no irradiados, mostraban que la administración de dosis bajas de AM5 (0,1 mg/Kg) inducían en médula ósea un incremento

significativo de los precursores pluripotentes CFU-S (140%) (Tabla VI). Sin embargo, cuando la dosis de AM5 administrada era superior (0,2-0,4 mg/Kg), no se observó estimulación de la hematopoyesis medular.

Este mismo efecto se ha descrito para el glucano-P, el cual induce un incremento en los niveles de precursores hematopoyéticos medulares, cuando se administra a dosis de 0,4 mg/ratón, pero provoca una disminución en la hematopoyesis medular al ser administrado a dosis de 4,0 mg/ratón (Patchen y Mac Vittie, 1983).

Este comportamiento, podría estar relacionado con la limitada capacidad de expansión de la médula. Dosis altas de producto provocarían una fuerte estimulación de precursores hematopoyéticos, los cuales al no poder acumularse en la médula migrarían a través de sangre periférica a otros órganos como el bazo, con capacidad de acumular precursores hematopoyéticos. Sin embargo, dosis bajas de producto, al inducir sólo un ligero incremento en los niveles de precursores, éste es asumible por la médula permitiendo su detección.

Todas las dosis de AM5 ensayadas estimularon la hematopoyesis esplénica, tanto en lo que se refiere a celularidad como a precursores pluripotentes (CFU-S) y comprometidos (CFU-GM) (Tabla VII). El incremento observado fue dependiente de la dosis, alcanzándose la máxima estimulación tras el tratamiento con 0,4 mg/Kg de AM5, con valores de 125%, 330% y 510% en relación al valor control, para celularidad, CFU-S y CFU-GM respectivamente.

Si tenemos en cuenta las dosis administradas, el producto resulta de una gran actividad. Para obtener niveles de estimulación hematopoyética similares a los alcanzados tras el tratamiento con AM5, otros MRB han de administrarse en concentraciones mucho más altas. Por ejemplo, el glucano-P se administra a dosis de 60 mg/Kg, para producir, 5 días después del tratamiento, incrementos de 300% y 500% en CFU-S y CFU-GM respectivamente (Patchen y Mac Vittie, 1985).

La respuesta hematopoyética al tratamiento con AM5 es diferente a la obtenida con factores recombinantes hematopoyéticos (CSFs), si bien las pautas de administración son diferentes. Frente a la administración de una dosis única de AM5, los CSFs suelen ser administrados en múltiples dosis.

Así, el tratamiento con G-CSF durante 5 días consecutivos, a dosis de 0,5 mg/Kg/día, provoca un incremento del 900% en el número de precursores tanto pluripotentes como comprometidos en bazo (Pojsda y col, 1990). Este incremento aunque es superior al alcanzado por el AM5, se ve contrarrestado por la disminución de la hematopoyesis medular. Los niveles de CFU-GM en la médula de ratones tratados con estas dosis de G-CSF, están reducidos al 18% respecto al valor control.

El tratamiento con 200 ng/ratón de IL-3 (Metcalf y col, 1986), 3 veces al día durante 6 días, induce el mismo incremento de precursores CFU-GM en bazo (500% del valor control) que una única dosis de 0,4 mg/Kg de AM5.

La administración a ratones no irradiados de 3 dosis/día de GM-CSF (100ng/ratón) durante 6 días, produce un incremento de 500% en los niveles de precursores CFU-GM de bazo (Metcalf y col, 1987).

Es importante destacar que tras el tratamiento con los factores recombinantes hematopoyéticos descritos anteriormente, se produce una disminución significativa de precursores hematopoyéticos en la médula ósea (Metcalf y col, 1987; Pojda y col, 1990; Molineux y col, 1990).

Éste sin embargo, no es el caso de la IL-6 cuyo tratamiento provoca una respuesta hematopoyética atípica, ya que induce una estimulación a nivel de médula ósea mientras que el bazo apenas se ve estimulado (Pojda y Tsuboi, 1990). Así, la administración "s.c." de 10µg/Kg/día de IL-6, durante 4 días, induce un acúmulo tanto de precursores CFU-GM como BFU-E en la médula, alcanzándose valores del 200% respecto al control en ambos precursores. Por el contrario, en bazo se obtenían valores de 138% y 150% en BFU-E y CFU-GM respectivamente. En ninguno de los órganos las CFU-S se encontraban estimuladas.

Estos resultados confirman la capacidad del AM5 para estimular los precursores hematopoyéticos, fundamentalmente esplénicos, tras la administración de una única dosis, y ponen de manifiesto que el AM5 se encuentra entre los MRB con mayor actividad estimuladora.

### **5.2.2.- Cinética seguida por los precursores hematopoyéticos tras el tratamiento con AM5.**

Con objeto tanto de determinar el día de máxima estimulación tras el tratamiento, como comprobar que tras la estimulación provocada por el AM5 la hematopoyesis retornaba a valores control, una vez establecida la dosis óptima del producto (0,4 mg/Kg), se analizaron los niveles de diferentes precursores hematopoyéticos tanto en médula ósea como en bazo, a distintos días después del tratamiento con AM5.

Además de los precursores analizados en estudios anteriores, CFU-S y CFU-GM, se cuantificó la BFU-E, precursor comprometido hacia la línea eritroide. El estudio de precursores representantes tanto de diferentes compartimientos (pluripotente y comprometido), como de diferentes líneas de diferenciación (eritroide y granulomacrofágica) podría aportarnos información sobre una posible descompensación del sistema hematopoyético como consecuencia del tratamiento con AM5.

Asimismo, el compartimiento de células maduras circulantes también fue contemplado en este estudio a través de los análisis de leucocitos y hematocrito.

Los resultados mostraron (Figura 27, 28 y 30), que el tratamiento con AM5 no estimuló la hematopoyesis en la médula ósea ni a nivel de celularidad ni de precursores pluripotentes o comprometidos hacia la línea granulo-macrofágica, durante el período de tiempo estudiado (1 a 15 días post-tratamiento). En cuanto a los precursores comprometidos hacia la línea eritroide (BFU-E), si bien se encontraban disminuídos 5 días después del tratamiento, retornaron a valores próximos al control el día 9 (Figura 31).

Estos resultados no diferían de los comentados en el apartado anterior, y abundan en la hipótesis según la cual, es difícil detectar acumulación de precursores hematopoyéticos en la médula ósea, por tener ésta una capacidad limitada de expansión.

En cuanto a la hematopoyesis esplénica, la celularidad total del bazo se encuentra incrementada de forma significativa tanto 5 como 9 días después de la administración de AM5, aunque recupera sus valores control a los 15 días post-tratamiento (Figura 27).

Independientemente del incremento de precursores hematopoyéticos mediado por el AM5, las cinéticas seguidas por los distintos precursores hematopoyéticos en bazo, mostraron la máxima estimulación 5 días después de la administración del producto. La estimulación a nivel de precursores eritroides (BFU-E) (430%), fue muy similar a la observada en precursores CFU-GM (510%), siendo ambas superiores a la mostrada por los precursores pluripotentes (330%) (Figuras 28, 30 y 31).

Sin embargo, mientras que tanto las CFU-S como las CFU-GM mostraron niveles significativamente superiores al control, un día después del tratamiento, los niveles de BFU-E no estaban incrementados en este día.

Hay que destacar que todos los precursores hematopoyéticos analizados alcanzaban valores próximos al control 15 días después del tratamiento, mostrando que el sistema no era estimulado de forma irreversible.

En el compartimiento de células maduras circulantes, no se observaron diferencias significativas respecto al control ni en los valores de hematocrito ni en los de leucocitos durante el período de tiempo estudiado (Figura 32).

Las cinéticas mostradas por los distintos precursores tras el tratamiento con AM5, son muy similares a las descritas para otros MRB, como por ejemplo el glucano-P. En ambos casos, la máxima estimulación de la hematopoyesis esplénica se observa 5 días después del tratamiento, normalizándose en días posteriores hasta alcanzar el nivel control (Patchen y Mac Vittie, 1985). Asimismo, ninguno de los dos productos es

capaz de incrementar los precursores hematopoyéticos en la médula ósea durante el período de tiempo estudiado.

La forma soluble del glucano-P, el glucano-F, que a diferencia de la forma particulada no produce efectos secundarios como esplenomegalia o formación de granulomas, también es capaz de estimular la hematopoyesis esplénica de ratones no irradiados, con valores de CFU-GM próximos al 500%, en los días 5, 11 y 15 post-tratamiento. Sin embargo, es importante destacar que 21 días después de la administración de una dosis única de glucano-F (200mg/Kg), los precursores CFU-GM aún muestran niveles muy superiores al control (390%). Los autores no han realizado estudios en días posteriores, pero el hecho de que la hematopoyesis no se normalice con el tiempo, dificultaría la aplicación clínica de este producto (Patchen y Mac Vittie, 1986a).

Las cinéticas de precursores hematopoyéticos en bazo tras el tratamiento con factores recombinantes, difieren de la observada tras la administración de AM5, si bien como hemos comentado estos productos son administrados durante una serie de días consecutivos (debido a su baja vida media en suero), mientras que el AM5 se administra en dosis única.

La administración "i.p" de una dosis única de 0,5  $\mu\text{g}/\text{día}$  de IL-1 a ratones no irradiados no estimula la hematopoyesis medular, si bien ésta no disminuye como ocurría tras el tratamiento con otros CSFs. En relación al bazo, los precursores BFU-E y CFU-GM mostraron niveles del 150% respecto al valor control 2 días post-tratamiento, descendiendo en el día 3 a valores próximos al control (Johnson y col, 1989).

El G-CSF (2,5  $\mu\text{g}/\text{día}$ ), administrado "s.c." durante 9 días consecutivos estimula la hematopoyesis esplénica, no incrementando los niveles de precursores en médula. Así, un día después de iniciado el tratamiento la médula ósea mostraba niveles de CFU-GM del 52% en relación al control, si bien en días posteriores estos iban recuperándose hasta alcanzar el día nueve valores del 160%. El número de precursores CFU-GM en médula ósea, 17 días después de iniciado el tratamiento eran próximos al control. En el bazo, por el contrario, los precursores CFU-GM aumentaban de manera progresiva hasta alcanzar un máximo en el día 7 de tratamiento (1300% respecto al control). Al interrumpirse el tratamiento, los niveles de CFU-GM descienden bruscamente a las 24 horas (día 10) mostrando valores del 450%, y retornando a valores control el día 17 (Patchen y col, 1990).

El hecho de que la estimulación de la línea granulo-macrofágica fuera muy similar a la de la línea eritroide tras el tratamiento con AM5, es de gran importancia ya que indica que no hay una estimulación descompensada del sistema hematopoyético, estimulando una determinada línea celular a expensas de la disminución de otra.

Tras el tratamiento con dosis altas de G-CSF (250  $\mu$ g/día), si bien la hematopoyesis esplénica no se veía descompensada, los autores detectaron una descompensación de la hematopoyesis medular con un fuerte incremento en el contenido de granulocitos, mientras que la eritropoyesis se encuentra suprimida, interpretándose que el aumento en la granulopoyesis medular ocurre a expensas de la producción de eritrocitos (Molineux y col, 1990).

En resumen, las cinéticas de distintos precursores hematopoyéticos tras la administración de una dosis única de AM5, confirman la existencia de una respuesta diferente de la médula ósea y el bazo frente al tratamiento, siendo este último órgano el que presenta mayor capacidad de respuesta, acumulando altos niveles de precursores tanto pluripotentes como comprometidos, mientras que la médula ósea no muestra esta capacidad. Además, el tratamiento con AM5 no produce una des-compensación del sistema hematopoyético, ni supone una estimulación irreversible del mismo.

#### 5.2.2.1.- Movilización de precursores hematopoyéticos pluripotentes tras el tratamiento con AM5.

Como hemos indicado, el tratamiento con AM5 no produce incremento en los niveles de precursores hematopoyéticos medulares, lo que podría deberse, entre otras causas, a fenómenos de migración de precursores desde éste órgano, a través de sangre periférica.

Con objeto de determinar si el tratamiento con AM5 inducía movilización de precursores pluripotentes, se cuantificaron los niveles de CFU-s en sangre periférica tres días después del tratamiento con 0,4 mg/Kg de AM5. La elección de este día para la realización de los ensayos, se estableció en base a los resultados obtenidos en bazo de ratones no irradiados y tratados con AM5. En el día 3 aunque la población de CFU-S en bazo está amplificada (250% del valor control), no ha alcanzado el máximo, lo que significa que en ese día el compartimento de precursores pluripotentes está expandiéndose.

Los niveles de CFU-S en sangre periférica (Tabla VIII) de ratones tratados con AM5, eran significativamente superiores a los obtenidos en ratones control (264%).

Estos resultados confirman, que la administración de AM5 induce movilización de precursores a través de sangre periférica, y apoyan la idea de que el AM5 podría actuar también a nivel de la hematopoyesis medular. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes, ya que el exceso de CFU-S en sangre periférica podría proceder del bazo.

5.2.2.2.- La estimulación hematopoyética producida por el AM5 no es consecuencia del LPS residual presente en la muestra.

En la mayoría de los procesos de obtención de los MRB, están implicadas directa o indirectamente las bacterias, lo que hace que las muestras contengan por lo general contaminaciones residuales con endotoxina bacteriana (LPS).

Incluso en el caso de los factores recombinantes hematopoyéticos, al estar clonados en bacterias, las muestras poseen cantidades residuales de LPS.

