

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

ESTUDIO DE LA EXPRESION DEL DAÑO RESIDUAL RADIOINDUCIDO EN LA  
FUNCIONALIDAD DE LAS CELULAS DEL SISTEMA HEMATOPOYETICO DE RATON  
(*Mus musculus L.*). MECANISMOS COMPENSATORIOS DEL ESTROMA EN LA  
REGULACION DE LA HEMATOPOYESIS.

ELVIRA CUENLLAS DIAZ

1992

Dedicado muy especialmente a la memoria de mi padre, su recuerdo es un continuo estímulo para mí. Y a mi madre en quién tengo un gran apoyo.

Este trabajo de investigación ha sido realizado en el Departamentode Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria, bajo la dirección de la Dra. Concepción Tejero Ortego y la codirección Dr. Juan Antonio Bueren Roncero

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación subvencionado por la CEE en el programa de Protección Radiológica.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento, a todas aquellas personas que de alguna u otra forma han contribuido a la realización de este trabajo. Y de una manera especial, mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. Manuel Ruiz-Amil, puesto que ha aceptado ser ponente de este trabajo.

Al Dr. Amando Garrido Pertierra, por introducirme en este departamento y así brindarme la posibilidad de formarme en el mundo de la Bioquímica.

A la Dra. Concepción Tejero Ortego, mi maestra y amiga. La directora de Tesis que todos quisiéramos tener y yo tuve la suerte de encontrar. Gracias a su esfuerzo, ejemplo de trabajo y entusiasmo diario, este trabajo ha llegado a buen fin y, sobretodo mi gratitud es máxima por la comprensión y apoyo que me ofreció en los amargos momentos que acompañaron la realización de este trabajo.

Al Dr. Juan Antonio Bueren Roncero, por su ayuda humana y material a lo largo de todos estos años y por la revisión cuidadosa y crítica que ha realizado en este trabajo.

A la Dra. Soledad Gaitán Pacheco, la buena amiga y compañera de trabajo y principalmente agradezco su inestimable aportación por la cual este trabajo llegó al final.

A la Dra. Pilar Sancho, a quién agradezco no sólo su colaboración en este trabajo, sino la amistad que surgió a partir de la misma.

A la Dra. M<sup>a</sup> José Herranz Santos, por la amistad que me ha demostrado a lo largo de estos años y por la alegría y tranquilidad que imprime el estar a su lado.

A Severiano Escribano Lucas, por su aportación y ayuda

en este trabajo que, aunque su incorporación llegó al final del mismo no por ello fué menos importante.

A mis compañeros del Laboratorio del CIEMAT por la buena acogida que me han demostrado en todo momento.

Al Dr. Juan F. Santarén, por el apoyo técnico en la realización de una parte de este trabajo.

Al Dr. Eliseo Vañó por las facilidades prestadas para utilizar la instalación radioactiva de la Facultad de Medicina.

Al personal del Animalario del CIEMAT por el buen mantenimiento del protagonista de esta Tesis, el ratón.

Agradezco a la Tesis, el que me haya permitido conocer a personas como M<sup>a</sup> Carmen Serradilla, Alicia Gibello y Mónica Suarez y "aprovecharme" de la amistad que me han ofrecido.

**INDICE**

| <b>INDICE</b>  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| <b>I.- INTRODUCCION</b> .....  | 1             |
| <b>I.1.- HEMATOPOYESIS EN EL RATON</b> .....   | 1             |
| I.1.1. Aspectos generales .....  | 1             |
| I.1.2. Organización jerárquica del sistema<br>hematopoyético .....   | 2             |
| I.1.3. Bioquímica y biología de los factores de<br>crecimiento mieliode .....  | 13            |
| <b>I.2.- CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS Y FUNCIONALES<br/>DE LAS CELULAS DEL SISTEMA HEMATOPOYETICO</b> .                 | 18            |
| I.2.1. Biología celular y función de las células<br>de médula ósea .....   | 19            |
| I.2.2. Características morfológicas y función<br>de las células de la serie eritroide .....                            | 22            |
| I.2.3. Características morfológicas y función<br>de granulocitos .....   | 26            |
| I.2.4. Características diferenciales de las enzimas<br>glicolíticas en las células del sistema<br>hematopoyético ..... | 35            |
| <b>I.3.- ESTROMA HEMATOPOYETICO</b> .....  | 41            |
| I.3.1. Aspectos generales .....  | 41            |
| I.3.2. Cultivo de larga duración de médula ósea ..   | 45            |
| <b>I.4.- EFECTO DE LAS RADIACIONES IONIZANTES SOBRE<br/>SISTEMAS BIOLÓGICOS</b> .....                                  | 47            |
| I.4.1. Aspectos generales .....  | 47            |
| I.4.2. Radiosensibilidad de las poblaciones<br>celulares hematopoyéticas .....   | 50            |
| <b>I.5.- OBJETO DEL TRABAJO</b> .....  | 53            |
| <b>II.- MATERIAL y METODOS</b> .....   | 55            |
| <b>II.1.- MATERIAL</b> .....   | 55            |
| II.1.1. Animales de experimentación .....  | 55            |
| II.1.2. Productos utilizados .....   | 55            |
| II.1.3. Material de laboratorio .....  | 56            |
| <b>II.2.- METODOS</b> .....  | 58            |
| II.2.1. Irradiación y Dosimetría .....   | 58            |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| II.2.2.   | Preparación y cuantificación de suspensión celular de médula ósea .....  | 59 |
| II.2.3.   | Obtención de poblaciones celulares maduras de sangre periférica: eritrocitos y granulocitos .....  | 60 |
| II.2.4.   | Estimación de la viabilidad celular .....  | 61 |
| II.2.5.   | Cultivo de larga duración de médula ósea .....   | 62 |
| II.2.6.   | Cultivo de precursores gránulo-macrofágicos CFC-GM .....   | 63 |
| II.2.7.   | Obtención de los extractos enzimáticos ....  | 66 |
| II.2.7.1. | Extracto enzimático de médula ósea .....   | 66 |
| II.2.7.2. | Extracto enzimático de eritrocitos .....   | 66 |
| II.2.7.3. | Obtención del extracto enzimático de granulocitos .....  | 66 |
| II.2.8.   | Determinación de la actividad enzimática de las enzimas glicolíticas .....   | 67 |
| II.2.8.1. | Determinación de la actividad hexoquinasa .  | 67 |
| II.2.8.2. | Determinación de la actividad fosfofructoquinasa .....   | 68 |
| II.2.8.3. | Determinación de la actividad piruvatoquinasa .....  | 68 |
| II.2.9.   | Estudio de la unión de transferrina en células de médula ósea .....  | 70 |
| II.2.9.1. | Marcaje de transferrina humana .....   | 70 |
| II.2.9.2. | Incubación de las células con $I^{125}$ -transferrina .....  | 71 |
| II.2.10.  | Determinación de los niveles de 2,3 BPG ...  | 72 |
| II.2.11.  | Determinación de los niveles de $O_2^-$ .....  | 74 |
| II.2.12.  | Determinación de hemoglobina .....   | 75 |
| II.2.13.  | Valoración de proteínas .....  | 75 |
| II.2.14.  | Análisis electroforético de proteínas .....  | 76 |
| II.2.15.  | Valoración de datos .....  | 79 |
| III.-     | <b>RESULTADOS</b> .....  | 80 |
| III.1.-   | <b>ESTUDIO DEL DAÑO RESIDUAL EN POBLACIONES CELULARES HEMATOPOYETICAS</b> .....  | 80 |
| III.2.-   | <b>ESTUDIO PREVIO DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE ENSAYO DE ACTIVIDAD HK, PFK y PK EN CELULAS DE MEDULA OSEA, ERITROCITOS Y GRANULOCITOS</b> ..... | 83 |
| III.3.-   | <b>ESTUDIO DE LA FUNCION Y METABOLISMO DE CELULAS DE MEDULA OSEA</b> .....   | 88 |
| III.3.1.  | Unión de transferrina a células de médula ósea .....   | 88 |
| III.3.2.  | Actividades de HK, PFK y PK en células de médula ósea .....  | 92 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>III.4.- ESTUDIO DE LA FUNCION Y METABOLISMO DE ERITROCITOS</b>   | 97  |
| III.4.1. Determinación de niveles de 2,3 BPG, hemoglobina (Hb) y proteína total   | 97  |
| III.4.2. Actividad de HK, PFK y PK  | 100 |
| <b>III.5.- ESTUDIO DE LA FUNCION Y METABOLISMO DE GRANULOCITOS</b>  | 104 |
| III.5.1. Determinación de la producción de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , concentración de proteína en granulocitos obtenidos de sangre periférica | 104 |
| III.5.2. Niveles de producción de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> en granulocitos de LTBMC  | 106 |
| III.5.3. Actividad de HK, PFK y PK en granulocitos de LTBMC   | 110 |
| III.5.4. Análisis cuantitativo y cualitativo de proteínas de granulocitos de LTBMC<br>Electroforesis bidimensional                                | 115 |
| <b>III.6.- ANALISIS COMPARATIVO DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ESTUDIADAS EN MEDULA OSEA, ERITROCITOS Y GRANULOCITOS</b>                          | 119 |
| <b>III.7.- IMPLICACIONES DEL ESTROMA EN LA HEMATOPOYESIS DEL RATON</b>  | 125 |
| III.7.1. Cuantificación de células en el sobrenadante del LTBMC. Aspectos morfológico del estroma   | 125 |
| III.7.2. Detección de CSFs en el sobrenadante del LTBMC   | 130 |
| <b>IV.- DISCUSION</b>   | 134 |
| <b>IV.1.- ESTUDIO DEL DAÑO RESIDUAL EN POBLACIONES CELULARES HEMATOPOYETICAS</b>  | 134 |
| <b>IV.2.- ESTUDIO DE LA FUNCION Y METABOLISMO DE CELULAS DE MEDULA OSEA</b>   | 137 |
| IV.2.1. Unión de transferrina en células de médula ósea   | 137 |
| IV.2.2. Actividad de HK, PFK y PK en células de médula ósea   | 140 |
| <b>IV.3.- ESTUDIO DE LA FUNCION Y METABOLISMO DE ERITROCITOS</b>  | 143 |

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| IV.4.- | ESTUDIO DE LA FUNCION Y METABOLISMO DE GRANULOCITOS .....     | 146 |
| IV.5.- | IMPLICACIONES DEL ESTROMA EN LA HEMATOPOYESIS DEL RATON ..... | 153 |
| V.-    | CONCLUSIONES .....  | 157 |
| VI.-   | BIBLIOGRAFIA .....  | 160 |

## **ABREVIATURAS**

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <b>APS</b>               | persulfato amónico  |
| <b>Bmax</b>              | capacidad máxima de unión del ligando a su receptor       |
| <b>BFU-E</b>             | unidad formadora de "burst" eritroides                    |
| <b>BPA</b>               | actividad promotora de "burst"                            |
| <b>CFU-E</b>             | unidad formadora de colonias eritroides                   |
| <b>CFU-E<sub>0</sub></b> | célula formadora de colonias de eosiófilos                |
| <b>CFC-GM</b>            | célula formadora de colonias de gránulocitos y macrófagos |
| <b>CFC-G</b>             | célula formadora de colonias de granulocitos              |
| <b>CFC-M</b>             | célula formadora de colonias de macrófagos                |
| <b>CFC-Meg</b>           | célula formadora de colonias de megacariocitos            |
| <b>CSFs</b>              | factores estimulantes de colonias                         |
| <b>CFU-s</b>             | unidad formadora de colonias en bazo                      |
| <b>Epo</b>               | eritropoyetina  |
| <b>ERC</b>               | célula sensible a eritropoyetina                          |
| <b>FDC-P<sub>2</sub></b> | línea celular dependiente del factor Paterson-2           |
| <b>HBSS</b>              | solución salina de Hank's                                 |
| <b>IEF</b>               | isoelectroenfoque   |
| <b>Ka</b>                | constante de afinidad                                     |
| <b>LTBMC</b>             | cultivo de larga duración de médula ósea                  |
| <b>PMA</b>               | forbol-12-miristato-13-acetato                            |
| <b>SCF</b>               | factor estimulante de célula madre                        |
| <b>SDS</b>               | dodecilsulfato sódico                                     |
| <b>Sm</b>                | célula madre mieloide                                     |
| <b>Sl</b>                | célula madre linfoide                                     |
| <b>SOD</b>               | superóxido-dismutasa                                      |
| <b>TEMED</b>             | N,N,N',N' - tetrametiletildiamina                         |
| <b>Tf</b>                | transferrina.   |

## **INTRODUCCION**

## **I.- INTRODUCCION**

### **I.1.- HEMATOPOIESIS EN EL RATON**

#### **I.1.1.- Aspectos generales**

Se conoce como hematopoyesis al proceso de formación de las células sanguíneas. Dado que la mayoría de las células de la sangre tienen una vida media relativamente corta y que el número de dichas células se mantiene constante a lo largo de la vida del animal, la hematopoyesis se desarrolla como un proceso en continua renovación celular sometido a complejos mecanismos de regulación. La producción de células sanguíneas "in vivo" está regulada por la síntesis y liberación de citoquinas específicas producidas en la médula ósea y en otros tejidos (Metcalf,1984) y mediante otros bioreguladores como son, los interferones, el factor de necrosis tumoral, lactoferrina y otros (Lord y Testa,1988).

Las líneas de diferenciación que componen el tejido hematopoyético se pueden clasificar en dos:

Línea mieloide que incluye a las células eritroides, los monocitos, granulocitos, megacariocitos y células cebadas y la línea linfoide que comprende a las células T y a las células B. Para completar la lista de células que

comprende el sistema hematopoyético es necesario incluir a aquellas células que originadas en los órganos hematopoyéticos se asientan en diversos tejidos; este grupo incluye a los distintos macrófagos tisulares, como son las células Kupffer del hígado, los macrófagos alveolares, los osteoclastos de médula y las células Langerhans de la piel; así mismo existe evidencia de que las células endoteliales tienen un origen hematopoyético (Keating y col., 1982) al igual que las células "natural killer" y las células dendríticas del tejido linfoide

#### **I.1.2.- Organización jerárquica del sistema hematopoyético.**

El tejido hematopoyético es un sistema en organización jerárquica formado por distintos compartimentos celulares.

Cada compartimento va repoblando al siguiente completando así los procesos de proliferación y diferenciación celular que dan lugar a las células maduras de la sangre.

Tradicionalmente, las poblaciones celulares hematopoyéticas se han clasificado en tres subclases (Lord, 1983):

-células madre, son células multipotentes con capacidad de automantenimiento.

-células progenitoras (comprometidas), éstas son células dirigidas a diferenciarse en alguna línea celular concreta, poseen una gran capacidad proliferativa.

-células de morfología reconocible. Incluye las células en maduración y las células maduras funcionales.

Los compartimentos de células progenitoras y de células en maduración son poblaciones celulares en tránsito que proceden del compartimento de células madre a través de diversas divisiones celulares. En estos compartimentos se produce una amplificación de la población celular mediante proliferación para satisfacer la demanda de células maduras.

#### **- Células madre hematopoyéticas**

Estas células tienen un papel primordial puesto que todas las células sanguíneas (eritrocitos, plaquetas, linfocitos T y B, granulocitos y macrófagos) derivan de las células madre multipotentes (Lajtha, 1982). Se considera pues, que su potencial de diferenciación es multipotente, con capacidad de producir los distintos tipos celulares maduros de la línea mieloide y linfoide.

Son células dotadas de capacidad de automantenimiento, lo que le permite mantener constante el tamaño de su compartimento. (Siminovitch y col., 1963; Lajtha, 1982). Un pequeño porcentaje de estas células (<10%) se encuentra en fase de síntesis de ADN. El resto de esta población se encuentra en situación de reposo proliferativo, fuera del ciclo celular (G<sub>0</sub>); sin embargo poseen la capacidad de entrar en fase de síntesis en situaciones de estrés.

El ensayo de colonias "in vivo" que sirvió para poder definir a un precursor próximo a la célula madre hematopoyética fue desarrollado por Till y McCulloch en 1961. Estos autores inyectaron células hematopoyéticas de un ratón donador a un ratón receptor isogénico irradiado con una dosis potencialmente letal. Transcurridos 10-14 días de la inyección sacrificaron los animales, y observaron colonias macroscópicas en el bazo de estos animales.

Análisis citogenéticos y bioquímicos confirmaron el carácter clonal de estas colonias e indicaron que a menudo estaban formadas por células de las dos líneas sanguíneas y que contenían aproximadamente  $10^6$  células (Barnes y col., 1959; Becker y col., 1963). A la célula, responsable de la formación de estas colonias, que cumplía las características de pluripotencia y automantenimiento se le denominó unidad formadora de colonias en bazo o CFU-s (Till y McCulloch, 1961).

En el ratón adulto, estas células se localizan principalmente en médula ósea y también en bazo. El número de CFU-s depende de la cepa del ratón pero cabe destacar que este valor es relativamente constante y se sitúa en el orden de  $10^4$  células/fémur (Carsten y Bond, 1969).

Mediante el uso de las técnicas de transferencia génica, se ha confirmado la existencia de una estructura jerárquica dentro del compartimento de células madre

(Lemischka y col.,1986).

Mintz y col (1984), han definido la célula madre pluripotente primitiva, denominada (Sp). A partir de esta célula, se ha postulado la existencia de dos tipos de células madre comprometidas a las dos grandes líneas sanguíneas, la mieloide y la linfoide (Phillips, 1985). Estas dos poblaciones celulares, designadas como Sm y Sl son más diferenciadas que la célula madre pluripotente primitiva (Sp) y tienen la característica de conservar la capacidad de automantenimiento (Dick y col.,1985).

**- Compartimento de precursores hematopoyéticos comprometidos**

Puesto que el número de células maduras sanguíneas es elevado y sólo una minoría de células madre (<10%) se encuentra en fase de síntesis de ADN, el aumento en el número de células entre ambos compartimentos tiene lugar a través de una población intermedia de células que se ha denominado compartimento de precursores comprometidos.

Las células que componen este compartimento se caracterizan por tener gran potencial proliferativo y estar definidas a diferenciarse en una línea celular concreta.(Bradley y Metcalf,1966; Ichikawa y col.,1966 Metcalf,1980).

Las células del compartimento de progenitores

comprometidos se encuentran en fase de síntesis en un porcentaje  $\approx$  30%; este porcentaje puede aumentar ante situaciones de estrés del sistema (Tejero y col., 1988).

El desarrollo de las técnicas de cultivo "in vitro" en matriz semisólida, ha servido para detectar, cuantificar y caracterizar a los precursores comprometidos hematopoyéticos según la capacidad de éstos para generar colonias de células maduras hematopoyéticas. Estas técnicas fueron descritas independientemente por Plunick y Sachs (1965) y Bradley y Metcalf (1966); estos autores desarrollaron el cultivo de progenitores granulomacrofágicos de ratón en una matriz semisólida de Agar en presencia de factores estimulantes de la proliferación celular; así mismo, se han desarrollado los métodos para el cultivo de otros progenitores de la línea mieloide, como son los precursores eritroides (Stephenson y col., 1971); los precursores de megacariocitos (Metcalf y col., 1975) y los precursores de linfocitos (Metcalf y col., 1975a).

La naturaleza clonal de estas colonias ha sido demostrada utilizando métodos bioquímicos (isoenzimas de G6PD), análisis de cariotipos y otras técnicas (Metcalf, 1984). Así mismo, estos ensayos han servido para caracterizar ciertos factores estimulantes de la supervivencia, proliferación y diferenciación en estas células, a los que se ha llamado factores estimulantes de colonias (CSFs).

En este apartado, vamos a hacer una breve descripción de algunos precursores comprometidos referidos a la línea mieloide.

#### **- Precursores eritroides**

La diferenciación y maduración de la línea eritroide supone una secuencia ordenada de acontecimientos que comienzan en la célula madre multipotente, continúan en las células comprometidas a la línea eritroide y finalizan en la producción de eritrocitos maduros.

El uso de los cultivos "in vitro" en matriz semisólida ha permitido identificar a distintos precursores eritroides de ratón (Stephenson y col.,1971); éstos son el precursor eritroide temprano llamado unidad formadora de "burst" eritroide o BFU-E (Iscove y Sieber,1975) y la unidad formadora de colonias eritroides o CFU-E (Iscove y Sieber,1975). La población de precursores BFU-E, en presencia de eritropoyetina (Epo), da lugar a colonias que contienen normoblastos y células hemoglobinizadas no nucleadas después de un determinado periodo de incubación, que en el ratón es de 7 días, (Testa,1979). No obstante, la observación de que el número de BFU-E "in vivo" no dependía de la liberación de Epo (Iscove,1977a,b; 1978) llevó a postular la existencia de un factor con actividad promotora de "burst" o BPA diferente de Epo (Guilbert e Iscove,1976; Iscove 1977 a y b). Este factor ha sido identificado como la IL-3 (Clark y Kamen., 1987).

Por otro lado, el tamaño del compartimento de CFU-E sí está regulado por la presencia de eritropoyetina (Axelrad y col., 1974), este precursor es más maduro que el BFU-E y podría corresponder al precursor no reconocible morfológicamente sensible a Epo denominado ERC (Wickramasinghe, 1986).

#### **- Precursor gránulo-macrofágico**

Se conocen varios tipos de precursores comprometidos a la línea granulocito-macrofágica según su capacidad de generar "in vitro" colonias de granulocitos, de macrófagos o mixtas de granulocitos-macrófagos en presencia de los apropiados factores estimulantes de colonias (Metcalf y McDonald, 1975; Metcalf, 1980).

El precursor comprometido a partir del cual se desarrollan las células morfológicamente reconocibles que darán el granulocito y el monocito es la célula formadora de colonias granulocito-macrofágicas o CFC-GM. Como ya ha sido indicado este precursor tiene la característica de ser bipotencial, pudiendo desarrollar dos precursores celulares distintos CFC-G y CFC-M o células formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos respectivamente (Metcalf, 1980).

Esta heterogeneidad en la población de precursores granulomacrofágicos podría explicar las diferencias en las características morfológicas de las colonias granulo-

macrofágicas obtenidas en cultivo "in vitro".

Se han podido distinguir tres tipos morfológicos de colonias:

- colonias compactas que contienen solamente granulocitos.

- colonias de aspecto disperso, formadas unicamente por macrófagos y

- colonias mixtas, que se caracterizan por ser compactas en el centro formadas por granulocitos y dispersas en la perifería formadas por macrófagos.

El proceso de formación de granulocitos y macrófagos está regulado por la presencia de factores estimulantes de colonias que también están asociados a la formación de estas células "in vivo". Estos factores pertenecen a la familia de glicoproteínas y son producidos por los monocitos, los macrófagos medulares y por otros tipos celulares, como son los fibroblastos, linfocitos estimulados y ciertos elementos celulares del estroma (Stanley y Heard, 1977; Metcalf, 1980; Burgess y col., 1981; Dexter, 1982; Nicola y col., 1983).

Para terminar con la descripción de los precursores hematopoyéticos comprometidos, vamos a referirnos a los precursores definidos a eosinófilos y megacariocitos.