Por ello, siempre subyace la duda de si la estimulación hematopoyética observada tras el tratamiento con uno de estos compuestos, no estará mediada por el LPS residual, ya que está descrito que la endotoxina incluso a dosis bajas, es capaz de estimular la hematopoyesis en ratones no irradiados (Quesenberry y col, 1973; Staber y Johnson, 1980).

También el AM5 contiene cantidades residuales de LPS (resultados de Laboratorios Andrómaco) siendo, por tanto, necesario comprobar que no era ésta, responsable de la actividad hematopoyética observada.

Con este objetivo, distintas concentraciones de LPS de E. coli o S. abortus fueron inyectadas "i.v." a ratones híbridos o poco respondedores a endotoxina, determinándose su efecto sobre los niveles de precursores CFU-GM en bazo 5 días post-tratamiento, día en el que se observa la máxima estimulación con AM5.

Los resultados mostraban (Figura 33) que sólo cantidades de LPS de E. coli entre 5 y 10 veces superiores a las presentes en el AM5, eran capaces de producir un incremento de precursores en bazo, superior al observado tras el tratamiento con AM5. Con LPS de S. abortus, ninguna de las dosis administradas fue capaz de producir niveles de estimulación semejantes a los obtenidos con AM5 (Figura 33).

En ratones poco respondedores a endotoxina (C3H/HeJ), el AM5 producía una estimulación en bazo algo inferior a la observada en ratones F1(C57BlxBalb/C), y únicamente cantidades de LPS de E. coli 10 veces superiores a las presentes en la muestra, eran capaces de producir una estimulación semejante a la observada tras el tratamiento con 0,4 mg/Kg de AM5 (Figura 34). Dosis altas de S. abortus (10x), incluso produjeron un descenso significativo en los niveles de precursores CFU-GM.

Si bien estos resultados sugerían, que el efecto estimulador promovido por el AM5 no se debía a la contaminación residual con LPS de la muestra, la variabilidad entre los distintos LPSs junto con la necesidad de tener un resultado concluyente, que descartara definitivamente la mediación en el efecto del AM5 de endotoxinas, nos llevó a diseñar un protocolo más concluyente.

Puesto que el LPS es muy estable a tratamientos a altas temperaturas (Avis y col, 1987), el protocolo diseñado iba encaminado a conseguir mediante tratamiento hipertérmico una inactivación del AM5, sin que el LPS se viera inactivado.

El tratamiento térmico del AM5 (100°C, 30 minutos), supuso una pérdida de su actividad estimuladora (Tabla IX). Por el contrario, el LPS sometido al mismo tratamiento de calor no veía reducida su capacidad para estimular los precursores CFU-GM en bazo.

Estos resultados confirmaban que la estimulación hematopoyética observada tras el tratamiento con AM5 no se debía al LPS presente en la muestra, sino que era una característica intrínseca al mismo.

### 5.2.3.- Capacidad radioprotectora del AM5.

La bibliografía recoge numerosos trabajos, en los que se pone de manifiesto que aquellos MRB capaces de estimular la hematopoyesis en ratones no irradiados, suelen ser agentes con capacidad radioprotectora en el rango de dosis de radiación en el que se produce el síndrome hematopoyético (Gallichio y col, 1984; Patchen y col, 1987; Pojda y col, 1990).

A este hecho hay que añadirle, en el caso del AM5, su capacidad para estimular precursores hematopoyéticos pluripotentes (E-CFU) en animales sometidos a una irradiación subletal (Figura 24).

A la vista de estos antecedentes, nos pareció lógico determinar si el AM5 era capaz de incrementar la supervivencia de ratones sometidos a dosis potencialmente letales de radiación.

Las dosis de radiación empleadas en estudios de supervivencia suelen estar comprendidas en el rango de LD50/30 y LD100/30 (radiación letal para el 50 ó 100% de los animales a los 30 días). Nosotros elegimos la dosis de 7,6 Gy que corresponde a la LD90/30, para la cepa de ratón F1(C57BlxBalb/C).

Se ensayaron diversas pautas de administración del AM5, eligiéndose los días 5, 3 y 1 previos a la irradiación, como días para administrar la dosis óptima de 0,4 mg/Kg. Junto a estos protocolos se incluyó otro, en el que el AM5 era administrado 1 hora después de la irradiación.

Las cinéticas de precursores en ratones no irradiados tras la administración de AM5, indicaban que el número máximo de precursores hematopoyéticos se obtiene a los 5 días después del tratamiento. Por ello, desechamos la utilización de protocolos que

supusieran un período mayor a 5 días entre administración de AM5 e irradiación, por entender que a partir de este momento se estaba produciendo un fenómeno de recesión hematopoyética.

Hasta alcanzar su máximo, 5 días después de la administración de AM5, los compartimientos de precursores pluripotentes y comprometidos se encuentran en un período de estimulación, por lo que la utilización de los días 1 y 3 nos permitía relacionar supervivencia con actividad hematopoyética.

Con la administración de AM5 una hora después de la irradiación, pretendimos obtener alguna indicación sobre la capacidad de este compuesto para proteger a ratones irradiados previamente.

Cuando el AM5 se administró antes de la irradiación de los animales, si bien no todas las pautas de administración resultaron positivas, en ningún caso se potenció la mortalidad. Así, con el tratamiento con AM5 tres o cinco días antes de la irradiación se alcanzaron niveles de mortalidad próximos al 90% a los 30 días, valores coincidentes con los de grupos control (Figura 37).

Por el contrario animales tratados con 0,4 mg/Kg de AM5 un día antes de la irradiación con 7,6 Gy, presentaron unos porcentajes de supervivencia ampliamente superiores a los valores control (Figura 37). El 90% de estos ratones sobrevivieron a una dosis de radiación que en ausencia de tratamiento con AM5 supone una supervivencia de sólo el 10%.

Estos niveles de supervivencia eran superiores a los obtenidos en ratones tratados con dextrán sulfato, compuesto utilizado como control positivo en nuestros experimentos. Los mejores resultados con dextrán sulfato no produjeron niveles de supervivencia superiores al 70%, en nuestras condiciones experimentales.

El tratamiento con AM5 1 hora después de someter a los animales a irradiación, no mejoró la supervivencia. Este comportamiento del AM5 coincide con el descrito en éste mismo trabajo con AM3 (Figura 22), y los descritos para glucano-P en la bibliografía (Patchen y Mac Vittie, 1985).

Aunque existen MRB capaces de incrementar la supervivencia cuando son administrados después de la irradiación, su efecto radioprotector es generalmente menor que cuando el tratamiento se realiza pre-irradiación. Entre otros se pueden citar al glucano-F (Patchen Mac Vittie, 1986b) y extractos naturales de plantas medicinales como el extracto de Shigoka (Miyanomae y Frindel, 1988).

Hasta el momento, sólo se ha descrito un compuesto cuya capacidad radioprotectora sea mayor al administrarse después de la irradiación, el Cobre(II)2 (3,5-diisopropilsalicilato)4, complejo de bajo peso molecular, caracterizado por mimetizar la actividad de la superóxido dismutasa. Su administración después de una irradiación potencial-

mente letal (LD50/30), produce niveles de supervivencia del 70% (Sodelberg y col, 1990).

El rG-CSF también se ha descrito como radioprotector activo cuando se administra post-irradiación (Tanikawa y col, 1990; Patchen y col, 1990), si bien hay que tener en cuenta que para que sea efectivo ha de administrarse durante un período de tiempo entre 6 y 13 días (2,5  $\mu\text{g}/\text{día}$ ), por lo que los resultados no son comparables con los de AM5 u otros MRB activos tras la administración de una única dosis.

Hay que destacar que la mayoría de los MRB muestran su máxima capacidad radioprotectora cuando son administrados 1 día antes de la irradiación, si bien se desconocen las razones de este comportamiento (Vacek y col, 1990). Entre ellos se encuentran los glucanos P y F (Patchen y col, 1986), el G-CSF cuando se administra una única dosis (Uckun y col, 1990) y la IL-1 (Schwartz y col, 1987; Wu y col, 1989), cuyos tratamientos conducen a un incremento en la supervivencia de animales irradiados con dosis potencialmente letales (58% el glucano-F; 65% el G-CSF y 95% la IL-1).

Aunque no todos los MRB anteriores están ensayados a la misma dosis de radiación, es importante resaltar que el tratamiento con AM5 1 día antes de una irradiación potencialmente letal, produce niveles de supervivencia muy similares a los descritos para la IL-1, uno de los radioprotectores más potentes descritos hasta el momento.

En otro bloque de experimentos, se observó que el tratamiento con AM5 tres días antes de la irradiación subletal (3,0 Gy), aceleraba la recuperación de los precursores comprometidos hacía la línea granulo-macrofágica (CFU-GM), tanto en la médula ósea como en el bazo, con incrementos del 130% y 250% en relación a los controles irradiados, respectivamente (Tabla X).

En estos mismos ensayos, se observó que el tratamiento con AM5 un día antes de la irradiación, protocolo que había mostrado la máxima eficacia en ensayos de supervivencia, producía incrementos en los niveles de CFU-GM en bazo del 290% respecto al control irradiado, mientras que los precursores CFU-GM de médula ósea no veían incrementada su recuperación (Tabla X).

El tratamiento con AM5, cinco días antes o una hora después de la irradiación, no era capaz de estimular la hematopoyesis ni en médula ni en bazo.

Quedaba así confirmada la capacidad del AM5 para favorecer la recuperación hematopoyética en animales sometidos a radiación, hecho que puede estar de algún modo relacionado con la capacidad del AM5 para aumentar la supervivencia de animales sometidos a irradiación potencialmente letal.

Se han descrito diversos mecanismos, a través de los cuales podría explicarse el aumento de la supervivencia tras una irradiación potencialmente letal, promovido por el tratamiento con un MRB. La mayoría de los mecanismos contemplan la existencia de una relación entre supervivencia y recuperación hematopoyética.

Así, el aumento de supervivencia podría deberse a que en el momento de la irradiación el compartimiento de células cepa estuviera amplificado, sobreviviendo un mayor número de precursores pluripotentes a la irradiación, lo que permitiría una reconstitución más rápida del sistema hematopoyético, y por tanto un aumento de la supervivencia. Sin embargo, los ratones irradiados 5 días después de la administración de AM5, momento en el que se alcanza el máximo contenido en precursores pluripotentes (330%), no veían incrementada su supervivencia respecto a los controles (Figura 37). Descartándose así que éste fuera el mecanismo responsable de la radioprotección inducida por AM5.

Otro de los mecanismos propuestos, implica una relación directa entre capacidad del compuesto para estimular los precursores que han sobrevivido a la irradiación, acelerando la reconstitución de los distintos compartimientos hematopoyéticos y el aumento en la supervivencia. De nuevo, este mecanismo no puede explicar el efecto radioprotector asociado al tratamiento con AM5, ya que la administración de éste 1 hora después de la irradiación no era capaz de aumentar la supervivencia (Figura 37). Además, estudios realizados en animales subletalmente irradiados mostraban que el tratamiento con AM5 1 hora post-irradiación, no tenía capacidad para estimular la recuperación de precursores ni en médula ósea ni en bazo (Tabla X).

Potencialmente, el AM5 podría aumentar bien la radio-resistencia de los precursores hematopoyéticos o la capacidad de éstos para reparar daño subletal. Estas hipótesis concuerdan con los resultados obtenidos en supervivencia o en recuperación de precursores tras una irradiación subletal. El tratamiento con AM5 un día antes de la irradiación, es el más efectivo tanto para aumentar la supervivencia de animales sometidos a dosis potencialmente letales de radiación (Figura 37), como en acelerar la recuperación de la hematopoyesis esplénica tras una irradiación subletal (Tabla X).

Sin embargo, no se pueden descartar otros mecanismos de acción donde no estén implicados directamente efectos del compuesto sobre los precursores hematopoyéticos, al menos en los primeros días tras la irradiación. Así, por ejemplo, se ha sugerido que el glucano-P es capaz de aumentar la supervivencia al aumentar la resistencia del animal a infecciones oportunistas, a través de un aumento del número y/o funcionalidad de los macrófagos. Por otra parte se ha descrito que este compuesto tiene una cierta capacidad para captar radicales libres, por lo que ésta podría ser otra vía de su acción radioprotectora (Patchen y col, 1987). Estas vías de acción no son descartables para el AM5, aunque no han sido objeto de estudio en este trabajo.

En cualquier caso, de los resultados obtenidos en animales irradiados se deduce que el AM5 podría tener una aplicación clínica en pacientes sometidos a tratamientos antitumorales agresivos, en los que se requiere una rápida recuperación de la médula antes de que aparezcan estados patológicos de leucopenia, trombopenia, granulocitopenia etc, que provoquen la muerte del individuo.

Los factores de crecimiento hematopoyéticos han sido ya aplicados en clínica, poniendo de manifiesto el importante papel que pueden jugar los MRB en el tratamiento del cancer (Ganser y col, 1990; Negrin y col, 1990; VadhanRaj y col, 1990).

Claro está, que para que un producto que muestra actividad estimuladora en animales de experimentación (ratón), pueda ser utilizado en clínica, ha de superar toda una serie de etapas, como son, el demostrar que su actividad no es específica de especie (cobayas, monos y por último humanos), y que no produce efectos secundarios a nivel de otros órganos distintos a los hematopoyéticos. Con el AM5 el primer paso está dado, y los otros, obviamente, no forman parte del objetivo de esta tesis.