Los precursores comprometidos a diferenciarse y desarrollar eosinófilos y megacariocitos maduros en el

ratón, se han denominado unidades formadoras de eosinófilos o CFC-Eo y de megacariocitos o CFC-Meg respectivamente (Metcalf y col.,1975 y Johson y Metcalf,1980).

La diferenciación y proliferación de ambos precursores, está regulada por citoquinas específicas. Así el precursor, CFC-Eo está regulado por la acción sinérgica de la IL-3 e IL-5 (Rothenberg y col.,1988; Yamaguchi y col,1988).

El precursor CFC-Meg es sensible a la acción de la IL-6 (Suzuki y col.,1989). Así mismo, la IL-3 puede estimular el desarrollo de megacariocitos a partir de su precursor (Brunno y col.,1988).

#### **- Células en fase de especialización y maduración**

Para terminar con la descripción de las poblaciones hematopoyéticas haremos mención a la población de células maduras con características morfológicas y funcionales específicas. La pérdida de la capacidad proliferativa del compartimento de precursores comprometidos está acoplado a un desarrollo progresivo de las características bioquímicas, antigénicas y morfológicas de cada linaje de células maduras; así sucede para algunas líneas hematopoyéticas como la línea eritroide, granulocítica y megacariocítica. No obstante, ciertas células maduras de algunas líneas hematopoyéticas mantienen la capacidad de proliferación al ser estimuladas apropiadamente, este grupo

incluye a los linfocitos T y B, células cebadas y algunos macrófagos tisulares.

En apartados posteriores, haremos una descripción más detallada de las células maduras estudiadas en esta memoria.

### **I.1.3.- Bioquímica y Biología de los factores de crecimiento mieloides.**

El mantenimiento de los niveles adecuados de células en sangre periférica requiere una continua y programada producción celular por lo cual, el sistema hematopoyético está sometido a estrechos mecanismos de regulación (Goldman. J.M, 1982).

La regulación de la hematopoyesis, se ejerce a través de distintos mecanismos de control en los que intervienen, entre otros, las células del estroma mediante la producción y liberación de los distintos factores de crecimiento hematopoyético (Allen y Dexter, 1983; Spooncer y col., 1986).

La supervivencia, diferenciación, proliferación y desarrollo de las células madre y progenitores hematopoyéticos así como la actividad funcional de las células maduras está regulada por la acción de diversos factores de crecimiento (Dexter, 1987; Nicola, 1989; Whetton y Dexter, 1989; Heyworth y col., 1990).

Las distintas técnicas de cultivo "in vitro" han permitido detectar, aislar, caracterizar y en ciertos casos investigar el modo de acción de estos factores de crecimiento (Metcalf y Mercharn, 1982). Así, se ha podido conocer que la supervivencia y proliferación de la línea celular FDC-P<sub>2</sub> por la IL-3 se mantiene a través de la regulación de los niveles intracelulares de ATP mediante

un aumento en el consumo de glucosa, todo ello mediado por este factor (Whetton y Dexter,1983; Whetton y col.,1985).

Los factores hematopoyéticos constituyen una familia de proteínas de naturaleza glicosilada que regula la producción y la actividad funcional de las células maduras.

La respuesta biológica a los factores hematopoyéticos es amplia, algunos de ellos actúan sobre un dilatado espectro celular, otros son más específicos en su rango de acción. Así, la Interleuquina 3 (IL-3) mantiene el crecimiento y desarrollo de las células madre multipotentes (Heyworth y col.,1988) y de los progenitores mieloides GM-CFC (Cook y col.,1989); E<sub>0</sub>-CFC (Rothenberg y col.,1988); BFU-E (Sonoda y col.,1988) y Meg-CFC (Bruno y col.,1988).

La acción de los factores de crecimiento sobre las células hematopoyéticas, en muchas situaciones, se realiza de modo sinérgico o también de forma secuencial. Así sucede en la maduración del progenitor eritroide CFU-E que necesita la presencia de IL-3 y Epo para desarrollar las células eritroides maduras (Iscove y col.,1974) y para el desarrollo del precursor eosinófilo que necesita la presencia de IL-3 e IL-5 para su completa diferenciación (Yamaguchi y col.,1988). Otros factores hematopoyéticos descritos como reguladores del desarrollo de células de la línea linfoide, han sido posteriormente señalados como moduladores de células de la línea mieloide, como es el caso de la IL-4 regulador del crecimiento de células B

(Widmer y Grabstein,1987; Dexter,1987) al que se le ha asignado una acción sinérgica con la IL-3, Epo, G-CSF y M-CSF en el proceso de la diferenciación y proliferación de células de la serie mieloide (Rennick y col.,1987; Peschel y col.,1987).

A continuación, vamos a hacer una breve descripción de las características bioquímicas y de los efectos biológicos de ciertos factores hematopoyéticos referidos a la línea mieloide.

En este sentido, la IL-3 ha sido descrita, hasta hace poco tiempo, como el factor de mayor rango de acción. Estructuralmente se caracteriza por tener naturaleza de glicoproteína, en electroforesis SDS en gel de poliacrilamida migra en una banda de Pm comprendido entre aproximadamente entre 20.000 a 30.000 D (Bazil y col.,1983); posee una homología de secuencia de un 29% entre las formas humana y de ratón (Clark y Kamen,1987). Entre sus funciones se destaca el mantener la viabilidad de las células madre multipotentes, favorecer la entrada en síntesis de ADN de CFU-S (Schrader y Clark-Lewis,1982; Spirak y col.,1985 y Heyworth y col.,1988); y estimular el desarrollo de las células multipotentes a colonias que contienen células maduras de la línea mieloide (Whetton y Dexter,1989). La IL-3 también actúa sobre la funcionalidad de ciertas células maduras, así aumenta la actividad citotóxica de monocitos (Cannistra y col.,1988) y la producción de histamina por las células cebadas (Tsuji y

col.,1990). Por lo indicado hasta ahora, la IL-3 regula la proliferación y desarrollo de los progenitores hematopoyéticos y puede potenciar la función de células maduras.

Otros factores hematopoyéticos que actúan en la línea mieloide son los factores estimulantes de colonias GM-CSF, G-CSF y M-CSF, estos tres factores se describieron por su capacidad de generar "in vitro" colonias granulomacrofágicas, de granulocitos y de macrófagos respectivamente (Burgess y Metcalf,1977 y 1980). Así mismo, modulan la actividad funcional de células maduras, en este sentido aumentan tanto la actividad citotóxica de monocitos como la producción de intermediarios reactivos del oxígeno en los neutrófilos maduros (Arnout y col.,1986; Grabstein y col.,1986; Reed y col,1987; Di Persio y col.,1989).

El factor G-CSF aumenta la vida media de neutrófilos de sangre periférica (Vadas y col.,1983; Begley y col.,1986; Tsuchiya y col.,1986). La estructura del factor G-CSF humano y de ratón corresponde a glicoproteínas cuyos PI y Pm aparentes se alteran por el tratamiento con neuroaminidasa (Metcalf y col.,1987).

El factor GM-CSF puede favorecer la actividad funcional de neutrófilos maduros a lo largo de varias etapas de la fagocitosis. Así aumenta la producción de  $O_2^-$  de neutrófilos y es un factor quimiotáctico para células fagocíticas, aumentando la adhesión del neutrófilo

al endotelio vascular (Gamble y col.,1989). La estructura de este factor en humano, ratón y mono se ha determinado por análisis de secuencia de aminoácidos y de ADN (Gough y col.,1984; Sparrow y col.,1985; Wong y col.,1985). Para cada especie la proteína nativa está precedida por una secuencia hidrofóbica de 25 aminoácidos, el GM-CSF de ratón comprende 124 aa con un Pm de 14.000 D.

El factor M-CSF estimula la formación de macrófagos a partir del precursor CFC-GM (Kawasaki y col.,1985; Metcalf,1986). Mantiene la supervivencia y proliferación de macrófagos y monocitos, promueve la capacidad citotóxica y fagocítica de estas células, al igual que los factores G y GM-CSF favorece la producción de intermediarios reactivos del oxígeno en la fagocitosis (Heyworth y col.,1990).

La estructura del factor M-CSF es la de una proteína fuertemente glicosilada en la que el grupo amino terminal es necesario para la actividad biológica mientras que modificaciones en el resto carboxilo terminal no afectan esta actividad.

Una característica común a todos los factores de crecimiento hematopoyético es que el resto azucarado no es necesario para la unión del factor a su receptor, los azúcares deben tener alguna otra función "in vivo" todavía no conocida.

Las acciones biológicas descritas para estos factores de crecimiento hematopoyético sugieren que dichos factores juegan un importante papel en los mecanismos de defensa del organismo, por lo que está siendo muy extendido el uso clínico de los mismos en ciertas alteraciones inmunológicas y/o hematológicas puesto que facilitan la recuperación del sistema hematopoyético (Bronchud y col.,1987; Moore y Warran,1987; Bronchud y col.,1988).

Recientemente, se ha descrito el denominado factor stem cell (SCF). El SCF actúa asociado a otros factores hematopoyéticos, aumentando la proliferación de los precursores hematopoyéticos mas primitivos (Williams y col.,1991; Okada y col.,1991). Este factor tiene un importante papel en la regulación de los progenitores hematopoyéticos más primitivos y está siendo descrita la acción sinérgica de este factor con otros factores hematopoyéticos. Así la administración del G-CSF en combinación con el SCF aumenta el número de leucocitos en sangre periférica (Molineux, 1991).

## **I.2.- CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS Y FUNCIONALES DE LAS CELULAS DEL SISTEMA HEMATOPOYETICO.**

En este apartado, vamos a hacer una descripción de algunos aspectos metabólicos y funcionales de las células del sistema hematopoyético. Para ello, comenzaremos describiendo las células de médula ósea, población representativa de una gran heterogeneidad celular. Dadas

las características que posee la médula, las células que la componen presentan un gran potencial de diferenciación y proliferación. Con el fin de completar el estudio de las características bioquímicas y funcionales de las células de este sistema, continuaremos con la descripción de algunos aspectos morfológicos, bioquímicos y funcionales de dos tipos de células maduras; los eritrocitos y granulocitos.

### **I.2.1.- Biología celular y función de las células de médula ósea**

La médula ósea es un tejido extremadamente complejo, en el que las células madre hematopoyéticas dan las distintas líneas celulares sanguíneas en el interior de los espacios medulares.

La composición celular de la médula ósea es heterogénea en cuanto al tipo, número y grado de madurez de cada componente celular. Está formada por varios compartimentos celulares, cada uno de los cuales presenta unas características bioquímicas y celulares propias.

Una característica común en todos los compartimentos celulares de la médula es su potencial proliferativo y de diferenciación. Estos procesos se caracterizan por necesitar un aporte de energía, es por esto, por lo que en la médula ósea adquieren relevancia aquellas rutas metabólicas dirigidas a la obtención de energía. Entre

estas rutas, destaca la glicolisis, por ser un sistema que genera ATP y, en este sentido se ha descrito la necesidad de un sistema generador de ATP, como es la glicolisis, en una línea celular hematopoyética (FDC-P2) para cumplir los procesos de proliferación celular (Whetton y Dexter, 1983).

La regulación del sistema hematopoyético está ejercida, entre otros mecanismos, por determinados factores de crecimiento. Una de las múltiples funciones que cumplen los factores hematopoyéticos es la de mantener la viabilidad de las células hematopoyéticas hecho que está asociado a un transporte de glucosa (Whetton y col., 1985).

La glicolisis es una de las rutas de obtención de energía en las células de médula ósea. En apartados posteriores, haremos una descripción de las características cinéticas de las enzimas reguladoras de la glicolisis en células de médula ósea.