#### **5.2.4.- Capacidad del AM5, administrado "in vitro", para estimular la hematopoyesis en LTBMCS.**

Hasta ahora, hemos expuesto y discutido distintos aspectos relacionados con el AM3 y el AM5, y su capacidad para estimular el sistema hematopoyético. Con ambos productos, lo que se contempla es su administración oral o intravenosa, pero siempre realizándose el tratamiento "in vivo".

Si bien a la hora de evaluar la acción de un producto, resulta absolutamente imprescindible su análisis "in vivo", es así mismo cierto que una vez detectados y cuantificados sus efectos, a la hora de profundizar en sus mecanismos de acción resulta aconsejable la utilización de sistemas "in vitro" que simplifiquen el modelo biológico.

Con el desarrollo del cultivo de larga duración de médula ósea (LTBMC) (Dexter y col, 1977) se ha conseguido reproducir "in vitro" la hematopoyesis medular.

A diferencia de la médula "in vivo", que posee una capacidad limitada para expandirse, la hematopoyesis en LTBMCS va a poder amplificarse por la propia naturaleza del cultivo, sin que tengan lugar fenómenos de migración de precursores, que enmascaren la estimulación provocada por el tratamiento con un MRB.

Además, en este cultivo, a diferencia de lo que ocurre en cultivos a corto plazo en matriz semisólida, la hematopoyesis sigue un proceso dinámico. En la capa adherente

del cultivo, el equivalente al microambiente hematopoyético de la médula ósea, se localizan una serie de focos o "nichos", donde se asientan los precursores hematopoyéticos pluripotentes. Estos precursores al perder contacto con el "nicho", quedan expuestos a factores microambientales, perdiendo su capacidad de automantenimiento. A medida que los precursores van proliferando y diferenciando, son liberados desde la capa adherente al sobrenadante (Dexter y col, 1984).

Así, estos cultivos constituyen un sistema biológico adecuado para realizar, no sólo la cuantificación de procesos de estimulación hematopoyética, sino también para profundizar en los mecanismos de regulación implicados en esa estimulación.

Los resultados expuestos en apartados anteriores, ponían de manifiesto la capacidad del AM5 para estimular la hematopoyesis esplénica "in vivo". Si bien no se observó acumulación de precursores hematopoyéticos en la médula después del tratamiento con AM5, el aumento en los niveles de CFU-S en sangre periférica tras este tratamiento, ponía de manifiesto la existencia de fenómenos de migración, que podrían explicar la no detección de estimulación sobre la hematopoyesis medular.

El cultivo de larga duración resulta idóneo para obtener un resultado concluyente sobre la capacidad del AM5 para estimular la hematopoyesis medular.

El primer parámetro analizado fue la relación dosis de AM5 y respuesta hematopoyética en el cultivo. Para ello, utilizamos dosis del mismo orden de las administradas a los animales "in vivo". Así, se utilizó un rango de dosis comprendido entre 0,2-1,0  $\mu\text{g/ml}$ , lo que suponía 2-10  $\mu\text{g/botella}$  de cultivo.

En estos cultivos es posible observar un comportamiento diferente entre el sobrenadante y la capa adherente. Mientras que en la capa adherente se encuentran localizados los focos hematopoyéticos, el sobrenadante supone el compartimiento al que se liberan las distintas poblaciones celulares procedentes de la capa adherente.

En el rango de dosis estudiado, se pudo constatar una clara relación dosis-respuesta tanto en lo que se refiere a número de células totales (celularidad) (Figura 43), como a precursores pluripotentes (CFU-S) (Figura 45) o comprometidos (CFU-GM), alcanzándose la máxima estimulación con dosis de 0,8-1,0  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 46).

En los sobrenadantes de LTBMCs los niveles de precursores comprometidos (Figura 46) aumentaron más allá de los de precursores pluripotentes (Figura 45) (500% y 300% respectivamente).

La respuesta de la capa adherente al tratamiento, fue diferentes a la observada en el sobrenadante. Así, la celularidad disminuyó a medida que la dosis de AM5 fue aumentando (Figura 43), alcanzando valores mínimos con dosis de 1,0  $\mu\text{g/ml}$  (40% respecto al control). Los niveles de precursores pluripotentes (Figura 45), únicamente

mostraron diferencias respecto al control tras dosis de 0,8  $\mu\text{g/ml}$  (130%). Por el contrario, los precursores comprometidos (Figura 46) de la capa adherente presentaban una estimulación dependiente de la dosis administrada, alcanzándose valores del 250% tras dosis de 0,8-1,0  $\mu\text{g/ml}$ .

A partir de estos resultados, la conclusión que es posible establecer, es la de la capacidad del AM5 para actuar sobre la hematopoyesis de la médula ósea, fenómeno que no había podido ser puesto de manifiesto "in vivo". Este hecho corrobora la hipótesis de que el AM5 actúa a nivel de ambos órganos hematopoyéticos, médula ósea y bazo, y que la no constatación de un incremento de la hematopoyesis medular, es consecuencia de fenómenos de migración de precursores hacia otros órganos, a través de sangre periférica tal y como sugerimos anteriormente (apartado 5.2.2.1.).

Una vez constatada la capacidad del AM5 para estimular la hematopoyesis en LT BMC, se abordó el análisis de la respuesta de este cultivo a múltiples dosis. El objetivo fue determinar si nuevas dosis de AM5 seguían potenciando la hematopoyesis, o si por el contrario, ello se traducía en un "agotamiento" prematuro de la misma.

Para ello, se utilizaron dosis de 0,2 y 0,8  $\mu\text{g/ml}$ , realizándose tratamientos durante 1, 2, 3 ó 4 semanas consecutivas, coincidiendo con el cambio de medio.

Como se observa en las Figura 48 y 49, con dosis de 0,2  $\mu\text{g/ml}$  la estimulación tanto en la celularidad como en los niveles de precursores CFU-GM en el sobrenadante del cultivo, era proporcional al número de dosis administradas. A estas mismas dosis, el grado de estimulación de la capa adherente era similar al alcanzado tras una dosis única.

Cuando la dosis administrada fue de 0,8  $\mu\text{g/ml}$ , se observó un incremento en la celularidad del sobrenadante, dependiente del número de dosis administradas (Figura 48). Por el contrario, los niveles de CFU-GM también en el sobrenadante, descendían tras cuatro dosis de AM5 (75% respecto al valor control) (Figura 49).

De nuevo, la capa adherente mostró un comportamiento diferente. Así, si bien la administración de una dosis de AM5 producía un descenso en la celularidad, ésta no se vio acentuada con la administración de múltiples dosis (Figura 48). Por el contrario, los valores de precursores CFU-GM aún encontrándose por encima de los valores control en cultivos tratados con 1 ó 2 dosis de AM5, disminuyeron significativamente hasta valores del 25% en relación al control en LT BMCs tratados con 4 dosis de AM5 (Figura 49).

Estos descensos en los niveles de precursores los interpretamos como un agotamiento del cultivo, como consecuencia de la superproducción hematopoyética inducida por el tratamiento con AM5 a dosis de 0,8  $\mu\text{g/ml}$ .

Con factores de crecimiento como la IL-3 se han descrito niveles de estimulación semejantes a los observados con AM5. Tras nueve semanas de tratamiento con 2 ng/ml añadido semanalmente, se obtenían incrementos del 200% en la celularidad y del 550% en los niveles de CFU-GM del sobrenadante. Sin embargo, estos autores analizan únicamente la estimulación de precursores hematopoyéticos en el sobrenadante del cultivo. Un incremento a este nivel no indica que inequívocamente se esté produciendo una estimulación hematopoyética, ya que este incremento podría deberse a una migración de precursores desde la capa adherente del cultivo, lo que se traduciría en una despoblación progresiva de la misma (Eliason y col, 1988).

Tratamientos con GM-CSF (3 ng/ml) no producían estimulación hematopoyética en el LTBMCM. Incluso con dosis 10 veces mayores (30 ng/ml) administradas durante 6 semanas consecutivas no se consigue incrementar los niveles de precursores hematopoyéticos (Williams y Burgess, 1980; Eliason y col, 1988).

Tampoco se ha observado estimulación hematopoyética en LTBMCMs como consecuencia del tratamiento con M-CSF (Dexter y Shadduck, 1980).

Por el contrario el litio, un agente capaz de incrementar "in vivo" la producción de granulocitos (Rothstein y col, 1978), estimula la mielopoyesis cuando se administra "in vitro" a LTBMCM (Doukas y col, 1986). Concentraciones de 1 MEq de litio producen incrementos en la celularidad del 250% en relación al valor control, tres semanas después de iniciado el tratamiento. Se ha observado asimismo incremento en los niveles de CFU-S, CFU-GM y CFU-Meg tanto en el sobrenadante como en el estroma de LTBMCMs tratados con litio (Levitt y Quesenberry, 1980).

#### 5.2.5.- ¿Son los CSFs mediadores del efecto estimulador del AM5 en LTBMCM?

La importancia de los factores reguladores hematopoyéticos en fenómenos de proliferación de precursores "in vitro", se puso de manifiesto desde el momento en que se consiguió clonar el primer precursor (Bradley y Metcalf, 1966). Sin embargo, el papel que estos factores juegan en la regulación hematopoyética de cultivos de larga duración de médula ósea, ha estado sometido a discusión durante bastante tiempo.

En los primeros trabajos en los que se ensayó el efecto de la adición de CSFs a cultivos de larga duración, no se observaron incrementos de la hematopoyesis. Además, la adición de antisueros anti CSFs parecían no afectar la producción hematopoyética en LTBMCMs. Ello hizo pensar, que la mielopoyesis en estos cultivos no estaba regulada por CSFs ó que la producción de éstos, era mínima en el cultivo, actuando localmente.

Sin embargo, hoy existen toda una serie de evidencias que indican que los CSFs están directamente implicados en la regulación de la mielopoyesis en LTBM. Heard y col en 1982 (Heard y col, 1982) detectaron niveles significativos de CSFs en cultivos de larga duración.

Posteriormente, el grupo de Gualtieri (Gualtieri y col, 1984), aportó nuevas evidencias sobre la importancia de los CSFs en LTBM, al demostrar un aumento de factores hematopoyéticos dependiente de la dosis de radiación a la que era expuesto el cultivo. Los CSFs eran incrementados a medida que la mielopoyesis disminuía, como consecuencia de la irradiación.

Se han detectado altos niveles de CSF en LTBM, 24 horas después del cambio de medio (Lipschitz y col, 1987; Udupa y Lipschitz, 1988). En este sistema, demostraban que un aumento en la mielopoyesis era invariablemente precedido por un aumento significativo en los niveles de CSF.

Por todo lo mencionado anteriormente, cabía la posibilidad de que la fuerte estimulación hematopoyética observada en LTBM tras el tratamiento "in vitro" con AM5, estuviera mediada por un aumento en los niveles de CSFs presentes en el cultivo.

La aproximación seguida para detectar CSFs en LTBM tratados con AM5, fue en un principio global, encaminada a demostrar la presencia de actividad estimuladora de colonias en estos cultivos, sin pretender caracterizar todos los factores implicados.

Se empleó el ensayo convencional de CFU-GM para determinar si los sobrenadantes de LTBM tratados con AM5 contenían los factores necesarios para el desarrollo de colonias CFU-GM en cultivo "in vitro", el cual se sabe que requiere inexcusablemente la presencia de factores hematopoyéticos.

Los primeros sobrenadantes analizados, procedieron de cultivos de larga duración tratados con 0,8  $\mu\text{g/ml}$  de AM5, al ser esta dosis la que producía la máxima estimulación hematopoyética.

Los resultados (Figura 51), demostraban la presencia de GM-CSA en los sobrenadantes de cultivos tratados. La relación cantidad de sobrenadante añadida, número de colonias formadas "in vitro", era similar a la descrita para medios condicionados tradicionales (Metcalf y Johnson, 1978; Dexter y col, 1980). A bajas concentraciones de sobrenadante, se observó una dependencia entre el número de colonias formadas y cantidad de sobrenadante añadida. Por encima de una determinada concentración, se alcanzaba un plató, a partir del cual un aumento en la concentración de sobrenadante no induce la formación de nuevas colonias. Esto se debe a que todos los precursores susceptibles de formar colonias, ha sido ya inducidos a ello.

Estos resultados demuestran que la estimulación hematopoyética inducida por AM5 está mediada por GM-CSA.

El hecho de que la estimulación hematopoyética en cultivos de larga duración tras el tratamiento con AM5, fuera dependiente de la dosis de producto administrada (Figura 46), hacía pensar que los niveles de GM-CSA presentes en los sobrenadantes, también dependerían de la dosis de AM5 añadida al cultivo.

Se observó una relación directa entre dosis de AM5 añadida al cultivo y niveles de GM-CSA presentes en el sobrenadante (Figura 52), siendo máximos los niveles de GM-CSA con dosis de 1,0  $\mu\text{g/ml}$ , aunque dosis de 0,4  $\mu\text{g/ml}$  eran suficientes para inducir altas cantidades de GM-CSA.

Este comportamiento estaba relacionado con la estimulación de precursores hematopoyéticos en LTBMCs tras el tratamiento con AM5. Con dosis bajas de producto tenía lugar una ligera estimulación de los precursores hematopoyéticos en el cultivo, observándose asimismo bajos niveles de GM-CSA. Tras dosis altas de AM5 (0,8  $\mu\text{g/ml}$ ) los niveles de precursores hematopoyéticos en el cultivo, estaban fuertemente incrementados, detectándose en el sobrenadante altos niveles de GM-CSA.

Hay que destacar por tanto que, aunque por razones experimentales, la cuantificación de GM-CSA se realizó un día en el que no se espera que los niveles de factores sean máximos, la concentración de actividad estimuladora detectada en cultivos tratados con AM5 eran muy elevada, lo que es una prueba más de la gran capacidad estimuladora de este producto.

En el sobrenadante de cultivos de larga duración tratados con litio, también se ha detectado GM-CSA, observándose un incremento de cuatro veces en el número de colonias CFU-GM crecidas "in vitro" en presencia del sobrenadante tratado, en relación a las obtenidas con sobrenadante control (Mc Grath y col, 1987). Sin embargo, para obtener estos incrementos en el número de colonias CFU-GM, la cantidad de sobrenadante añadida al ensayo era del 50% (v/v). Con el AM5, las cantidades de sobrenadante utilizadas eran del 20% (v/v).

Únicamente sobrenadante de cultivos tratados con litio, concentrados 6-8 veces, contenían niveles de GM-CSA semejantes a los obtenidos tras el tratamiento con AM5 (Quesenberry y col, 1984).

En ningún caso detectamos GM-CSA en sobrenadantes procedentes de cultivos control sin tratar, ni siquiera cuando éstos eran concentrados 5 veces por métodos de ultrafiltración. Otros autores han descrito la presencia de GM-CSA en sobrenadantes de cultivos control, si bien los niveles detectados son siempre bajos (Shaddock y col, 1983).

Cabía esperar que los factores responsables de la actividad estimuladora de colonias observada, correspondieran a CSFs que ya han sido descritos como factores reguladores hematopoyéticos, lo que nos llevó a utilizar membranas de ultrafiltración que seleccionaran moléculas de peso molecular superior a 10.000 daltons (los CSFs descritos poseen  $P_m > 10.000$ ).

Los resultados obtenidos (Figura 53), confirmaban que los factores presentes en cultivos tratados con AM5 eran de peso molecular superior a 10.000 daltons, ya que frente a niveles casi indetectables de GM-CSA en sobrenadantes de cultivos tratados con 0,2  $\mu\text{g/ml}$  de AM5, estos sobrenadantes concentrados 5 veces mostraron niveles de actividad estimuladora muy similares a los obtenidos en el control positivo (AF-MC).

Puesto que la estimulación hematopoyética en cultivos de larga duración de médula ósea, era dependiente del número de dosis de AM5 administradas, se cuantificaron los niveles de GM-CSA en cultivos sometidos a tratamientos semanales con AM5, con objeto de determinar si la relación entre niveles de precursores y actividad GM-CSA, observada en cultivos tratados con una dosis única, se mantenía en el caso de dosis múltiples.

Así, se analizó la presencia de GM-CSA en los sobrenadantes de cultivos tratados con 1, 2 ó 3 dosis de AM5 (0,8  $\mu\text{g/ml}$ ), observándose que los niveles de actividad estimuladora disminuían a medida que el número de dosis de AM5 administradas era mayor.

Si bien existía una relación clara entre estimulación hematopoyética y niveles de GM-CSA en cultivos tratados con 1 dosis de AM5, no se pudo establecer ningún tipo de relación entre estos parámetros en cultivos tratados con múltiples dosis de producto (Figura 55).

Cultivos de larga duración tratados con 2 dosis de 0,8  $\mu\text{g/ml}$  de AM5 mostraban incrementos en los niveles de precursores, tanto en el sobrenadante como en el estroma, muy similares a los descritos en cultivos tratados con una dosis de 0,8  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que los niveles de GM-CSA eran más altos en éste último caso.

#### **5.2.6.- Caracterización de los CSFs liberados en LT BMC tras el tratamiento con AM5.**

Los resultados que demostraban la presencia de actividad estimuladora de colonias en LT BMCs tratados con AM5, apuntaban a que el factor liberado podría ser el GM-CSF.

La presencia de GM-CSF en el cultivo, explicaría los incrementos observados tanto en los niveles de precursores pluripotentes como comprometidos tras el tratamiento con AM5 (Sieff y col, 1985; Metcalf y col, 1986), lo que nos llevó a determinar si existía este factor en los cultivos tratados.

Así, una vez establecida la dilución de antisuero capaz de inhibir el 100% de la actividad del rGM-CSF (50U/ml) (Figura 56), se determinó la inhibición de la actividad estimuladora de colonias presente en sobrenadantes de LTBMCS tratados con 0,8  $\mu$ g/ml, frente a distintas diluciones de antisuero (1/50 a 1/1000).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que diluciones de 1/100, capaces de inhibir en un 100% al rGM-CSF, únicamente inhibió el 30% de la actividad presente en sobrenadantes de LTBMCS tratados con AM5. Incluso diluciones de 1/50 no conseguían inhibir toda la actividad presente en el sobrenadante (inhibición del 60%) (Figura 57).

Para otros productos como el litio, que induce liberación de CSA en LTBMCS, también se ha descrito que la adición de antisuero anti GM-CSF inhibe parcialmente la actividad estimuladora de colonias, alcanzándose sin embargo una mayor inhibición mediante una combinación de antisueros anti GM-CSF y anti M-CSF. Ésto llevó a estos autores a postular que la estimulación producida por litio en cultivos de larga duración se debe mayoritariamente a GM-CSF, si bien el M-CSF también está implicado en el efecto (Mc Grath y col, 1987).

En cultivos de larga duración de médula ósea sometidos a una irradiación también hay liberación de factores, los cuales mediante anticuerpos monoclonales han sido caracterizados como GM-CSF (Alberico y col, 1987).

Si bien los resultados obtenidos en estos experimentos, confirman que el AM5 induce la liberación de GM-CSF, factor que sería responsable de la fuerte estimulación observada en la hematopoyesis de estos cultivos, el hecho de que antisueros anti GM-CSFs, cuando se usan a diluciones dos veces superior a la necesaria para inhibir el 100% de rGM-CSF 50U/ml, no consigan inhibir el 100% de la actividad estimuladora presente en el sobrenadante del cultivo tratado, implica que o bien los niveles de GM-CSF presentes son muy elevados, o que como consecuencia del tratamiento con AM5 se liberan otros factores junto con el GM-CSF.

**CONCLUSIONES**

- 1.- El MRB analizado es un potente estimulador de la hematopoyesis murina, mostrando actividad tanto en su forma insoluble, AM3, como en su forma soluble, AM5.
- 2.- El tratamiento de ratones subletalmente irradiados con AM3 "vía oral", induce un incremento de su número de precursores hematopoyéticos pluripotentes en bazo.
- 3.- Este incremento, es independiente de que la administración del AM3 se lleve a cabo antes o después de la irradiación, así como de la dosis de radiación recibida por los animales.
- 4.- El protocolo óptimo para estimular la producción de precursores pluripotentes en ratones subletalmente irradiados, no incrementa la supervivencia del ratón frente a dosis potencialmente letales de radiación. Sin embargo, no descartamos una respuesta positiva con la utilización de otros protocolos experimentales.
- 5.- La administración intravenosa de una única dosis de AM5 a ratones no irradiados, provoca la estimulación de su hematopoyesis esplénica, afectando tanto a la población de precursores pluripotentes como a la de comprometidos, habiéndose demostrado que este efecto no es debido a la contaminación residual de LPS presente en la muestra. Por el contrario, este mismo tratamiento no produce efectos detectables sobre la hematopoyesis medular.
- 6.- La máxima estimulación hematopoyética en bazo, reflejada en el número de precursores pluripotentes y comprometidos, se alcanza cinco días después de la administración de AM5, retornando a valores control el día quince, lo que demuestra que el AM5 no induce una estimulación hematopoyética irreversible.
- 7.- El que tanto el número de precursores comprometidos hacia la línea granulo-macrofágica, como a la línea eritroide, se vieran incrementados en bazo como consecuencia del tratamiento con AM5, demuestra que este compuesto no induce una estimulación hematopoyética descompensada.

- 8.- El AM5 es un potente radioprotector, que actúa tanto sobre ratones irradiados con dosis potencialmente letales, incrementando su supervivencia, como en animales subletalmente irradiados estimulando la recuperación de precursores hematopoyéticos pluripotentes y comprometidos, tras la irradiación.
- 9.- La radioprotección conferida por el AM5, es altamente dependiente del intervalo de tiempo entre administración del producto e irradiación, siendo máxima cuando la administración se lleva a cabo un día antes de la exposición del animal a radiaciones ionizantes.
- 10.- La capacidad del AM5 para estimular "in vitro" la hematopoyesis en cultivos de larga duración de médula ósea (LTBMC), junto con el incremento de CFU-S en sangre periférica en ratones tratados "in vivo" con AM5, pone de manifiesto su capacidad para actuar sobre la hematopoyesis medular. El que esta actividad no se refleje "in vivo" en un incremento del número de precursores presentes en la médula ósea, sugiere la existencia de procesos de migración, desde este órgano a otros focos hematopoyéticos.
- 11.- La respuesta del cultivo de larga duración de médula ósea al tratamiento "in vitro" con AM5 es también dosis dependiente. Al igual que "in vivo", el AM5, induce un fuerte incremento tanto en la celularidad como en el número de precursores pluripotentes y comprometidos, presentes en el sobrenadante de estos cultivos.
- 12.- El tratamiento con múltiples dosis de AM5, demuestra que la estimulación hematopoyética de estos cultivos es acumulativa, con dosis moderadas de producto. Sin embargo, con dosis altas de AM5, se produce una estimulación tan fuerte de la hematopoyesis que conduce en último término al "agotamiento" prematuro del cultivo.
- 13.- El fuerte crecimiento hematopoyético observado en LTBMCs tratados con AM5, está mediado por la liberación de factores estimulantes hematopoyéticos (CSFs). Tras una única dosis de AM5, la concentración de GM-CSA presente en el sobrenadante de LTBMCs es función de la dosis de AM5 añadida al mismo.
- 14.- El efecto estimulador del AM5 sobre la hematopoyesis de LTBMC, está mediado por la liberación de GM-CSF, como lo demuestra el que la actividad estimuladora presente en los sobrenadante sea inhibida al adicionar antisueros

contra este factor. El que esta inhibición sea parcial, podría ser debido a que éste no es el único factor liberado como consecuencia del tratamiento con AM5.

- 15.- En resumen, podemos concluir que el MRB cuyo análisis ha sido objeto de esta tesis, presenta una potente capacidad estimuladora hematopoyética. Que es activo "vía oral" y "vía intravenosa", "in vivo" e "in vitro". Capaz de actuar tanto sobre ratones normales como irradiados. Que su efecto radioprotector se pone de manifiesto tanto frente a dosis potencialmente letales como subletales de radiación y que actúa mediante la liberación de factores endógenos hematopoyéticos.

Por todo ello, pensamos que este MRB tiene unas grandes expectativas de aplicación en clínica, si bien, para ello, se requiere previamente la realización de los correspondientes ensayos pre-clínicos, que confirmen que las actividades descritas en este trabajo, en ratón, se reproducen en humanos.

## **BIBLIOGRAFIA**

- ALBERICO, T.A.; IHLE, J.N.; LIANG, C.M.; MC GRATH, H.E. Y QUESENBERRY, P.. (1987). "Stromal growth factor production in irradiated lectin exposed long-term murine bone marrow cultures". Blood 69: 1120-1127.
- AVIS, K.E.; JEWELL, R.C. Y LUGWIG, J.D. (1987). "Studies on the thermal destruction of Escherichia coli endotoxin". Journal of Parenteral Sciences Technology 41: 49-56.
- AXELRAD, A.A.; MC LEOD, D.L.; SHREEVE, M.M. Y HEATH, D.S. (1973). "Properties of cells that produce erythrocytic colonies in vitro". En: Hemopoiesis in culture. Robinson, W.A. (Ed). DHEW Publications (NIH) pp: 74-205.
- AXELRAD, A.A. (1990). "Some hemopoietic negative regulators". Experimental Hematology 18: 143-150.
- BAGBY, G.C. (1989). "Interleukin-1 and hematopoiesis". Blood Reviews 3: 152-161.
- BECKER, A.J.; Mc CULLOCH, E.A. Y TILL J.E. (1963). "Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells". Nature 197: 452-454.
- BENTLEY, S.A. (1981). "A close range cell:cell interaction required for stem cell maintenance in continuous bone marrow culture". Experimental Hematology 9: 303-312.
- BENTLEY, S.A.; KIRBY, S.L.; ANKLESARIA, P. Y GREENBERGER, J.S. (1988). "Bone marrow stromal proteoglycan heterogeneity: phenotypic variability between cell lines and the effect of glucocorticoid". Journal of Cellular Physiology 136: 182-187.
- BLEIBERG, I.; RIKLIS, I. Y FABIAN, I. (1990). "Enhanced resistance of bone marrow transplanted mice to bacterial infection induced by recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor". Blood 75: 1262-1266.
- BLUME, K.G. (1986). "A review of bone marrow transplantation". International Journal of Cell Cloning 4 Suppl 1: 3-10.
- BOL, S. Y WILLIAMS, N. (1980). "The maturation state of three types of granulocyte-macrophage progenitor cells from mouse bone marrow". Journal of Cellular Physiology 102: 233-244.
- BOTNICK, L.E.; HANNON, E.C.; OBBAGY, J. Y HELMAN, S. (1982). "The variation of hematopoietic stem cell self-renewal capacity as a function of age: further evidence for heterogeneity of the stem cell compartment". Blood 60: 268-271.
- BRADLEY, T.R. Y METCALF, D. (1966). "The growth of mouse bone marrow cells in vitro". Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science 44: 2287-300.