Como es conocido, el  $\text{Fe}^{+3}$  es necesario para cumplir una serie de funciones fisiológicas. El  $\text{Fe}^{+3}$  participa en procesos de transporte de  $\text{O}_2$ , como sucede en la hemoglobina y mioglobina. Por otro lado, ejerce distintas funciones en procesos de activación de enzimas que contienen oxígeno (peroxidasas y catalasas) y colabora en los mecanismos de transferencia de  $e^-$  formando parte de una gran variedad de citocromos (citic a, citic b y citic c) (Williams, 1985).

Por otro lado, el  $\text{Fe}^{+3}$  es necesario para cumplimentar

procesos de proliferación y diferenciación celular (Ho y col.,1989). Motivo por el cual, es importante estudiar el metabolismo del hierro como parámetro indicativo de la funcionalidad en células de médula ósea.

Uno de los mecanismos de captación y transporte de  $Fe^{+3}$  al interior de la célula está mediado por la presencia de una proteína transportadora de  $Fe^{+3}$ , la transferrina (Tf). Esta es una glicoproteína plasmática cuya función fundamental es la del transporte de  $Fe^{+3}$  al interior de la célula. La unión de la Tf a su receptor, localizado en la membrana plasmática, es un paso esencial en el mecanismo de incorporación del Fe a la célula.

El receptor de Tf ha sido encontrado en las células que presentan una gran capacidad proliferativa (Sutherland y col.,1981; Trowbridge y Omary,1981). En este sentido, la expresión del receptor de la Tf está relacionado con la proliferación de las células del sistema hematopoyético (Ho y col.,1989). También ha sido descrito en otras células, como hepatocitos y células de placenta (Sibille y col.,1982; Seligman y col.,1979). En células de médula ósea, ha sido descrito en células precursoras eritroides (Harrison,1984). También, ha sido descrito en líneas celulares de otras series mieloides (Tei y col.,1982; Taetle y col.,1987; Ho y col.,1989). En médula ósea de rata, han sido descritos dos sitios de unión para la Tf, uno de alta y otro de baja afinidad (J. Mendieta Tesis Doctoral 1990). Así mismo, el receptor de la Tf está ligado

a muchos mecanismos de defensa del organismo, ya que éstos dependen, en ciertos casos de la presencia de  $Fe^{+3}$  (Gabig y Lekfer,1985); así los macrófagos alveolares presentan receptores de Tf en su membrana plasmática (Hirata y col.,1986).

### **I.2.2.-Algunas características morfológicas y función fisiológica de las células de la serie eritroide**

Como ha sido indicado en el apartado I.1.2 de esta memoria, los eritrocitos se generan a partir de los precursores eritroides BFU-E y CFU-E mediante los procesos de diferenciación celular.

El eritrocito de los mamíferos es una de las células más especializadas del sistema hematopoyético. Morfológicamente se caracteriza por carecer de núcleo, mitocondrias y ribosomas; su composición es por lo tanto muy simple, está formado por una membrana citoplasmática que rodea una solución de proteína y electrolitos. La proteína mayoritaria que compone el eritrocito es la hemoglobina, que está representando el 95% de la proteína total, el resto lo forman las enzimas necesarias para la producción de energía y para el mantenimiento de la hemoglobina en el estado fisiológico funcional.

Los eritrocitos de mamíferos son células anucleadas que circulan por la sangre durante un tiempo determinado que varía según las especies. Así, en el hombre la vida

media del eritrocito es de 120 días mientras que en el ratón es de 20-30 días (Magnani y col., 1980).

El estudio del eritrocito ha despertado gran interés en virtud de la función fisiológica que desempeña y porque dada su sencillez estructural y metabólica resulta una célula ideal para realizar estudios bioquímicos.

Por carecer el eritrocito de orgánulos citoplasmáticos como ribosomas y mitocondrias, su metabolismo queda limitado a la glicolisis, el ciclo de las pentosas fosfato, ciclo del 2,3 bifosfoglicerato (2,3 BPG), algunas reacciones de oxido-reducción y ciertos aspectos del metabolismo de nucleótidos.

Los eritrocitos, al igual que toda célula animal, requiere energía para cumplimentar su actividad metabólica y funcional, de tal manera que su metabolismo está encaminado hacia la formación de la molécula que actúa como transportador especial de energía libre ó ATP (Reiman y col.,1981).

Distintos sustratos tales como la ribosa, fructosa, manosa, galactosa, etc... pueden ser metabolizados para obtener energía, siendo la glucosa la principal fuente energética de los eritrocitos de todas las especies animales, excepto el cerdo en el que el sustrato principal es la inosina (Agar y Board,1983; Kim,1983). Así cada molécula de glucosa que entra en la célula es fosforilada

por acción de la hexoquinasa y transformada a glucosa-6-fosfato. Este compuesto formado es metabolizado por la vía de Emberrf-Meyerhoff o por la ruta de las pentosas fosfato en distinta cuantía. En situaciones fisiológicas, entre un 5% y un 13% de la glucosa se metaboliza por la ruta de las pentosas fosfato (Harvey, 1989), la cantidad de glucosa metabolizada por esta vía parece estar regulada por la concentración de NADP utilizada para formar NADPH. El resto se metaboliza en la ruta glicolítica.

La segunda vía importante del metabolismo de la glucosa en el eritrocito es la ruta aeróbica de las pentosas fosfato.

La función fisiológica fundamental del eritrocito es la del transporte de los gases respiratorios a través de la sangre a los distintos tejidos. Esta función se realiza mediante la Hb, proteína cuya estructura está diseñada para realizar dicha función.

Las primeras teorías respecto a la función del 2,3 BPG indican su papel como "buffer" y como compuesto que podría ser utilizado como sustrato energético durante periodos de privación de la glucosa. Fué en 1967, cuando Benesch y Benesch indicaron la función del 2,3 BPG como modulador de la afinidad de la Hb por el oxígeno (Bunn y col., 1974).

Dicha afinidad está modulada por diversos factores entre los que se puede indicar el pH, la temperatura y los

compuestos fosforilados, como son el 2,3 BPG y el ATP.

El 2,3 BPG, representa las 2/3 partes del fósforo de la célula de mamíferos. El ATP tiene un efecto similar en la oxigenación de la Hb siendo menos importante en los eritrocitos de mamíferos ya que las concentraciones de ATP son muy bajas y está formando complejo con el  $Mg^{2+}$  (Bun y col.,1971). No obstante, este metabolito modula la regulación de la oxigenación de la Hb en los animales inferiores como son las especies de peces teleósteos (Giles y Randall,1980).

La regulación de los niveles de 2,3 BPG se realiza por la actividad de la 2,3 difosfogliceratomutasa y 2,3 difosfogliceratofosfatasa y por la relación inversa entre los niveles de 2,3 BPG y la actividad PK (Westhead y col,1984). Esta relación se observó en los eritrocitos que presentaban altos niveles de 2,3 BPG asociados a deficiencias en la actividad PK (Vives-Carrans y col.,1980).

La reacción entre el 2,3 BPG y la Hb es equimolecular y tiene lugar gracias a la interacción que se produce entre los grupos cargados negativamente del 2,3 BPG y los grupos cargados positivamente de las histidinas F8 y E7 de las cadenas  $\beta$  de la Hb. El 2,3 BPG supone una adaptación en la afinidad de la Hb por el oxígeno a las necesidades metabólicas del individuo. (Harvey, 1989).

### **I.2.3.- Características morfológicas y función fisiológica de granulocitos.**

Ha sido indicado en esta memoria, que los granulocitos y macrófagos se pueden originar a partir de un precursor común denominado CFC-GM o a partir de los precursores CFC-G y CFC-M. A través del proceso de diferenciación celular generan primero las células inmaduras y posteriormente la célula madura ó granulocito. En este apartado vamos a hacer una descripción de las características morfológicas de las células que componen la línea de diferenciación de la serie granulocítica.

El promielocito es la célula inmadura, perteneciente a la serie granulocítica, en la que aparecen los gránulos azurófilos. Estos contienen enzimas lisosómicas como fosfatasa ácida, mieloperoxidasa, indolesterasa,  $\beta$ -glucuronidasa y proteasas neutras (elastasa y colagenasa), hidrolasas ácidas y proteínas microbicidas que actúan hidrolizando los enlaces  $\beta$ 1-4 glucosídicos de la pared bacteriana y eliminando los "detritus" celulares ( Zinkl, 1989; Curnutte y Babior, 1990).

Al promielocito le sigue el estado de mielocito, siendo en esta célula en la que se producen los cambios morfológicos más acusados en el desarrollo del granulocito. En este estadio, se origina la síntesis de gránulos específicos que aparecen rodeando al núcleo y posteriormente se expanden a todo el citoplasma.

Los gránulos secundarios o específicos, contienen lisozima y lactoferrina. Esta última es una proteína unida a  $\text{Fe}^{3+}$  que actúa bloqueando el crecimiento bacteriano (Curnutte y Babior, 1990), dada su afinidad por el  $\text{Fe}^{3+}$  y que también reacciona con las especies derivadas de  $\text{O}_2$  dando  $\text{OH}\cdot$  mucho más reactivo.

El penúltimo estadio anterior a la célula madura, lo representa el metamielocito, al que sigue la célula "en cayado". Esta célula dará finalmente el neutrófilo polimorfonuclear ó granulocito maduro. Las reacciones de tinción de los gránulos específicos sirven para establecer la clasificación de los granulocitos en neutrófilos, basófilos y eosinófilos.

El estudio del metabolismo de granulocitos ha despertado gran interés dada la importante función fisiológica que poseen estas células.

Los granulocitos son las células de la sangre encargadas de la defensa del organismo frente a las infecciones piógenas. Su función está ligada a la de los linfocitos y macrófagos ya que estas células también están implicadas en los mecanismos de defensa.

La función fisiológica fundamental de los granulocitos es la fagocitosis. La fagocitosis es el proceso mediante el cual el granulocito ingiere la partícula u organismo extraño (Smolen y Boxer, 1990). La actividad fagocítica de

la célula depende de una producción continua de energía (Newburger y col.,1980), lo que supone que todas las rutas metabólicas del granulocito dirigidas hacia la obtención de energía adquieren gran relevancia en esta célula.

La energía necesaria para la quimiotaxis y la ingestión de las partículas es aportada por la glicolisis anaerobia (Lane y Lamkin,1984). Así mismo, otras rutas metabólicas como es la vía de las pentosas fosfato (HMP) (Babior,1984), se activan cuando la célula es estimulada por un agente extraño.

La fagocitosis se inicia con la adhesión de los granulocitos a la superficie del endotelio. Este proceso está mediado por receptores presentes en la membrana de la célula, como son Fc (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>3</sub>) y C<sub>3</sub> del sistema del complemento. La siguiente fase de la fagocitosis es la quimiotaxis, proceso de migración de los granulocitos hacia los sitios de infección o las zonas de lesión tisular (Zinkl, 1989). La quimiotaxis es positiva, lo que supone que las células se dirigen hacia zonas donde hay mayor concentración de sustancias quimiotácticas (Wilkinson,1982). Previa a la fagocitosis propiamente dicha, está la fase de opsonización. Este proceso tiene como finalidad, cubrir la partícula extraña de ciertas sustancias llamadas opsoninas que facilitan la unión del agente extraño al granulocito (Dechatelet,1979). A continuación, tiene lugar la ingestión de la partícula extraña, la formación del fagosoma y la fusión de los

gránulos primarios y específicos a la membrana del fagosoma. Finalmente, se produce la degranulación con la descarga del contenido de los gránulos al interior de la vacuola fagocítica.

En las fases posteriores de la fagocitosis se producen cambios metabólicos bruscos que consisten en un aumento del consumo de oxígeno a partir del cual se generan una serie de compuestos con actividad bactericida, como son el  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y distintos compuestos que derivan del oxígeno (Babior,1978; Badwey y Karnowsky,1980; Zinkl,1989; Smolen y Boxer,1990).