- BRADLEY, T.R. Y HODGSON, G.S. (1979). "Detection of primitive macrophage progenitor cells in mouse bone marrow". Blood 54: 1446-1450.
- BRONCHUD, M.H.; POTTER, M.R.; MORGENSTERN, G.; BLASCO, M.J.; SCARFFE, J.H.; THATCHER, N.; CROWTHER, D.; SOUZA, L.M.; ALTON, N.K.; TESTA, N.G. Y DEXTER, T.M. (1988). "In vitro and in vivo analysis of the effects of recombinant human granulocyte colony stimulating factor in patients". British Journal of Cancer 58: 64-70.
- BURGALETA, C. Y GOLDE, D.N. (1977). "Effect of glucan on granulopoiesis and macrophage genesis in mice". Cancer Research 37: 1739-1742.
- BURGESS, A.W.; METCALF, D.; RUSSEL, S.H. Y NICOLA N.A. (1980) "Granulocyte-macrophage, megakaryocyte, eosinophil and erythroid colony stimulating factors produced by mouse spleen cells". Biochemical Journal 185: 301-314.
- BUTTURINI, A; GALE, R.P.; LOPES, D.M.; CUNHA, C.B.; HO, W.G.; SANPAI, J.M.; DE SOUZA, P.C.; CORDIERO, J.M.; NETO, C.; DE SOUZA, C.E.P.; TABAK, D.G. Y BURLA, A. (1988). "Use of recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor in the Brazil radiation accident". The Lancet 2: 471-475.
- CAMPBELL, A.D.; LONG, M.W. Y WICHA, M.S. (1987). "Haemonectin, a bone marrow adhesion protein specific for cells of granulocyte lineage". Nature 329: 744-746.
- CHAMPLIN, R.E.; NIMER, S.D.; IRELAND, P.; OETTE, D.H. Y GOLDE, D.W. (1989). "Treatment of refractory aplastic anemia with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor". Blood 73: 694-699.
- CHATELAIN, C.; DE BAST, M. Y SYMANN, M. (1988). "Identification of a light density murine megakaryocyte progenitor (LD-CFU-M)". Blood 72: 1187-1191.
- CLARK, S.C. Y KAMEN, R. (1987). "The human hematopoietic colony-stimulating factors". Science 236: 1229-1237.
- CLARK, S.C. (1988). "Biological activities of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor". International Journal of Cell Cloning 6: 365-377.
- CLUTTERBUCK, E.J. Y SANDERSON, C.J. (1988). "Human eosinophil production in vitro started by means of murine eosinophil differentiation factor (IL-5): production of functionally active eosinophils from normal human bone marrow". Blood 71: 646-651.
- COHEN, A.M.; ZSEBO, K.M.; INOVE, H.; HINES, D.; BOONE, T.C.; CHAZIN, V.R.; TSAI, L.; RITCH, T. Y SOUZA, L.M. (1987). "In vivo stimulation of granulopoiesis by recombinant granulocyte-colony stimulating factor". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84: 2484-2488.

- COULOMBEL, L.; EVANS, A.C. Y EVANS, C.J. (1981). "Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive hemopoietic progenitors in the adherent layer". Blood 62: 291-297.
- CROIZAT, H; FRINDEL, E. Y TUBIANA, M. (1970). "Proliferative activity of the stem cells in the bone marrow of mice after single and multiple irradiation (total or partial body exposure)". International Journal for Radiation Biology 18: 347-358.
- DAVIS, S.S.; DOUGLAS, S.J.; ILLUM, L.; JONES, P.D.E.; MAK, E. Y MULLER, R.H. (1986). "Targeting of colloidal carriers and the role of surface properties". En: Targeting with drugs with synthetic systems. Gregory Gregoriadis, Judit Senior and George Pospe (Ed). Nato ASI Series. Serie A "Life Sciences. VOL.113. pp: 123-146.
- DEIMANN, W Y FAHIMI, H. (1980). "Induction of focal hemopoiesis in adult rat liver by glucan, a macrophage activator". Laboratory Investigations 42: 217-224.
- DEL RIZZO, D.F.; ESKINAZI, D. Y AXELRAD, A.A. (1990). "Interleukin 3 opposes the action of negative regulatory protein (NRP) and of transforming growth factor-beta (TGF-b) in their inhibition of DNA synthesis of the erythroid stem cell BFU-E". Experimental Hematology 18: 138-142.
- DEXTER, T.M. Y LAJTHA, L.G. (1974). "Proliferation of haemopoietic stem cells in vitro". British Journal of Haematology 28: 525-530.
- DEXTER, T.M.; ALLEN, T.D. Y LAJTHA, L.G. (1977). "Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro". Journal of Cellular Physiology 91: 335-344.
- DEXTER, T.M. Y MOORE, M.A.S. (1977). "In vitro duplication of and "cure" of haemopoietic defects in genetically anaemic mice". Nature 269: 412-414.
- DEXTER, T.M. Y SHADDUCK, R.K. (1980). "The regulation of haemopoiesis in long-term bone marrow cultures". Journal of Cellular Physiology 102: 279-286.
- DEXTER, T.M.; GARLAND, J.M.; SCOTT, D.; SCOLNICK, E. Y METCALF, D. (1980). "Growth of factor-dependent hemopoietic precursor cell lines". Journal of Experimental Medicine 152: 1036-1047.
- DEXTER, T.M.; TESTA, N.G.; ALLEN, T.D.; RUTHERFORD, T.Y. SCOLNICK, E. (1981). "Molecular and cell biological aspects of erythropoiesis in long-term bone marrow cultures". Blood 56: 699-707.
- DEXTER, T.M. (1982). "Stromal cell associated haemopoiesis". Journal of Cellular Physiology Suppl. 1: 87-94.
- DEXTER, T.M.; SPOONCER, E.; SIMMONS, P. Y ALLEN, T.D. (1984). "Long term bone marrow culture: an overview of techniques and experiences". En: Long Term Bone Marrow Culture. Daniel G. Wright and Joel S. Greenberger (Ed). pp: 57-96.

- DEXTER, T.M. Y WHITE, H. (1990). "Growth factors: growth without infation" Nature **344**: 380-381.
- DI LUZIO, N.R. (1983). "Immunopharmacology of glucan: a broad spectrum enhancer of host defense mechanism". Trends in Pharmacological Sciences **4**: 344-347.
- DI LUZIO, N.R. (1985). "Update on the immunomodulating activities of glucans". Springer Seminars in Immunopathology **8**: 387-400.
- DOUKAS, M.A.; NISKANEN, E. Y QUESENBARRY, P.J. (1986). "Effects of lithium on stem cell proliferation in vitro". Experimental Hematology **14**: 215-221.
- EAVES, C.J. Y EAVES, A.C. (1978). "Erythropoietin (Ep) dose-response curves for three classes of erythroid progenitors in normal human bone marrow and in patients with polycythemia vera". Blood **52**: 1196-1210.
- EAVES, A.C. Y EAVES, C.J. (1984). "Erythropoiesis in culture". Clinical Haematology **13**: 371-391.
- ELIASON, J.F.; THORENS, B.; KINDLER, V. Y VASSALLI, P. (1988). "The roles of granulocyte-macrophage colony- stimulating factor and interleukin 3 in stromal cell mediated hemopoiesis in vitro". Experimental Hematology **16**: 307-312.
- FAUSER, A.A. Y MESSNER, H.A. (1978). "Granulo-erythropoietic colonies in human bone marrow peripheral blood and cord blood". Blood **52**: 1243-1248.
- FAUSSER, A.A. Y MESSNER, H.A. (1979). "Identification of megakaryocytes, macrophages and eosinophils in colonies of human bone marrow containing neutrophil, granulocytes and erythroblast". Blood **53**: 1023-1027.
- FRASSONI, F.; TESTA, N.G. Y LORD, B.I. (1982). "The relative spatial distribution of erythroid progenitor cells (BFU-e and CFU-e) in the normal mouse femur". Cell Tissue Kinetics **15**: 447-455.
- FRINDEL, E. Y GUIGON, M. (1977). "Inhibition of CFU-entry into cycle by a bone marrow extract". Experimental Hematology **5**: 74-76.
- GALE, P.R. Y BUTTURINI, A. (1990). "The role of hematopoietic growth factors in nuclear and radiation accidentes". Experimental Hematology **18**: 958-964.
- GALLICCHIO, V.S.; CHEN, M.G. Y WATTS, T.D. (1984). "Ability of lithium to accelerate the recovery of granulopoiesis after subacute radiation injury". Acta Radiologica Oncology **23**: 361-366.
- GANSER, A.; LINDEMANN, A.; SEIPELT, G.; OTTMANN, O.G.; HERRMANN, F.; EDER, M.; FRISCH, J.; SCHULTZ, G.; MERTELSMANN, R. Y HOELZER, D. (1990). "Effects of recombinant human interleukin-3 in patients with normal hematopoiesis and in patients with bone marrow failure". Blood **76**: 666-676.

- GARLAND, J.M.; ALDRIDGE, A.; WAGSTAFFE, J. Y DEXTER, T.M. (1983). "Studies on the in vivo elaboration of lymphokine activity, interleukin-3 (IL-3), elaborated by lymphocytes and myeloid leukaemia line in vitro and the fate of IL-3 dependent lines. British Journal of Cancer 48: 247-259.
- GILLISSEN, G. Y BREUER-WERLE, M. (1984). "Influencia de un inmunomodulador sobre la fagocitosis en el test de clearance". Revista Clínica Española 1: 17-19.
- GLASPY, J.A. Y GOLDE, D.W. (1990). "Clinical trials of myeloid growth factors". Experimental Hematology 18: 1137-1141.
- GOLDE, D.W. (1990). "Hematopoietic growth factors. An overview". International Journal of Cell Cloning 8 Suppl 1: 4-10.
- GORDON, M.Y.; RILEY, G.P.; WATT, S.M. Y GREAVES, M.F. (1987). "Compartmentalization of a haemopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment". Nature 326: 403-405.
- GRAHAM, G.J.; WRIGHT, E.G.; HEWICK, R.; WOLPE, S.D.; WILKIE, N.M.; DONALSON, D.; LORIMORE, S. Y PRAGNEL, I.B. (1990). "Identification and characterization of an inhibitor of hemopoietic stem cell proliferation". Nature 344: 442-444.
- GRANDE, T. (1988). "Estimulación proliferativa de células madre hematopoyéticas de ratón por actividades circulantes producidas durante la recuperación de un daño hematopoyético radioinducido". Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.
- GRANDE, T.; GONZALEZ, J.; TEJERO, C.; MAGANTO, G Y BUEREN J.A. (1990). "Production of humoral factors that stimulate spleen colony-forming units in mice irradiated with moderate doses of X rays". Radiation Research 122: 53-57.
- GREGORY, C.J. (1976). "Erythropoietic sensitivity as a differentiation marker in the hemopoietic system: studies of three erythropoietic colony responses in culture". Journal of Cellular Physiology 89: 289-302.
- GRIFFIN, J.D. (1988). "Clinical applications of colony stimulating factors". Oncology 2: 15-21.
- GUALTIERI, R.J.; SHADDUCK, R.K. Y QUESENBERRY, P.J. (1982). "Characteristics of hematopoietic regulatory factors produced by long-term bone marrow cultures". Blood 60 Suppl 1: 98.
- GUALTIERI, R.J.; SHADDUCK, R.K.; BAKER, D.G. Y QUESENBERRY, P.J. (1984). "Hematopoietic regulatory factors produced in long-term murine bone marrow cultures and the effect of in vitro irradiation". Blood 64: 516-525.

- GUALTIERI, R.J.; LIANG, C.M.; SHADDUCK, R.K. Y BANKS, J. (1986). "Bone marrow stromal cells from long term marrow cultures elaborate CSF-1 and GM-CSF". Blood 68(5): 165a (abstract).
- GUIGON, M. Y NAJMAN, A. (1988). "The inhibitors of hematopoiesis". International Journal of Cell Cloning 6: 69-75.
- GUZMAN, E. Y LAJTHA, L.G. (1979). "Some comparisons of the kinetic properties of femoral and splenic haemopoietic stem cells". Cell Tissue Kinetics 3: 91-98.
- HALL, E.J. (1973). "Acute effects of whole-body irradiation". En: Radiobiology for the Radiologist. Harper and Row Publishers. pp: 199-210.
- HEARD, J.M.; FICHELSON, S. Y VARAT, B. (1982). "Role of colony stimulating activity in murine long term bone marrow cultures: evidence for its production and consumption by the adherent cells". Blood 59: 761-767.
- HELLMAN, S.; BOTNICK, L.E.; HANNON, E.C. Y VIGNEULLE, R.M. (1978). "Proliferative capacity of murine hematopoietic stem cells". Proceeding of the National Academy of Sciences USA 75: 490-494.
- HENDRY, J.H. (1972). "The response of haemopoietic colony-forming units and lymphoma cells irradiated in soft tissue (spleen) or a bone cavity (femur) with single doses of X-rays, gamma rays or D-T neutrons". British Journal of Radiology 45: 923-932.
- HENDRY, J.H.; LORD, B.I. (1983). "The analysis of the early and late response to cytotoxic insults in the haemopoietic cell hierarchy" In Cytotoxic Insult to tissue, effects on cell lineages. C.S. Potten and J.H. Hendry (Ed). Churchill Livingstone. pp:1-66.
- HENDRY, J.H. (1985). "The cellular basis of long-term marrow injury after irradiation". Radiotherapy and Oncology 3: 331-338.
- HEYWORTH, C.M.; POINTING, I.L.O. Y DEXTER, T.M. (1988). "The response of haemopoietic cells to growth factors: developmental implications of synergistic interactions". Journal of Cell Sciences 91: 239-247.
- HEYWORTH, C.M.; DEXTER, T.M.; KAN, O. Y WHETTON, A.D.(1990a). "The role of haemopoietic growth factors in self-renewal and differentiation of IL-3 dependent multipotential stem cells". Growth factors 22: 197-211.
- HEYWORTH, C.M.; VALLANCE, S.J.; WHETTON, A.D. Y DEXTER, T.M. (1990b). "The biochemistry and biology of the haemopoietic cell growth factors". Journal of Cell Sciences Suppl 13: 57-74.
- HODGSON, J.S. Y BRADLEY, T.R. (1984). "In vivo kinetic status of hematopoietic stem and progenitor cells as inferred from labelling with bromodeoxyuridine" Experimental Hematology 12: 683-687.

- HUEBNER, K.; CROCE, C.M.; GOLDE, D.W.; KAUFMAN, S.E. Y GASSON, J.C. (1985). "The human gene encoding GM-CSF is at 5q 29- q32, the chromosome region deleted in the 5q anomaly". Sciences 230: 1282-1285.
- HUNT, P.; ROBERTSON, D.; WEISS, D.; RENNICK, D.; LEE, F. Y WITTE, O.N. (1987). "A single bone marrow-derived stromal cell type supports the in vitro growth of early lymphoid and myeloid cells". Cell 48: 997-1007
- IMAI, Y. Y NAKAO, I. (1987). "In vivo radiosensitivity and recovery pattern of the hematopoietic precursor cells and stem cells in mouse bone marrow". Experimental Hematology 15: 890-895.
- ISHIBASHI, T.; KIMURA, H.; SHIKAWA, Y.; UCHIDA, T.; KARIYONE, S. Y MARUYAMA, K. (1990). "Effect of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on murine thrombocytopoiesis in vitro and in vivo". Blood 75: 1433-1438.
- ITOH, K.; TEZUKA, H.; SAKODA, H.; KONNO, M.; NAGATA, K.; UCHIYAMA, T.; UCHINO, H. Y MORI, K.J. (1989). "Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow". Experimental Hematology 17: 145-153.
- JACKSON, C.N. (1973). "Cholinesterase as a possible marker for early cells of the megakaryocytic series". Blood 42: 413-421.
- JOHNSON, A. Y DORSHKIND, K. (1986). "Stromal cells in myeloid and lymphoid long term bone marrow cultures can support multiple hemopoietic lineages and modulate their production of hemopoietic growth factors". Blood 68: 1348-1354.
- JOHNSON, C.S.; KECKLER, D.J.; TOPPER, M.I.; BRAUNSCHWEIGER, P.G. Y FUMANSKI, P. (1989). "In vivo hematopoietic effects of recombinant interleukin-1a in mice: stimulation of granulocytic, monocytic, megakaryocytic, and early erythroid progenitors, suppression of late-stage erythroid, and reserval of erythroid suppression with erythropoietin". Blood 73: 678-683.
- JONES-VILLENEUVE, E.V. Y PHILIPS, R.A. (1980). "Potentials for differentiation by cells from long-term cultures of bone marrow". Experimental Hematology 8: 65-76.
- KELLER, J.R.; MANTEL, C.; SING, G.K.; ELLINGWORTH, L.R.; RUSCETTI, S.K. Y RUSCETTI, W. (1988). "Transforming growth factor selectively regulates early murine hematopoietic progenitors and inhibits the growth of IL-3 dependent myeloid leukaemia". Journal of Experimental Medicine 168: 737-750.
- KINDLER, V.; THORENS, B.; KOSSODO, S.; ALLET, B.; ELIASON, J.F.; THATCHER, D.; FARBER, N. Y VASSALLI, P. (1986). "Stimulation of hematopoiesis in vivo by recombinant bacterial murine interleukin 3". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 83: 1001-1005.

- KINNAMON, K.; KETTERLING, L.; STAMPHELL, H. Y GREANAN, M. (1980). "Mouse endogenous spleen counts as a means of screening for anti radiation drugs (40880)". Proceedings of the Society for Experimental Biology Medicine 164: 370-373.
- KODAMA, H.; SUDO, H.; KOYAMA, H.; KASAI, S. Y YAMAMOTO, S. (1984). "In vitro hemopoiesis within a microenvironment created by MC3T3-G2/PA6 preadipocyte". Journal of Cellular Physiology 118: 233-240.
- KOMIYAMA, A.; ISHIGURO, A.; KUBO, T.; MATSUOKA, T.; YASUKOHCHI, S.; YASUI, K.; YANAGISAWA, M.; YAMADA, S.; YAMAZAKI, M. Y AKABANE, T. (1988). "Increases in neutrophil counts by purified human urinary colony-stimulating factor in chronic neutropenia of childhood". Blood 71: 41-45.
- LAERUM, O.D. Y PAUKOVITS, W.R. (1984). "Inhibitory effects of a synthetic pentapeptide on hemopoietic stem cells in vitro and in vivo". Experimental Hematology 12: 7-17.
- LAHIRI, S.K. (1976). "Kinetics of haemopoietic recovery in endotoxin treated mice". Cell Tissue Kinetics 9: 31-39.
- LAJTHA, L.G.; POZZI, L.V.; SCHOFIELD, R. Y FOX, M. (1969). "Kinetic properties of haemopoietic stem cells". Journal of Cellular Physiology 112: 411-418.
- LAJTHA, L.G.; GILBERT, C.W. Y GUZMAN, E. (1971). "Kinetics of haemopoietic colony growth". British Journal of Haematology 20: 343-353.
- LEARY, A.G.; YANG, Y.C.; CLARK, S.C.; GASSON, J.C.; GOLDE, D.W. Y OGAWA, M. (1987). "Recombinant gibbon interleukin-3 supports formation of human multilineage colonies and blast cell clones in culture: comparison with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor". Blood 70: 1343-1348.
- LENFANT, M.; WDZIECZAK-BAKALA, J.; GUITTET, E.; PRONE, J.C.; SOTTY, D. Y FRINDEL E. (1989). "Inhibitor of haemopoietic pluripotent stem cell proliferation: purification and determination of its structure". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 86: 779-785.
- LEVITT, L.J. Y QUESENBERRY, P.J. (1980). "The effect of Lithium on murine hematopoiesis in a liquid culture system". New England Journal of Medicine 302: 713-719.
- LICHTMAN, M.A. (1981). "Ultrastructure of the hemopoietic environment of the marrow. A review". Experimental Hematology 9: 391-410.
- LIPSCHITZ, D.A.; UDUPA, K.B.; TAYLOR, J.M.; SHADDUCK, R.K. Y WAHEED, A. (1987). "Role of colony-stimulating factor in myelopoiesis in murine long-term bone marrow cultures". Blood 69: 1211-1217.

- LONG, M.W.; GRAGOWSKI, L.L.; HEFFNER, C.H. Y BOXER, L.A. (1985). "Phorbol diesters stimulate the development of an early murine progenitor cell: the burst forming unit megakaryocyte". Journal of Clinical Investigations 76: 431-436.
- LORD, B.I. Y HENDRY, J.H. (1972). "The distribution of haemopoietic colony-forming units in the mouse femur and its modification by x-rays". British Journal of Radiology 45: 110-115.
- LORD, B.I.; TESTA, N.G. Y HENDRY, J.H. (1975). "The relative spatial distribution of CFU-S and CFU-C in the normal mouse femur". Blood 46: 65-72.
- LORD, B.I. Y WRIGHT, E.G. (1982). "Interaction of inhibitor and stimulator in the regulation of CFU-S proliferation". Leukemia Research 6: 541-551
- LORD, B.I. Y WRIGHT, E.G. (1984). "Spatial organisation of CFU-S proliferation regulators in the mouse femur". Leukemia Research 8: 1073-1083.
- LORD, B.I. Y SCHOFIELD, R. (1985). "Haemopoietic spleen colony-forming units" En: Manual of Mammalian Cell Techniques, CC.S. Potten y J.H. Hendry (Ed) Churchill Livingstone. pp: 13-26.
- LORD, B.I.; MOLINEUX, G.; TESTA, N.G.; KELLY, M.; SPOONCER, E. Y DEXTER, T.M. (1986). "The kinetic response of haemopoietic precursor cells in vivo, to highly purified, recombinant interleukin-3". Lymphokine Research 5(2): 97-104.
- LORD, B.I. Y TESTA, N.G. (1988). "The hemopoietic system: structure and regulation" En: Hematopoiesis: Long effects of chemotherapy and radiation. Testa, N.G.; Gale, R.P. (Ed). M. Dekker, New York. pg: 1-26.
- LORD, B.I. (1990). "The architecture of bone marrow cell populations". International Journal of Cell Cloning 8: 317-331.
- MAGANTO, G. (1985). "Efectos letales de la hipertermia y de las radiaciones ionizantes sobre las células cepa hematopoyéticas de ratón". Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.
- MAGLI, M.C.; ISCOVE, N.N. Y ODARTCHENKO, N. (1982). "Transient nature of early haemopoietic spleen colonies". Nature 295: 527-529.
- MASAOKA, T.; TAKAKU, F.; KATO, S.; MORIYAMA, Y.; KODERA, Y.; KANAMARU, A.; SHIMOSAKA, A.; SHIBATA, H. Y NAKAMURA, H. (1989). "Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in allogenic bone marrow transplantation". Experimental Hematology 17: 1047-1050.
- MAYER, P.; LAM, C.; OBENAU, H.; LIEHL, E. Y BESEMER, J. (1987). "Recombinant human GM-CSF induces leukocytosis and activates peripheral blood polymorphonuclear neutrophils in nonhuman primates". Blood 70: 206-213.

- MC CULLOCH, E.A.; SIMINOVITCH, L.E. Y TILL, J.E. (1964). "Spleen colony formation in anaemic mice of genotype W/W<sup>v</sup>". Science 144: 844-846.
- MC CULLOCH, E.A.; SIMINOVITCH, L.E.; RUSSELL, E.S. Y BERNSTEIN, S.E. (1965). "The cellular basis of the genetically determined hemopoietic defect in anaemic mice of genotype Sl/Sl<sup>d</sup>". Blood 26: 399-410.
- MC CUSKEY, R.S.; MEINEKE, H.A. Y TOWNSEND, S.F. (1972). "Studies of the haemopoietic microenvironment I. Changes in the microvascular system and stroma during erythropoietic regeneration and suppression in the spleen of CF1 mice". Blood 39: 697-712.
- MC GRATH, H.E.; LIANG, C.M.; ALBERICO, T.A. Y QUESENBERRY, P.J. (1987). "The effect of lithium on growth factor production in long-term bone marrow cultures". Blood 70: 1136-1142.
- MC LEOD, D.L.; SHEEVE, M.M. Y AXELRAD, A.A. (1976). "Induction of megakaryocyte colonies with platelet formation in vitro". Nature 261: 492-494
- MC LEOD, D.L.; SHREEVE, M.M. Y AXELRAD, A.A. (1980). "Chromosome marker evidence for bipotentiality of BFU-e". Blood 56: 318-322.
- METCALF, D. (1972). "Effect of thymidine suicing in colony formation in vitro by mouse hematopoietic cells". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 139: 511-514.
- METCALF, D. Y MAC DONALD, H.R. (1975). "Heterogeneity of in vitro colony and cluster-forming cells in the mouse marrow. Segregation by velocity sedimentation". Journal of Cellular Physiology 85: 643-653.
- METCALF, D.; MAC DONALD, H.R.; ORDARTCHENKO, N.Y. Y SORDAT, B. (1975). "Growth of mouse megakaryocyte colonies in vitro". Proceeding of the National Academy of Sciences USA 72: 1744-1748.
- METCALF, D. Y JOHNSON, G.R. (1978). "Prodduction by spleen and lymph node cells of conditioned medium with erythroid and other hemopoietic colony-stimulating activity". Journal of Cellular Physiology 96: 31-42.
- METCALF, D.; JOHNSON, G.R. Y MANDEL, T.E. (1979). "Colony formation in agar by multipotential hemopoietic cells". Journal of Cellular Physiology 98: 401-420.
- METCALF, D; JOHNSON, G.R. Y BURGESS, A.W. (1980). "Direct stimulation by purified GM-CSF of the proliferation of multipotential and erythroid precursor cells". Blood 55: 138-147.
- METCALF, D. (1980). "Clonal analysis of the proliferation and differentiation of paired daughter cells: Action of the granulocyte-macrophage precursors". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 77: 5327-5330.