Paralelamente a estos fenómenos metabólicos tiene lugar un aumento en la oxidación de la glucosa a través de la ruta de las pentosas fosfato (HMP) (Babior,1984). Estos cambios en el metabolismo oxidativo del granulocito producidos después de recibir el estímulo se conocen como "explosión respiratoria" (Babior y col.,1973; Babior,1984).

Existen tres mecanismos principales a través de los cuales la explosión respiratoria puede favorecer la destrucción de las partículas ingeridas, éstos son:

- Formación de radicales libres. Reducción del oxígeno molecular a  $O_2^-$  por acción del sistema oxidasa.

- Halogenación mediada por mieloperoxidasa. Los granulocitos contienen gran cantidad de MPO, que puede dar reacciones de halogenación con  $Cl^-$  e  $I^-$  a bajas concentraciones de peróxido.

- Alcalinización de la vacuola fagocítica. El pH de las vacuolas fagocíticas es ácido pero tras la ingestión y degranulación experimenta un aumento inicial (7.8-8.0) causado por un bombeo de  $e^-$  hacia el interior de la vacuola fagocítica, sin protones concominantes, para después descender gradualmente. El aumento súbito de pH activa las proteínas catiónicas de los gránulos (Segal, 1985). El mecanismo de acidificación de la vacuola fagocítica después de la alcalinización parece estar asociada a una bomba de protones localizada en la membrana de los gránulos terciarios (Mollinedo y Schneider, 1984).

La base bioquímica de la explosión respiratoria es la activación de un sistema oxidasa dependiente de NADPH.

Este sistema es activado por distintos estímulos y cataliza la reducción del oxígeno molecular a anión superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) principalmente (Badwey y Karnowsky, 1980). Este proceso es reversible y necesita el aporte continuo de energía. La velocidad de oxidación de la glucosa a través de la ruta de las pentosas fosfato (HMP) está incrementada por la necesidad de aumentar la producción de NADPH.

La estructura de este sistema no es del todo conocida. Se han descrito componentes de membrana y citosólicos como integrantes del sistema oxidasa (Segal y Jones, 1979; Borregoard y col., 1983). Los componentes de membrana lo constituyen el citocromo b y una flavoproteína.

En los granulocitos el citocromo-b se localiza principalmente en la membrana de los gránulos terciarios y en menor proporción en la membrana de los gránulos específicos y la membrana plasmática de la célula (Segal y Jones,1980; García y Segal,1984 y Mollinedo y Schneider,1984). Este es el componente terminal de la cadena de transporte de  $e^-$  y posee un bajo valor de potencial (-245 mV) que le permite reducir directamente el oxígeno molecular  $O_2$  a  $O_2^-$ .

Estudios de purificación e identificación de proteínas han señalado que el citocromo-b está compuesto por 2 subunidades denominadas  $\alpha$  y  $\beta$  con Pm de 23.000 y 76.000-92.000 D respectivamente. La transcripción de la cadena  $\beta$  está limitada a la línea mieloide y aumenta en paralelo con la expresión del citocromo después de la inducción de la actividad oxidasa (Segal,1989). La glicosilación de la subunidad  $\beta$  sugiere que esta molécula está dispuesta en la superficie externa de la membrana plasmática. La función de la subunidad  $\alpha$  no es conocida. Ambas subunidades se fosforilan después de la estimulación del sistema oxidasa, lo que sugiere la necesidad de cambios conformacionales en el centro activo.

El segundo componente de membrana del sistema lo constituye una flavoproteína. El hecho de que la actividad oxidasa esté relacionada con una flavoproteína, fué postulada por Cagan y Karnowsky en 1958. Parece ser que es el cofactor flavinadeninucleótido (FAD) el que está

asociado a la actividad oxidasa (Light y col.,1981; Cross y Jones,1986; Rossi,1986; Bellavite,1988; Clark, 1990)).

Diversos grupos han aislado en los extractos de oxidasa una proteina con un Pm de 65.000-67.000 D que corresponde a una flavoproteina (Markett y col.,1985; Doussiere y Vignais,1985 y Kakinuma y col.,1987). Ensayos de fotomarcage sugieren que esta flavoproteina une NADPH (Doussiere y col.,1986; Kakinuma y col.,1987).

El mecanismo de activación de la NADPH-oxidasa ha sido objeto de numerosos estudios. Es posible construir un modelo de sistema oxidasa compuesto por el citocromo-b245 y una flavoproteina como integrantes de la cadena de transporte de  $e^-$  responsables de la formación del  $O_2^-$  a partir del oxígeno molecular. Este sistema permite la reducción directa del oxígeno a anión superóxido.

Los componentes citosólicos conocidos hasta ahora, lo constituyen una proteina citosólica de Pm 47.000 D. Esta se activa por fosforilación y se une al centro activo del citocromo b. Esta molécula puede ser un transportador de  $e^-$  o puede jugar un papel regulador y/o estructural en la integración ó activación del sistema. Es posible que la fase de latencia de la fagocitosis (lag time) refleje el tiempo necesario para la fosforilación de ésta proteina, su traslocación al interior de la membrana y su asociación al citocromo b. El último elemento del sistema, lo constituye otra proteina citosólica de Pm 65.000 D que se

estos factores ejercen "in vivo" se han descrito a través de su uso clínico, así, ambos factores aumentan el número de granulocitos en sangre periférica y activan las funciones fisiológicas de estas células (Yuo y col,1990).

Las especies derivadas del oxígeno, pueden ser tóxicas por si mismas o aumentar su toxicidad por sus reacciones con la mieloperoxidasa, por lo que los granulocitos poseen un sistema de detoxificación celular que transforma los derivados tóxicos en H<sub>2</sub>O (Klebanoff, 1988). Estos mecanismos de detoxificación están compuestos por la enzima superóxido dismutasa (SOD) citoplasmática, la glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa.

Ciertas alteraciones en la estructura o en el metabolismo de granulocitos, conducen a anormalidades en la función celular que se traducen en una mayor disposición a las infecciones piógenas. Este es el caso del Síndrome de Chédiak-Higashi en el que una fusión incrementada de los gránulos citoplasmáticos produce una degranulación ineficaz con la consiguiente disminución de la capacidad bactericida, y de la granulomatosis crónica en la que se produce una alteración en el sistema de activación de la oxidasa, lo que se traduce en una severa predisposición a las infecciones piógenas.

#### **I.2.4.-Características diferenciales de las enzimas glicolíticas en las células del sistema hematopoyético**

La glicolisis es la ruta fundamental de obtención de energía en los tejidos de muchos mamíferos. Así, las células sanguíneas (eritrocitos, plaquetas, linfocitos y granulocitos) dependen fundamentalmente de la glicolisis para cumplimentar sus necesidades metabólicas y funciones fisiológicas (Akkerman,1978; Rogers y col.,1980; Smolen y Boxer,1990).

En las células de médula ósea, la glicolisis es la ruta metabólica que adquiere especial importancia para desarrollar los procesos de diferenciación y proliferación celular. Los eritrocitos necesitan de la glicolisis para obtener la energía necesaria para el mantenimiento de los niveles de 2,3 BPG (Harvey,1989). Los granulocitos obtienen de la ruta glicolítica la energía necesaria para la locomoción, quimiotaxis y fagocitosis (Newburger y col.,1980; Weisdorff y col.,1982; Lane y Lamkin,1984).

En los tejidos de mamíferos, la ruta glicolítica está regulada en 3 puntos claves, que son las reacciones catalizadas por la HK, PFK y PK (Beutler,1990).

A lo largo de la diferenciación celular, tienen lugar una serie de cambios metabólicos asociados a cambios en la expresión de las enzimas reguladoras de diferentes rutas

metabólicas (Nijhof y col.,1984; Vora y col.,1985).

En este sentido, se ha descrito que las enzimas glicolíticas presentan modificaciones en la expresión de las distintas formas isoenzimáticas, en los mecanismos de regulación y en los niveles de actividad a lo largo de la diferenciación del sistema hematopoyético de diversas especies ( Setchenska y Arnstein,1978; Kidron y col.,1981; Gaitán y col.,1989,1990; Cuenllas y col.,1990).

Las diferencias de actividad enzimática durante la maduración y edad celular responden a diversos factores, tales como la distinta compartimentación de las enzimas, la diferente sensibilidad a los sistemas de oxidación, las acciones de proteasas específicas... ( Magnani y col.,1984; Beutler,1990).

La HK (ADP:D-hexosa-6-fosfotransferasa. EC 2.7.1.1. HK), cataliza la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato en la primera reacción de la glicolisis. En numerosos tejidos de mamíferos, la HK es reguladora del metabolismo glucídico, como ocurre en eritrocitos, plaquetas, linfocitos y granulocitos (Akkerman,1978; Rogers y col.,1980). En eritrocitos, se caracteriza por presentar un descenso en los niveles de actividad paralelo al envejecimiento celular (Corash y col.,1974).

Los tejidos de mamíferos presentan 4 isoenzimas de HK (designadas de I a IV) que se distinguen por sus

propiedades cinéticas, inmunoquímicas y reguladoras (Colowick,1973; Purick y col.,1973).

La distribución tisular de las diferentes isoenzimas de HK depende del desarrollo celular, de la situación hormonal y de las condiciones de la dieta. Así, en los eritrocitos de mamíferos, la forma isoenzimática presente de HK corresponde al tipo Ia. Esta se caracteriza por poseer un Pm estimado entre 110-120 Kd, el pI en condiciones nativas es de 6,2-6,3. La enzima se inhibe competitivamente por el ATP, la G6P inhibe a la enzima de manera lineal dependiendo de la concentración de  $MgATP^{2-}$  y altas concentraciones de glutathion también inhiben la HK ( Fornaini y col.,1982).

En los eritrocitos humanos y de conejo se han descrito distintas formas isoenzimáticas según la edad celular y el grado de diferenciación. En las células más jóvenes predomina la isoenzima Ib, mientras que, en las células envejecidas está presente la isoenzima de tipo Ia ( Stochi y col.,1982). En el precursor CFU-E, de la línea de diferenciación eritropoyética de ratón, se ha identificado la presencia de la isoenzima I (principalmente el subtipo Ia) y en menor proporción el tipo II. Este desaparece durante la diferenciación en favor de la isoenzima Ia, siendo ésta la forma predominante en el eritrocito ( Nijhof y col.,1984). En otras células sanguíneas, como linfocitos y plaquetas se ha identificado la forma isoenzimática HK-II (Akkerman y col.,1984). Deficiencias en la actividad de

esta isoenzima, se han asociado con alteraciones hematológicas (anemia, fallos en la coagulación) (Rijksen y col.,1983)

La fosfofructoquinasa (PFK) (ATP: D-fructosa-6-fosfato-1-fosfotransferasa EC 2.7.1.11) es una de las enzimas claves de la glicolisis en numerosos organismos (Rapoport,1974; Uyeda,1979). En los tejidos altamente especializados, el flujo glicolítico depende del nivel de actividad de PFK, como sucede en los eritrocitos de mamíferos (Rapoport,1974).

Las isoenzimas se han designado como P o C que predomina en cerebro; la isoenzima L o B presente en eritrocitos y la forma isoenzimática M o A que se presenta en músculo (Uyeda,1979; Dunaway y Kasten,1985). Los neutrófilos contienen principalmente subunidades tipo L y en las plaquetas existe un híbrido PL (Valentine y Paglia,1984).

Los tejidos de mamíferos poseen 3 tipos de subunidades isoenzimáticas, cada una de las cuales se expresa en diferentes tejidos y, entre ellas pueden dar fenómenos de dimerización resultando así homotetrámeros y heterotetrámeros que presentan distintos mecanismos de regulación y propiedades fisico-químicas, inmunoquímicas y cinéticas diferentes (Oskam y col.,1985; Vora y col.,1985; Bristow y col.,1987; Heesbeen y col.,1987).