- METCALF, D. Y MERCHAV, S. (1982). "Effects of GM-CSF deprivation on precursors of granulocyte and macrophages". Journal of Cellular Physiology 112: 411-418.
- METCALF, D. Y NICOLA, N.A. (1983). "Proliferative effects of purified granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on normal mouse hemopoietic cells". Journal of Cellular Physiology 116: 198-206.
- METCALF, D. (1984). "The bioassay of colony stimulating factors". En: The Hemopoietic Colony Stimulating Factors. D. Metcalf. Elsevier. pp.187-189.
- METCALF, D. (1985). "The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor". Science 229: 16-22
- METCALF, D. (1986). "The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors". Blood 67: 257-267.
- METCALF, D; BEGLEY, C.G.; JOHNSON, G.R.; NICOLA, N.A.; LOPEZ, A.F. Y WILLIAMSON, D.J. (1986). "Effects of purified bacterially synthesized murine multi-CSF (IL-3) on hematopoiesis in normal adult mice". Blood 68: 46-57.
- METCALF, D.; BEGLEY, C.G.; WILLIAMSON, D.J.; NICE, E.C.; DE LAMARTER, J.; MERMOD, J.J.; THATCHER, D. Y SCHMIDT, A. (1987). "Hemopoietic responses in mice injected with purified recombinant murine GM-CSF". Experimental Hematology 15: 1-9.
- MINGUELL, J.J. Y TAVASSOLI, M. (1989). "Proteoglycan synthesis by hemopoietic progenitor cells". Blood 73: 1821-1827.
- MIYANOMAE, T. Y FRINDEL, E. (1988). "Radioprotection of hemopoiesis conferred by *Acanthopanax denticosus* Harms (Shigoka) administered before or after irradiation". Experimental Hematology 16: 801-806.
- MOCHIZUKI, D.Y.; EISENMAN, J.R.; CONLON, P.J.; LARSEN, A.D. Y TUSHINSKI, R.J. (1987). "Interleukin-1 regulates hematopoiesis activity, a role previously ascribed to hemopoietin-1". Proceedings of the National Academy of Sciences 84: 5267-5271.
- MOLINEUX, G.; TESTA, N.G.; HENDRY, J.H. Y SCHOFIELD, R. (1987). "The radiation sensitivity of the haemopoietic microenvironment-effect on dose rate on ectopic assicle formation". Radiotherapy and Oncology 10: 157-161.
- MOLINEUX, G.; POJDA, Z. Y DEXTER, T.M. (1990). "A comparison of hematopoiesis in normal and splenectomized mice treated with granulocyte colony-stimulating factor". Blood 75: 563-569.
- MOORE, M.A.S.; WILLIAMS, N Y METCALF, D. (1972). "Purification and characterization of the in vitro colony-forming cell in monkey haemopoietic tissue". Journal of Cellular Physiology 79: 283-292.

- MOORE, M.A.S. Y WARREN, D.J. (1987). "Interleukin-1 and G-CSF synergism: in vivo stimulation of stem cell recovery and hematopoietic regeneration following 5-fluorouracil treatment of mice". Proceeding of the National Academy of Sciences USA 84: 7134-7138.
- MORI, T.; WATANABE, M.; HORIKAWA, M.; NIKAIDO, P.; KIMURA, H.; AOYAMA, T. Y SUGUHARA, T. (1983). "WR-2721, its derivatives and their radioprotective effects on mammalian cells in culture". International Journal of Radiation Biology 44: 41-53.
- MOTOYOSHI, K.; TAKAKV, F.; MAEKAWA, T.; MIURA, Y.; KIMURA, K.; FURUSAWA, S.; HATTON, M.; NOMURA, T.; MIZOGUCHA, H.; OGAWA, M.; KINUGASA, K.; TOMINAGA, T.; SHIMOYAMA, M.; DEURA, K.; OHTA, K.; TAGUCHI, T.; MASAUKA, T. Y KIMURA, I. (1986). "Protective effect of partially purified human urinary colony-stimulating factor on granulocytopenia after antitumor chemotherapy". Experimantal Hematology 14: 1069-1075.
- MOYA, P.; BAISEIRAS, E.; BARRASOAIN, I.; ROJO, J.M.; RONDA, E.; ALONSO, M.L. Y PORTOLES, A. (1987). "Imunoferon (AM3) enhances the activities of early-types interferon inducers and natural killer cells". Immunopharmacology and Immunotoxicology 9: 243-256.
- NAKAHATA, T Y OGAWA, H. (1982a). "Identification in culture of a class of hemopoietic colony-forming units with extensive capacity to self renew and generate multipotential hemopoietic colonies". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 79: 3843-3847.
- NAKAHATA, T. Y OGAWA, M. (1982b). "Clonal origin of murine hematopoietic colonies with apparent restriction to granulocyte-macrophage-megakaryocyte (GMM) differentiation". Journal of Cellular Biology 111: 239-246.
- NAKEFF, A. Y DANIELS-MC QUEEN, S. (1976). "In vitro colony assay for a new class of megakaryocyte precursor: colony-forming units megakaryocyte (CFU-M)". Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 151: 587-590.
- NETA, R. Y OPPENHEIM, J.J. (1988). "Cytokines in therapy of radiation injury". Blood 72: 1093-1095.
- NEGRIN, R.S.; HAEUBER, D.H.; NAGLER, A.; KOBAYASHI, Y.; SKLAR, J.; DONLON, T.; VINCENT, M. Y GREENBERG, P.L. (1990). "Maintenance treatment of patients with myelodysplastic syndrome using recombinant human granulocyte colony-stimulating factor". Blood 76: 36-43.
- NEMUNAITIS, J.; SINGER, J.W.; BUCKER, C.D.; HILL, R.; STORB, R.; THOMAS, E.D. Y APPELBAUM, F.R. (1988). "Use of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in autologous marrow transplantation for lymphoid malignancies". Blood 72: 834-836.

- NICOLA, N.A.; BURGESS, A.W. Y METCALF, D. (1979). "Similar molecular properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factors produced by different mouse organs in vitro and in vivo". Journal of Biological Chemistry 254: 5290-5299.
- NISHIGUCHI, I.; FURUTA, Y.; HUNTER, N.; MURRAY, D. Y MILAS, L. (1990). "Radioprotection of hematopoietic tissues in mice by indomethacin". Radiation Research 122: 188-192.
- OHNISHI, Y.; YASUMIZU, R.; FAN, H.; LIU, J.; TAKAO-LIU, F.; KOMATSU, Y.; HOSOYA, E.; GOOD, R.A. Y IKEHARA, S. (1990). "Effects of Juzen-taihoto (TJ-48), a traditional oriental medicine, on hematopoietic recovery from radiation injury in mice". Experimental Hematology 18: 18-22.
- OKABE, M.; ASANO, M.; KUGA, T.; KOMATSU, Y.; YAMASAKI, M.; YOKOO, Y.; ITOH, S.; MORIMOTO, M. Y OKA, T. (1990). "In vitro and in vivo hematopoietic effects of mutant human granulocyte colony-stimulating factor". Blood 75: 1788-1793.
- PATCHEN, M.L. Y LOTZOVA, E. (1980). "Modulation of murine hemopoiesis by glucan". Experimental Hematology 8: 409-422.
- PATCHEN, M.L. Y MAC VITTIE, T.J. (1983). "Temporal response of murine pluripotent stem cells and myeloid and erythroid progenitor cells to low-dose glucan treatment". Acta Haematologica 79: 281-288.
- PATCHEN, M.L.; DI LUZIO, N.R.; JACQUES, P. Y MAC VITTIE, T.J. (1984a). "Soluble polyglycans enhance recovery from cobalt-60-induced hemopoietic injury". Journal of Biological Response Modifiers 3: 627-633.
- PATCHEN, M.L.; MAC VITTIE, T.J. Y WATHEN, L.M. (1984b). "Effects of pre- and post-irradiation glucan treatment on pluripotent stem cells, granulocyte, macrophage and erythroid progenitor cells, and hemopoietic stromal cells". Experientia 40: 1240-1244.
- PATCHEN, M.L. Y MAC VITTIE, T.J. (1985). "Stimulated hemopoiesis and enhanced survival following glucan treatment in sublethally and lethally irradiated mice". International Journal of Immunopharmacology 7(6): 923-932.
- PATCHEN, M.L. Y MAC VITTIE, T.J. (1986a). "Hemopoietic effects of intravenous soluble glucan administration". Journal of Immunopharmacology 8: 407-425.
- PATCHEN, M.L. Y MAC VITTIE, T.J. (1986b). "Comparative effects of soluble and particulate glucans on survival in irradiated mice". Journal of Biological Response Modifiers 5: 45-60.
- PATCHEN, M.L.; MAC VITTIE, T.J. Y BROOK, I. (1986). "Glucan induced hemopoietic and immune stimulation: therapeutic effects in sublethally and lethally irradiated mice". Methods and Findings in Experimental Clinical Pharmacology 8: 151-155.

- PATCHEN, M.L.; D'ALESSANDRO, M.M.; BROOK, I.; BLAKELY, W.F. Y MAC VITTIE, T.J. (1987). "Glucan: Mechanisms involved in its radioprotective effect" Journal of Leukocyte Biology 42: 95-105.
- PATCHEN, M.L.; MAC VITTIE, T.J.; SOLBERG, B.D. Y SOUZA, L.M. (1990). "Therapeutic administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor accelerates hemopoietic regeneration and enhances survival in a murine model of radiatio-induced myelosuppression". International Journal of Cell Clonig 8: 107-122.
- PETERS, C.; O'SHEA, K.S.; CAMPBELL, A.D.; WIHA, M.S. Y LONG, M.W. (1990). "Fetal expression of hemonectin: an extracellular matrix hematopoietic cytoadhesion molecule". Blood 75: 357-365.
- PIGOLI, G.; WAHEED, A. Y SHADDUCK, R.K. (1982). "Observation of radioiodinated colony stimulating factor with murine bone marrow cells in vitro". Blood 59: 408-420.
- POJDA, Z.; MOLINEUX, G. Y DEXTER, T.M. (1990). "Hemopoietic effects of short-term in vivo treatment of murine wit various doses of rhG-CSF". Experimental Hematology 18: 27-31.
- POJDA, Z. Y TSUBOI, A. (1990). "In vivo effects of human recombinant interleukin 6 on hemopoietic stem and progenitor cells and circulating blood cells in normal mice". Experimental Hematology 18: 1034-1037.
- POSPISIL, M.; JARY, J.; NETIKOVA, J. Y MAREK, M. (1982). "Glucan-induced enhancement of hemopoietic recovery in gamma-irradiated mice". Experientia 38: 1232-1234.
- PRAGNELL, I.B.; WRIGHT, E.G.; LORIMORE, S.A.; ADAM, J.; ROSENDAAL, M.; DELAMARTER, J.F.; FRESHNEY, M.; ECKMAN, L.; SPROUL, A. Y WILKIE, N. (1988). "The effect of stem cell proliferation regulators demonstrated with an in vitro assay". Blood 72: 196-201.
- PRCHAL, J.F.; ADAMSON, J.W.; STEINMAN, L. Y FIALKOW, P.J. (1976). "Human erythroid colony formation in vitro: evidence for clonal origin". Journal of Cellular Physiology 89: 489-492.
- QUESENBERRY, P.J.; MORLEY, A.; RYAN, M.; HOWARD, D. Y STOHLMAN, F. (1973). "The effect of endotoxin on murine stem cells". Journal of Cellular Physiology 82: 239-244.
- QUESENBERRY, P.J.; SONG, Z.X.; GUALTIERI, R.J.; WADE, P.M.; ALBERICO, T. A.; STEWART, F.M.; DOUKAS, M.A.; LEVITT, L.; MC GRATH, H.E.; REXRODE, L.A. E INNES, D.J. (1984). "Studies of the control of hemopoiesis in Dexter cultures". En: Long-Term Bone Marrow Culture. D.G. Wright and J.S. Greenberger (Ed). Alan R. Liss Inc, New York. pp: 171-193.

- QUESENBERRY, P.J. (1986). "Synergistic hematopoietic growth factors". International Journal of Cell Cloning 4: 3-15.
- REIMANN, J. Y BURGER, H. (1979). "In vitro proliferation of haemopoietic cells in presence of adherent cell layers. II. Differential effect of adherent layers derived from different organs". Experimental Hematology 7: 52-58.
- REYNOLDS, J.A.; KASTELLO, M.D.; HARRINGTON, D.G.; CRABBS, C.L.; PETERS, C.J.; JEMSKI, J.V.; SCOTT, G.H. Y DI LUZIO, N.R. (1980). "Glucan-induced enhancement of host resistance to selected infectious diseases". Infection and Immunity 30: 51-57.
- ROBERT, R.G.; GALLAGHER, J.; SPOONCER, E.; ALLEN, T.; BLOOMFIELD, F. Y DEXTER, T.M. (1988). "Heparan sulfate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis". Nature 332: 376-378.
- ROSS, W.M. Y PEEKE, J. (1986a). "Radioprotection conferred by dextran sulphate given before irradiation in mice". Experimental Hematology 14: 147-155.
- ROSS, W.M. Y PEEKE, J. (1986b). "Haemopoietic radioprotection by dextran sulphate in mice". British Journal of Cancer 53 Suppl. VII: 126-129
- ROTHSTEIN, G.; CLARKSON, D.R.; LARSON, W.; GROSSER, B.I. Y ATHENS, J.W. (1978). "Effects of lithium on neutrophil mass and production". New England Journal of Medicine 298: 178-180.
- SCHOFIELD, R. (1978). "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell: a hypothesis". Blood Cells 4: 7-25.
- SCHOFIELD, R.; TESTA, N.G.; DEXTER, T.M. Y LORD, B.I. (1986). "Comparison of haemopoiesis in young and old mice". Mechanism of Ageing and Development 34: 1-12.
- SCHOFIELD, R. (1986a). "Assessment of cytotoxic injury to bone marrow". British Journal of Cancer 53 Suppl VII: 115-125.
- SCHOFIELD, R. (1986b). "Standardization of procedures for ectopic marrow grafting: I. Influence of sex of recipient". Experimental Hematology 14: 66-71.
- SCHWARTZ, G.N.; MAC VITTIE, T.J.; VIGNEULLE, R.M.; PATCHEN, M.L.; DOUCHES, S.D.; OPPENHEIM, J.J. Y NETA, R. (1987). "Enhanced hematopoietic recovery in irradiated mice pretreated with interleukin-1 (IL-1)". Immunopharmacology and Immunotoxicology 9: 371-389.
- SCHWARTZ, G.N.; NETA, R.; VIGNEULLE, R.M.; PATCHEN, M.L. Y MAC VITTIE, T. J. (1988). "Recovery of hematopoietic colony-forming cells in irradiated mice pretreated with interleukin-1 (IL-1)". Experimental Hematology 16: 752-757.