La mayoría de las isoenzimas de PFK de mamíferos están formadas por subunidades de Pm 85±5 Kd, siendo el tetrámero la forma activa (Frieden y col.,1976). La asociación de estas subunidades depende del pH y de la concentración de enzima.

La PFK es una de las enzimas que presenta complejos mecanismos de regulación. Así, está sometida a regulación por un elevado número de metabolitos, a la acción de diversas hormonas y al estado nutricional. El número de efectores que puede influir en la actividad PFK depende del tejido donde esté la enzima y de la concentración de efectores (Bosca y Corredor,1984).

La piruvatoquinasa (PK) (ATP:piruvato-2-o-fosfotransferasa EC 2.7.1.40), cataliza la reacción de transformación del fosfoenolpiruvato (PEP) a Piruvato en el último eslabón de la ruta glicolítica.

La PK ha sido descrita como una de las enzimas reguladoras del metabolismo glucídico en diversos organismos y tejidos (Ngo y col.,1983; VanBerkel y Kostner,1973). Su papel regulador implica que está sometida a numerosos mecanismos de control.

Similar a otras enzimas glicolíticas, la regulación de la actividad PK se puede ejercer a través de la existencia de diferentes formas isoenzimáticas. En tejidos de mamíferos, se han descrito 4 isoenzimas de PK,

designadas como  $M_1$  (M);  $M_2$  (K); L y R. Estas isoenzimas difieren en su distribución y propiedades cinéticas, inmunoquímicas y reguladoras (Cárdenas y col.,1975).

La isoenzima K ( $M_2$ ) es la más ampliamente distribuída en todos los tejidos analizados y constituye la isoenzima predominante en tejidos indiferenciados y neoplásicos (Ibsen y col.,1980; Ngo y col.,1983). Esta isoenzima aparece también en leucocitos (Max-Audit y col.,1984). Presenta cinética sigmoideal respecto a PEP y es inhibida por la L-Ala (Van Veelen y col.,1981). Predomina en las células de médula ósea de ratón (Cuenllas y col.,1990)

La isoenzima  $M_1$  está presente en músculo esquelético, corazón y cerebro. Posee cinética hiperbólica respecto al PEP y no está regulada alostéricamente (Noguchi y col.,1986).

La isoenzima L, está presente en el hígado, posee cinética sigmoideal respecto a PEP y es activada alostéricamente por F-1.6-P<sub>2</sub> e inhibida por L-Ala y ATP (Seubert y Schoner,1971). Dos formas modificadas de la isoenzima L, denominadas  $R_1$  y  $R_2$  han sido descritas en las células de la línea eritroide. Presentan similares características cinéticas a la isoenzima L (Takegawa y col.,1983). La PK de eritrocitos de muchos organismos regula las concentraciones intracelulares de 2,3 BPG (Mueggler y Black,1981; Westhead y col.,1984). Esta regulación tiene lugar mediante la relación inversa entre

los niveles de 2,3 BPG y la actividad PK (Westhead y col.,1984).

Se han descrito distintas formas híbridas de PK en diferentes tejidos a lo largo de los procesos de diferenciación celular (Ibsen y col.,1980; Van Veelen y col.,1981; Nijhof y col.,1984;). Así, las características cinéticas de la PK varían durante la diferenciación de la serie granulocítica, existiendo una mayor presencia de la isoenzima L al ir aumentando el grado de diferenciación celular (Cuenllas y col.,1990). En células hematopoyéticas y eritrocitos de trucha, se ha descrito un cambio en las propiedades cinéticas y reguladoras de la PK. La isoenzima predominante en células hematopoyéticas es la K y en eritrocitos la isoenzima presente corresponde al híbrido KM (Gaitán y col.,1983).

### **I.3.- ESTROMA HEMATOPOYETICO**

#### **I.3.1.- Aspectos generales**

La hematopóyesis en la médula ósea está asociada a ciertos elementos del estroma que promueven el mantenimiento y la diferenciación de las células madre hematopoyéticas. Las células del estroma constituyen un soporte para la hematopoyesis así como participan activamente en la regulación de la misma mediante la producción de diversos factores de crecimiento.

La influencia de las células del estroma en el mantenimiento de la hematopoyesis, se ha puesto de manifiesto utilizando los cultivos de larga duración de médula ósea (Curry y col.,1967; Dexter y col.,1977; Dexter y Moore,1977). En este sistema la hematopoyesis se produce debido a la formación de una capa de células adherentes que constituye el apoyo para una hematopoyesis activa, manteniendo la proliferación y la diferenciación de CFU-S así como de los distintos precursores hematopoyéticos (Mauch y col.,1980; Molineux y col.,1987).

Los sistemas de cultivo "in vitro" proporcionan una metodología para analizar las interacciones entre las células del estroma y hematopoyéticas. El uso de las técnicas de clonaje celular permite clasificar los distintos elementos celulares que componen el estroma y el papel que éste juega en la hematopoyesis. Así mismo, permiten determinar los procesos que conducen a la producción y liberación de las moléculas reguladoras.

La población de células que forman el estroma hematopoyético es heterogénea. Diversos autores han señalado que el estroma hematopoyético está formado básicamente por dos tipos celulares, las células epiteliales y los macrófagos (Tavassoli y Takhashi,1982).

Sin embargo, otros autores han señalado que el estroma hematopoyético está compuesto por una mayor diversidad de tipos celulares, tales como células endoteliales,

reticulares, adipocitos, fibroblastos, macrófagos y células "blanket" (Allen y Dexter,1976; Bentley y Foidart,1980, Dexter,1982).

En este apartado vamos a hacer una descripción de las características y función de cada una de las células que componen el estroma.

Las células endoteliales tienen un significativo papel regulador en la hematopoyesis en asociación a otros elementos celulares del estroma (Allen y Dexter,1984). Así es interesante destacar la asociación de las células endoteliales a los adipocitos en la hematopoyesis "in vitro", puesto que ha sido demostrado que estabilizan la enzima lipoproteinlipasa, necesaria para el almacenamiento de lípidos (Bjorutop P., 1983) por lo que se puede afirmar que podrían estar implicados en la diferenciación de los adipocitos.

Las células reticulares se encargan de sintetizar fibras reticulares mediante un proceso de alargamiento citoplasmático proporcionando el apoyo físico para las células hematopoyéticas (Dexter,1982). La íntima asociación física entre las células reticulares y hematopoyéticas ha sugerido que las interacciones célula-célula están induciendo y regulando la hematopoyesis (Weiss y Chen,1975).

Los adipocitos son también, células características del estroma hematopoyético. En roedores y conejo, los adipocitos derivan de células reticulares adventicias (Weiss y Chen,1975; Tavasolli,1976; Brookoff y Weiss,1982) y presentan la característica, en la hematopoyesis "in vitro", de situarse en áreas de granulopoyesis activa (Sorell y Weiss,1980; Weiss,1980).

Diversos autores han señalado el desarrollo de colonias de fibroblastos derivados de células adherentes de médula ósea de distintas especies animales (Friedstein y col.,1974; Wilson y col.,1974). Los fibroblastos pueden crecer durante largos periodos de tiempo en cultivo "in vitro" y la implantación de éstas células en la cápsula renal induce la formación de estroma óseo y de hematopoyesis (Friedstein y col.,1974). No obstante, los fibroblastos no mantienen la proliferación de la célula madre hematopoyética "in vitro" (Lubennikova y Domaratskay,1976), por lo que, la hematopoyesis observada tras la implantación de fibroblastos "in vivo" se debe a la contaminación de elementos del estroma del huesped (Dexter,1982). Estos argumentos indican que los fibroblastos constituyen una matriz que sirve de apoyo para el desarrollo de otras células del estroma pero no se consideran componentes del estroma hematopoyético.

Otro componente del estroma lo constituyen los macrófagos, que aunque no tienen su origen en células del estroma, se consideran una parte funcional del mismo (Allen

y Dexter,1984). Están implicados en la diferenciación granulopoyética y en la maduración de la línea eritroide (Allen y Dexter,1983). Los macrófagos, en definitiva, controlan la hematopoyesis ya que producen diversos factores reguladores.

Otro componente del estroma definido en sistemas "in vitro" han sido las células en sábana ó "blanket". Estas tienen aspecto alargado, se sitúan de forma dispersa a lo largo de la capa adherente y pueden identificarse en reacciones de tinción con fosfatasa alcalina. Las células "blanket" segregan fibronectina y laminina, que promueven la migración celular, por lo que juegan un importante papel en la migración de macrófagos y granulocitos formando las áreas de granulopoyesis activa (Furcht y col.,1984).

### **I.3.2. Cultivo de larga duración de médula ósea**

El cultivo "in vitro" de médula ósea, fué desarrollado por Dexter en 1977. En este sistema la hematopoyesis se produce continuamente, debido a la formación de una capa de células adherentes que constituyen el apoyo morfológico y funcional de la hematopoyesis. Este sistema, permite el estudio de la influencia del estroma en la hematopoyesis (Curry y col.,1967; Dexter y col.,1977; Dexter y Moore,1977; Tavassoli y Takahashi,1982).

Los primeros datos acerca del cultivo de células de médula ósea aparecen en 1963, sin embargo no se hace

referencia a la necesidad de células del estroma en el crecimiento de células hematopoyéticas, y es en 1970 cuando el grupo de Freidstein define el papel del estroma en la hematopoyesis.

En las condiciones de cultivo apropiadas, las células adherentes que derivan de médula ósea pueden mantener la proliferación y diferenciación de las células madre hematopoyéticas durante largos periodos de tiempo (Till y McCulloch, 1961; Dexter y col., 1977). De tal manera, que al inocular células de médula ósea a estos cultivos las células madre hematopoyéticas (CFU-S) migran al interior de la capa adherente y establecen sitios de hematopoyesis activa (Dexter, 1979), llamados también "nichos" hematopoyéticos. Es en estos nichos donde se producen los distintos precursores hematopoyéticos, GM-CFC; BFU-E y Meg-CFC (Gregory y Eaves, 1978; Willians y col., 1978; Dexter y col., 1979) y la célula madre hematopoyética se automantiene, protegiéndose del proceso de diferenciación (Schofield, 1978). Las células hematopoyéticas más primitivas se localizan en el interior de estos nichos, al madurar migran hacia el exterior hasta que se liberan al medio de cultivo (Dexter, 1982). El cultivo de larga duración de médula ósea, produce granulocitos maduros que son morfológica y funcionalmente equivalentes a la célula "in vivo" (Dexter y col., 1980).

El cultivo de larga duración de médula ósea mimetiza la hematopoyesis "in vivo" y en este sistema, el control del

mantenimiento y proliferación de las células hematopoyéticas se realiza mediante la liberación de actividades reguladoras por células de la capa adherente (Dexter, 1983; 1984).

#### **I.4.- EFECTO DE LAS RADIACIONES IONIZANTES SOBRE SISTEMAS BIOLÓGICOS.**

##### **I.4.1.- Efecto de la irradiación en el sistema hematopoyético. Aspectos generales**

Dada la extensa utilización de las radiaciones ionizantes en terapia clínica, es de gran utilidad el estudio del efecto de dichas radiaciones sobre el sistema hematopoyético, ya que a causa de su radiosensibilidad, es un sistema limitante en radioterapia. Así mismo el denominado síndrome hematopoyético constituye uno de los riesgos más importantes derivados de accidentes radiológicos.

Los radicales libres generados en la radiólisis del agua (componente mayoritario de las células animales), pueden reaccionar con otros componentes de la célula, a través de un mecanismo de acción indirecta o bien, la energía de la radiación puede reaccionar directamente con componentes celulares mediante un mecanismo de acción directa. En cualquier caso, es aceptado que después de una irradiación los efectos de ésta se producen vía ambos mecanismos.

Los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes pueden clasificarse desde diversos puntos de vista. Una de las clasificaciones más utilizadas es la que se refiere a la transmisión celular de los efectos y a su relación con la dosis. Así, pueden clasificarse en hereditarios y somáticos.

Los efectos hereditarios son aquellos que afectan a los descendientes del individuo irradiado. Para que estos efectos se produzcan es necesario que las células germinales del individuo se hayan afectado.

Efectos somáticos, son aquellos que sólo afectan al individuo que ha recibido la irradiación y no se transmite a sus descendientes, lo que supone que no se han afectado las células germinales.

A su vez, los efectos de la radiación pueden clasificarse según la incidencia que tengan en sí mismos, así tenemos: efectos estocásticos y deterministas.

Los efectos estocásticos se caracterizan porque la probabilidad de que ocurra el efecto depende de la dosis. Esto supone que un aumento en la dosis recibida implica una mayor probabilidad de transformación de alguna célula del organismo. Este efecto está relacionado con la aparición de mutaciones cromosómicas y, según que éstas afecten a células germinales o somáticas tenemos los efectos estocásticos hereditarios o estocásticos somáticos. La

gravedad de este tipo de efectos depende de otros factores, como es la localización de las células afectadas.

Los efectos deterministas o no estocásticos se caracterizan porque el efecto depende del número de células afectadas. En este tipo de efecto existe una dosis umbral por debajo de la cual el número de células afectadas es inapreciable para que se manifieste el efecto. La gravedad de este tipo de efectos es proporcional a la dosis recibida.

En función de estos conceptos, la descripción del daño hematopoyético que se realiza en esta memoria se encuadra en los efectos somáticos deterministas.

La radiosensibilidad de un órgano o tejido depende de dos factores, la sensibilidad inherente de cada célula y la cinética de la población. Así mismo, la evolución de la respuesta a la agresión de la radiación, depende de la velocidad con que las células de un tejido se reemplazan y de su dinámica de producción, diferenciación, envejecimiento y pérdida.

Los tejidos más radiosensibles son los que poseen un sistema de organización jerárquica, formados por poblaciones celulares de rápida proliferación, que contienen células madre a partir de las cuales se forma un compartimento de amplificación y tránsito que tiene como finalidad generar las células postmitóticas diferenciadas.

Estas características son las que le confieren al sistema hematopoyético su elevada radiosensibilidad. Así, la elevada sensibilidad a la radiación de las células madre hematopoyéticas y de los precursores comprometidos, es la causa de la parada proliferativa de estas células. Esto origina el síndrome hematopoyético, que se caracteriza porque la pérdida normal de las células de sangre periférica no puede ser compensada y, en consecuencia, tras la irradiación recibida y después de un periodo de latencia se produce una disminución en el número de células circulantes. Este síndrome se manifiesta en una menor resistencia ante los procesos infecciosos, una mayor tendencia a las hemorragias y en general aparece una grave anemia.

#### **I.4.2.- Radiosensibilidad de las poblaciones celulares hematopoyéticas.**

El sistema hematopoyético, dadas las características comentadas es uno de los sistemas limitantes en radioterapia y causa primaria de riesgo letal en el caso de accidentes radiológicos. Trás la irradiación, se producen una serie de fenómenos que, dirigidos a paliar el daño originan alteraciones en el sistema hematopoyético.

Vamos a enumerar una serie de fenómenos que tienen lugar en el sistema hematopoyético de ratón después de su exposición a una dosis moderada de irradiación.

Después de la irradiación, se produce un brusco descenso en el número de células madre y de progenitores comprometidos. Estos bruscos descensos se continúan con una recuperación exponencial, en la que algunos parámetros alcanzan los valores iniciales mientras que otros parámetros no llegan a situarse en los valores control.

La recuperación del daño agudo es rápida a causa de la gran capacidad proliferativa de las células madre y es completa en cuanto al número de células en sangre periférica (Hendry, 1985; Testa 1988); pero puede ocultar alteraciones en las poblaciones de precursores como consecuencia del estrés proliferativo de estas células y de su radiosensibilidad (Hendry, 1985).

Los precursores del sistema hematopoyético poseen distinta sensibilidad a las radiaciones ionizantes según las especies (Hendry, 1985). Así, en los roedores, los precursores hematopoyéticos más radiosensibles son los precursores eritroides BFU-E, CFU-E y el precursor de linfocitos B; mientras que los precursores de granulocitos, macrófagos y megacariocitos son menos radiosensibles que los anteriores y presentan entre ellos, similar sensibilidad a la irradiación (Hendry, 1988).

La etiología del daño residual de médula ósea no es del todo conocida, ciertos autores han indicado que el daño residual hematopoyético es una consecuencia de la reducción en el número de células madre con capacidad proliferativa

(Reincke y col., 1982). Otros autores, han indicado que el daño residual se debe a alteraciones en el estroma hematopoyético (Hendry y col., 1984; Molineux y col., 1987).

Dado que éste, es el microambiente funcional necesario para que se produzca la hematopoyesis, una alteración en el estroma puede desencadenar un fallo en médula ósea a largo plazo. Puesto que la composición del estroma hematopoyético es heterogénea, la alteración que la irradiación puede producir en dicho estroma dependerá de la radiosensibilidad de cada uno de los componentes celulares que lo integran (Fitzgerald y col, 1986; y Gualteri, 1987). A pequeñas dosis de radiación, el estroma hematopoyético puede mantener un daño reversible y liberar factores de crecimiento hematopoyético que afecten a algunas de las funciones de las células que produce (Alberico y col., 1987; Nicola., 1989).

Por lo tanto, se puede considerar, que el daño residual en médula ósea pueda ser el responsable de alteraciones hematopoyéticas posteriores, de tal manera que se comprometa la capacidad de reserva del tejido a lo largo de la vida del individuo.

## **I.5.- OBJETO DEL TRABAJO**

Dentro del interés, por conocer las consecuencias de la interacción de las radiaciones ionizantes en los organismos vivos, el análisis de las alteraciones que la radiación puede producir en el sistema hematopoyético, es uno de los objetivos prioritarios en radiobiología.

El sistema hematopoyético, por sus características de diferenciación y proliferación celular, es uno de los tejidos más radiosensibles del hombre y de los mamíferos en general (Hendry,1985).

Después de una exposición accidental o terapia citorreductiva, la recuperación del sistema hematopoyético puede parecer completa respecto al número de células en sangre periférica, pero puede ocultar otro tipo de disfunciones que se manifiesten a largo plazo dando lugar a alteraciones hematopoyéticas metabólicas y funcionales en los distintos estadios de diferenciación celular.

Sobre la base de estas consideraciones teóricas, el objeto de este trabajo será evaluar el daño residual que las radiaciones ionizantes ejercen en el sistema hematopoyético de ratón, tras la irradiación global y aguda con una dosis subletal de 5 Gy. Para ello, se cuantificará la regeneración de precursores hematopoyéticos comprometidos y se estudiarán las posibles modificaciones metabólicas y funcionales en células de médula ósea y en

células maduras (eritrocitos y granulocitos). En las tres poblaciones celulares elegidas, determinaremos los niveles de actividad de las enzimas reguladoras de la glicólisis, dada la importancia de esta ruta en la obtención de energía (Nijhof,1984; Agard y Board,1984; Lane y Lamkin,1984).

Como parámetro indicativo de la funcionalidad de las distintas poblaciones estudiadas, analizaremos algunos aspectos del metabolismo del hierro en células de médula ósea (Ho y col.,1989); el mecanismo de regulación de la hemoglobina en eritrocitos (Beutler,1990) y la capacidad de producción de anión superóxido en granulocitos, como parte importante de la fagocitosis(Zinkl,1989).

Para evaluar la implicación del estroma de médula en el daño hematopoyético residual, utilizaremos el sistema de cultivo "in vitro" de larga duración de médula ósea, que nos permitirá analizar las interacciones entre las células del estroma y las células hematopoyéticas en el proceso de regulación de la hematopoyesis.

## **MATERIAL Y METODOS**

## **II.- MATERIAL Y METODOS**

### **II.1.- MATERIAL**

#### **II.1.1.- Animales de experimentación**

Se han utilizado ratones (Mus musculus L.) hembras adultas, híbridas (F<sub>1</sub>) del cruzamiento entre machos de la cepa Balb/C y hembras de la cepa C57 Bl, de 12 semanas de edad. Los animales pertenecen al estabulario de la Unidad de Efectos Biológicos del CIEMAT, fueron mantenidos en condiciones ambientales constantes a 22°C de temperatura, 50% de humedad relativa y con periodos de luz-oscuridad de 12 horas. Para su alimentación, se les administró pienso Sandermus (Sanders) y agua ad libitum.

#### **II.1.2.- Productos utilizados**

Se han utilizado productos químicos de los laboratorios Merck calidad R.A. Los productos bioquímicos pertenecían a los laboratorios Boehringer Mannheim (G.F.R) y Sigma Chemical Company (St. Louis Mo USA). Los medios de cultivo (Fischer e Iscove's modificado Dubelco medio IMDM) procedían de la casa Gibco LTD (Scotland), se prepararon a partir de medios base de composición definida, suplementados con antibióticos (penicilina y estreptomina) y bicarbonato sódico. Se prepararon al doble de su concentración (2x) y se conservaron congelados.

Previo a su utilización, se diluyeron al 50% (v/v) con agua desionizada estéril. El Agar era de la firma Difco (USA); los sueros empleados procedían de los laboratorios Flow y Hazleton, antes de su utilización fueron inactivados en baño de agua a 56°C durante 30 min y testeada su capacidad para estimular el crecimiento "in vitro" de precursores hematopoyéticos.

La transferrina utilizada fué transferrina humana saturada de Fe Sigma Chemical Co (USA). El  $^{125}\text{I}$ Na (100  $\mu\text{Ci/ml}$ ) pertenecía a la casa Amersham Radiochemical Centre (UK). Las esferas de poliestireno fueron de Pierce Eurochemie B.V (Netherland).

### **II.1.3.- Material de Laboratorio**

La extracción de médula ósea se realizó con material quirúrgico estéril. Las suspensiones y cultivos celulares se realizan en cabina de flujo laminar (Telstar mod AV-100).

La cuantificación de las suspensiones celulares se realizó con un contador electrónico de partículas (Coulter Counter modelo ZM Electronics, England) con tubo de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. También se han cuantificado las suspensiones celulares al microscopio óptico (Leitz Laborlux S) en cámara de Neübauer.

La incubación de los cultivos celulares se realizó en

incubadores de CO<sub>2</sub>, humedad y temperatura controlada de la marca Napco modelo 7100-01 para la estufa que se mantuvo a 33°C y modelo 7100-220 M21968 para la estufa mantenida a 37°C.

Las colonias granulo-macrofágicas se observaron y cuantificaron con una lupa estereoscópica Olympus H011. Los cultivos de larga duración de médula ósea se observaron en un microscopio invertido Leitz Labovert Fs.

Las pesadas fueron realizadas en balanza analítica Sartorius y en granatario Stanton D50T. Las medidas de pH se realizaron en un pH-metron Crison micropH 2001.

Las centrifugaciones fueron realizadas en centrífuga refrigerada Sorvall RC5C y en centrífuga de mesa Selecta Meditronic.

Las medidas espectrofotométricas se verificaron en un espectrofotómetro UV/vis PU8820 Philips termostatizado.

Los extractos enzimáticos y reactivos se conservaron en frigorífico Zanussi y en congelador Kelvinator modelo ACK-55.

Las homogenizaciones se realizaron en un homogenizador Omni Mixer modelo nº17106, Omni international.