- SCHWARTZ, G.N. (1989). "Radioprotection of mice with interleukin-1: relationship to the number of splenic colony-forming units". Radiation Research 119: 101-112.
- SHADDUCK, R.K.; WAHEED, A.; GREENBERGER, J.S. Y DEXTER, T.M. (1983). "Production of colony stimulating factor in long-term bone marrow cultures". Journal of Cellular Physiology 114: 88-92.
- SIEFF, C.A.; EMERSON, S.G.; DONAHUE, R.E.; NATHAN, D.G.; WANG, E.A.; WONG, G.G. Y CLARK, S.C. (1985). "Human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: a multilineage hemopoietin". Sciences 230: 1171-1173.
- SILINI, G. (1975). "The radiation sensitivity of the haemopoietic stem cell". En: Atti Simposio Internazionale di Ematologia pp: 59-82.
- SMITH, W.W.; ALDERMAN, I.M. Y GILLESPIE, R.E. (1958). "Hematopoietic recovery induced by bacterial endotoxin in irradiated mice". American Journal of Physiology 192: 549-556.
- SODELBERG, S.F.; BARNETT, J.B.; BAKER, M.L. Y SALARI, H. (1990). "Post-irradiation treatment with Cooper(II)2 (3,5-diisopropylsalicylate)4 enhances radiation recovery and hemopoietic regeneration". Experimental Hematology 18: 801-805.
- SOUZA, L. (1990). "CSF in vivo: effects on hematopoiesis". International Journal of Cell Cloning 8 Supp 1: 227-228
- SPARKS, F.; SILVERSTEIN, M.; HUNT, J.; HASKELL, C.; PILCH, Y. Y MORTON, D. (1973). "Complications of BCG immunotherapy in patients with cancer". New England Journal of Medicine 289: 827-830.
- SPIVAK, J.L.; SMITH, R.R. E IHLE, J.N. (1985). "Interleukin-3 promotes the in vitro proliferation of murine pluripotent stem cells". Journal of Clinical Investigations 76: 1613-1621.
- SPOONER, E.; HEYWORTH, C.M.; DUNN, A. Y DEXTER, T.M. (1986). "Self-renewal and differentiation on the interleukin-3-dependent multipotent stem cells are modulated by stromal cells and serum factors". Differentiation 31: 111-118.
- STABER, F.G. Y JOHNSON, G.R. (1980). "The response of hemopoietic precursor cells in mice to bacterial cell-wall components". Journal of Cell Physiology 105: 143-152.
- STANLEY, E.R.; BARTOCCI, D.P.; ROSENDAAL, M. Y BRADLEY, T.R. (1986). "Regulation of very primitive multipotent hemopoietic cells by hemopoietin-1". Cell 45: 667-674.
- STORK, L.C.; PETERSON, U.M.; RUNDUS, C.H. Y ROBINSON, W.A. (1988). "Interleukin-1 enhances murine granulopoiesis in vivo". Experimental Hematology 16: 163-167.

- STORK, L.C.; BARCZUK, L.; KISSINGER, M. Y ROBINSON, W. (1989). "Interleukin-1 hastens murine granulocyte recovery following treatment with cyclophosphamide". Blood 73: 938-944.
- TAKEDA, M.; YONEZAWA, M. Y KATOH, N. (1981). "Restoration of radiation injury by ginseng. I. Response of X-irradiated mice to ginseng extract". Journal of Radiation Research 22: 323-328.
- TALMAGDE, J.E.; TRIBBLE, H; PENNINGTON, R.; BOWERSOX, O.; SCHNEIDER, M.A.; CASTELLI, P.; BLACK, P.L. Y ABE, F. (1989). "Protective, restorative, and therapeutic properties of recombinant colony-stimulating factors". Blood 73: 2093-2103.
- TANIKAWA, S.; NOSE, M.; AOKI, Y.; TSUNEOKA, K.; SHIKITA, M. Y NARA, N. (1990). "Effects of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on the hematologic recovery and survival of irradiated mice". Blood 76: 445-449.
- TAVASSOLI, M.; AIZAWA, S.; MATSUOKA, T. Y HARDY, C. (1990). "Molecular basis of the recognition of progenitor cells by bone marrow stroma". En: Hematopoiesis. S.C. Clark and D.W. Golde (Ed). Wiley-Liss. pp: 145-155.
- TEJERO, C.; TESTA, N.G. Y LORD, B.I. (1984). "The cellular specificity of haemopoietic stem cell proliferation regulators". British Journal of Cancer 50: 335-341.
- TESTA, N.G.; HENDRY, J.H. Y LAJTHA, L.G. (1974). "The response of mouse haemopoietic colony forming units to repeated whole body X-irradiation". Biomedicine 21: 431-434.
- TESTA, N.G. Y DEXTER, T.M. (1977). "Long-term production of erythroid precursor cells (BFU) in bone marrow cultures". Differentiation 9: 193-195.
- TESTA, N.G.; HENDRY, J.H. Y MOLINEUX, G. (1985). "Long-term bone marrow damage in experimental system and in patients after radiation or chemotherapy". Anticancer Research 5: 101-110.
- TESTA, N.G. Y DEXTER, T.M. (1989). "Haemopoietic growth factors: their role in cell development and their clinical use". Cytotechnology 2: 259-267.
- TILL, J.E. Y MC CULLOCH, E.A. (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells". Radiation Research 14: 213-222.
- TILL, J.E. Y MC CULLOCH, E.A. (1963). "Early repair processes in marrow cells irradiated and proliferating in vivo". Radiation Research 18: 96-105.
- TILL, J.E. Y MC CULLOCH, E.A. (1980). "Hemopoietic stem cell differentiation". Biochemical Biophysical Acta 605: 431-459.
- TSUJI, K. Y HARRISON, S.J. (1978). "Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: dry-heat destruction kinetics". Applicative Microenvironmental Microbiology 36: 710-714.

- TUSHINSKI, R.J.; OLIVER, I.T.; GUILBERT, L.J.; TYNAN, P.W.; WARNER, J.R. Y STANLEY, E.R. (1982). "Survival of mononuclear phagocytes depends on a lineage-specific growth factor that the differentiated cells selectively destroy". Cell 28: 71-81.
- UCKUN, F.M.; SOUZA, L.; WADDICK, K.G.; WICK, M. Y SONG, C.W. (1990). "In vivo radioprotective effects of recombinant granulocyte colony-stimulating factor in lethally irradiated mice". Blood 75: 638-645.
- UDUPA, K.B. Y LIPSCHITZ, D.A. (1988). "An evaluation of the role of microenvironmental factors in the limitation of myelopoiesis in murine long-term bone marrow culture". Experimental Hematology 16: 112-116.
- VACEK, A.; ROTKOVSKA, D. Y BARTONICKOVA, A. (1990). "Radioprotection of hemopoiesis conferred by aqueous extract from Chlorococcal Algae (Ivastimul) administration to mice before irradiation". Experimental Hematology 18: 234-237.
- VADHAN-RAJ, S.; KEATING, M.; LE MAISTRE, A.; HITTELMAN, W.N.; MC CREDIE, K.; TRUJILLO, J.M.; BROXMEYER, H.E.; HENNEY, C. Y GUTTERMAN, J.U. (1987). "Effects of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in patients with myelodysplastic syndromes". New England Journal of Medicine 317: 1545-1552.
- VADHAN-RAJ, S.; JEHA, S.S.; BUESCHER, S.; LE MAISTRE, P.; YEE, G.; LU, L.; LLORETA, J.; HOOTS, W.K.; HITTELMANN, W.N.; GUTTERMANN, J.U. Y BROXMEYER, H.E. (1990). "Stimulation of myelopoiesis in patients with congenital neutropenia: biology and nature of response to recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor". Blood 75: 858-864.
- VUILLET-GAUGLER, M.H.; BRETON-GORIUS, J.; VAINCHENKER, W.; GUICHARD, J.; LEROY, C.; TCHERNIA, G. Y COULOMBEL, L. (1990). "Loss of attachment to fibronectin with terminal human erythroid differentiation". Blood 75: 865-873.
- WAGEMAKER, G.; PETERS, M.F. Y BOL, S.J.L. (1979). "Induction of erythropoietin responsiveness in vitro by a distinct population of bone marrow cells". Cell Tissue Kinetics 12: 521-537.
- WELTE, K.; BONILLA, M.A.; GILLIO, A.; O'REILLY, R.J.; GABRILOVE, J.; POTTER, G.; BOONE, T. Y SOUZA, L. (1987). "In vivo effects of recombinant human G-CSF in therapy induced neutropenias in primates". Experimental Hematology 15: 460 (Abst.)
- WHITLOCK, C.A.; TIDMARSH, G.F.; MULLER, S.C. Y WEISSMAN, I.L. (1987). "Bone marrow stromal cell lines with lymphopoietic activity express high levels of a pre-B neoplasia-associated molecule". Cell 48: 1009-1021.
- WILLIAMS, N. Y JACKSON, H. (1977). "Analysis of populations of macrophage-granulocyte progenitor cells stimulated by activities in mouse lung conditioned medium". Experimental Hematology 5: 523-534.

- WILLIAMS, N.; JACKSON, H. Y RABELLINO, E. (1977). "Proliferation and differentiation of normal granulopoietic cells in continuous bone marrow cultures". Journal of Cellular Biology 93: 435-440.
- WILLIAMS, N.; JACKSON, H.; SHERIDAN, A.P.C.; MURPHY, M.J.; ELSTE, A. Y MOORE, M.A.S. (1978). "Regulation of megakaryocytopoiesis in long-term murine bone marrow culture". Blood 51: 245-255.
- WILLIAMS, N. Y BURGESS, A.W. (1980). "The effect of mouse lung granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other colony-activities on the proliferation and differentiation of murine bone marrow cells in long-term cultures". Journal of Cellular Physiology 102: 287-295.
- WITTE, O.N. (1990). "Steel locus defines new multipotent growth factor". Cell 63: 5-6.
- WODNAR-FILLIPOWICZ, A.; HEUSSER, C.M. Y MORONI, C. (1989). "Production of the haemopoietic growth factors GM-CSF and interleukin-3 by mast cells in response to IgE receptor-mediated activation". Nature 339: 150-152.
- WORTON, R.G.; MC CULLOCH, E.A. Y TILL, J.E. (1969). "Physical separation of hemopoietic stem cells differing in their capacity of self-renewal". Journal of Experimental Medicine 130: 91-101
- WU, A.M.; TILL, J.E.; SIMINOVITCH, L. Y MC CULLOCH, E.A. (1967). "A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells". Journal of Cellular Physiology 69: 177-184.
- WU, A.M.; SIMINOVITCH, L.; TILL, J.E. Y MC CULLOCH, E.A. (1968). "Evidence for a relationship between mouse hemopoietic stem cells and cells forming colonies in culture". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 59: 1209-1215.
- WU, S.G.; TUBOI, A. Y MIYAMOTO, T. (1989). "Radioprotection of C3H mice by recombinant human interleukin-1 $\alpha$ ". International Journal of Radiation Biology 56: 485-492.
- YUHAS, J.M. (1978). "Biological factors affecting the radioprotective efficiency of S-2-(3-aminopropylamino) ethyl phosphorothioic acid (WR-2721). LD50(30) doses. Radiation Research 44: 621-628.
- ZIPORI, D.; DUKSIN, D.; TAMIR, M.; ARGAMAN, A.; TOLEDO, J. Y MALIK, Z. (1985). "Cultured mouse marrow stromal cell lines II. Distinct subtypes differing in morphology, collagen types, myelopoietic factors and leukemic cell growth modulating activities". Journal of Cellular Physiology 122: 81-90.
- ZUCALI, J.R.; DINARELLO, C.A.; OBLON, D.J.; GROSS, M.A.; ANDERSON, L. Y WEINER, R.S. (1986). "Interleukin-1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E2". Journal of Clinical Investigation 77: 1857-1863.

ZUCKERMAN, K.S. Y WICHA, M.S. (1983). "Extracellular matrix production by the adherent cells of long-term murine bone marrow cultures". Blood 61: 540-547.