## II.2.- METODOS

### II.2.1.- Irradiación y dosimetría

La irradiación de los animales se ha realizado con un equipo de rayos X MG-323 Philips en la instalación radiactiva IR-04 del CIEMAT. Las condiciones de la irradiación fueron de  $250 \pm 2,5$  kV y  $12,8 \pm 0,4$  mA. La filtración inherente nominal del tubo es 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 hemireductora resultante fue de 2,8 mm Cu.

Los animales se irradiaron en grupos, introducidos en recipientes de metacrilato diseñados y construidos en el CIEMAT. En estos recipientes, las variaciones de dosis absorbidas son inferiores al 2%. La mesa giratoria de irradiación se situó a 43 cm del foco de irradiación, consiguiéndose una irradiación uniforme con una tasa de dosis de 0,88 Gy/min y una dosis absorbida total en el cuerpo de 5 Gy. La determinación de la tasa de dosis absorbida en tejido se obtuvo a partir de la medida de exposición. Esta se ha realizado en un dosímetro Farmer 2570 de Nuclear Enterprises y la cámara de ionización de 0,6 cm<sup>3</sup> modelo 2571 de Nuclear Enterprises.

La estabilidad de la cámara ha sido comprobada mensualmente por el operador de la IR-04 mediante una fuente de <sup>90</sup>Sr tipo 2503/3 (Nuclear Enterprises).

### **II.2.2.- Preparación y cuantificación de la suspensión celular de médula ósea.**

Para cada experimento se sacrificaron un mínimo de tres ratones de la misma edad para control e irradiado, mediante dislocación cervical.

Las suspensiones celulares de médula ósea se obtuvieron de los fémures y tibias de las extremidades posteriores. En condiciones estériles, se procedió a obtener la médula ósea mediante inyección en los huesos de NaCl 0,9% o de medio de cultivo IMDM con ayuda de jeringa.

Los agregados celulares presentes en la suspensión, se dispersaron mediante la aspiración repetida de toda la suspensión celular a través de agujas de diferentes grosores.

La suspensión celular se mantuvo en baño de hielo (0-4°C) hasta su utilización.

La cuantificación de las suspensiones celulares de médula ósea se realizaron al microscopio óptico utilizando cámara de Neübauer y, en ciertas ocasiones se utilizó el contador electrónico de partículas.

### **II.2.3.- Obtención de poblaciones celulares maduras de sangre periférica: eritrocitos y granulocitos**

Una vez anestesiados los animales, se extrajo la sangre y se introdujo en tubos heparinizados. A continuación, 1 ml de sangre se mezcló con Dextrano T-500 (0,33 ml) al 6%, quedando una concentración final de 1,5% y se dejaron sedimentar los eritrocitos a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Posteriormente, los eritrocitos sedimentados, se lavaron 3 veces sucesivas con NaCl 0,9% para eliminar el exceso de Dextrano.

El aislamiento de granulocitos de sangre periférica se realizó según una modificación del método de Böyum (1974).

Una vez sedimentados los eritrocitos a temperatura ambiente durante 30 min, el sobrenadante se introdujo en Ficoll-Paque ( $d=1.077 \text{ g/cm}^3$ ) y se centrifugó a 600 xg durante 20 min, con el fin de separar las distintas células de la serie blanca. Posteriormente, se retiró la capa de plasma y linfocitos y se lavaron las células con 5 ml de NaCl 0,9% a 400 xg durante 10 min a temperatura ambiente para eliminar el exceso de Ficoll. A continuación, se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  NaCl 0,9%. Para eliminar la posible contaminación de eritrocitos, se sometió la suspensión a hemólisis con

agua fría durante 25". Finalmente, se reconstituyó la isotonicidad con NaCl 3,5%, se recogieron las células mediante centrifugación y se resuspendieron en solución salina tamponada (HBSS).

Las células obtenidas fueron teñidas e identificadas con la tinción de May-Grunwald Giemsa, siendo approx 90% granulocitos.

#### **II.2.4.- Estimación de la viabilidad celular**

La viabilidad de las suspensiones celulares se determinó mediante el test de exclusión del colorante azul tripano.

Se mezclaron 100  $\mu$ l de la suspensión celular con 100  $\mu$ l de la solución azul tripano al 0,5% en solución salina a pH 7,2-7,3; transcurridos unos minutos (aprox. 10 min) se observó una muestra al microscopio óptico. Para calcular el porcentaje de viabilidad celular, se cuantificó un mínimo de 50-100 células, entre las viables (sin teñir) y las no viables (teñidas de azul).

La viabilidad celular determinada en cada ensayo alcanzó unos valores del 99%.

### II.2.5.- Cultivo de larga duración de médula ósea

El cultivo de larga duración de médula ósea, se realizó según el método descrito por Dexter (Dexter y col, 1977). El método consiste en la formación de una capa adherente de células de médula ósea (estroma) que actúa como soporte y fuente de factores estimulantes para mantener la hematopoyesis "in vitro".

Experimentalmente, consiste en inocular sin disgregar, la médula ósea de un fémur y una tibia de distintos ratones en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con 10 ml de medio de incubación.

A continuación, se incuban los frascos de cultivo en estufa a 33°C una vez gaseados con un 5% de CO<sub>2</sub>. El medio empleado para el cultivo fue el medio Fischer suplementado con un 20% (v/v) de suero de caballo inactivado y hemisucinato sódico de hidrocortisona 10<sup>-5</sup> M. En estas condiciones, a la 3ª semana de iniciado el cultivo, se forma la capa adherente y se liberan al medio las células maduras, formadas fundamentalmente por granulocitos (90%).

Semanalmente, se procede a cambiar el medio de incubación por medio fresco y se recogen los granulocitos del sobrenadante, según se indica a continuación: una vez agitadas las botellas suavemente, con el fin de desprender todos los granulocitos de los nichos hematopoyéticos, se recoge la suspensión celular y se centrifuga a 400 xg

durante 10 min, el precipitado se resuspende en distintos medios según los ensayos a realizar.

Así, para la determinación de las actividades enzimáticas, las células se resuspendieron en NaCl 0,9%, mientras que para la determinación del anión superóxido se resuspendieron en solución HBSS.

Periódicamente, se determinó la viabilidad de los granulocitos obtenidos "in vitro" según se indica en **II.2.4.** Los valores de viabilidad fueron siempre superiores al 95%.

Todos los cultivos de médula ósea de larga duración, establecidos en este trabajo, se mantuvieron con hematopoyesis activa al menos durante 2 meses.

#### **II.2.6.- Cultivo de precursores granulo-macrofágicos CFC-GM**

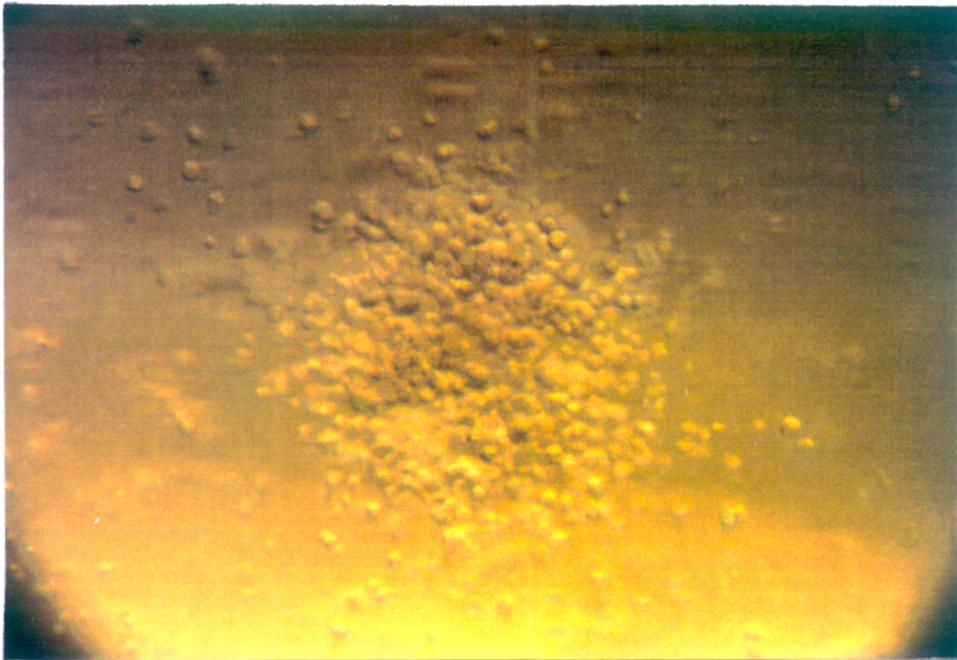
El cultivo de estos precursores, se realizó mediante técnica de cultivo "in vitro" en matriz semisólida de agar.

Las colonias mixtas granulo-macrofágicas se obtuvieron cultivando  $10^5$  células/ml de médula ósea en presencia de suero de caballo (20%), medio condicionado de la línea celular Wehi-3b (Il-3) (10%) o sobrenadante de los cultivos de LTBMCL libres de células como fuente de factor estimulante de colonias, medio de cultivo Iscove y agar 0,3%. Los cultivos se incubaron en estufa a 37°C y con un

5% de CO<sub>2</sub>.

Transcurrido el periodo de incubación de 7 días, se cuantificaron las colonias obtenidas. En la microfotografía 1, se muestra el aspecto de una colonia granulo-macrofágica después de la incubación.

En cada experimento se emplearon al menos, 5 placas de cultivo.



Microfotografía 1.- Aspecto de una colonia granulocitomacrófaga después de 7 días de incubación (x100).

## **II.2.7.- Obtención de los extractos enzimáticos**

### **II.2.7.1.- Extracto enzimático de médula ósea**

Una vez obtenida la suspensión de médula ósea según se indica en el apartado II.2.2, el extracto enzimático se preparó sometiendo esta suspensión a un proceso de ruptura por congelación y descongelación, y posterior centrifugación a 14.000 xg durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido, se recogió por decantación y se distribuyó en pequeños viales que se conservaron congelados (-20°C) hasta el momento de su utilización.

### **II.2.7.2.- Extracto enzimático de eritrocitos**

Para obtener el extracto de eritrocitos, se sometió a éstos, a un proceso de hemólisis por la adición de saponina al 0.2%. La saponina extrae las fracciones de enzimas (PFK, HK) asociadas a las membranas plasmáticas de eritrocitos (Jenkins y col., 1985) en dilución 1:3. El hemolizado se congeló, descongeló y se centrifugó a 14.000 xg durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se utilizó para las determinaciones enzimáticas.

### **II.2.7.3.- Extracto enzimático de granulocitos**

Las determinaciones enzimáticas de granulocitos, se realizaron con las células obtenidas en el cultivo "in vitro" de larga duración de médula ósea, a la 3ª semana de

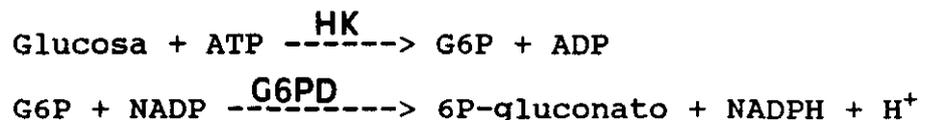
cultivo.

Las células se obtuvieron según se indica en II.2.3. La suspensión celular se ajustó a una concentración celular de  $10^7$  células/ml, a continuación se sometió a congelación y descongelación, y posteriormente se homogenizó a 840 xg durante 2 minutos. Finalmente, el homogenado se centrifugó a 14.000 xg durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se fraccionó en viales y se mantuvo congelado (-20°C) hasta su utilización.

#### **II.2.8.- Determinación de la actividad enzimática de las enzimas glicolíticas**

##### **II.2.8.1.- Determinación de la actividad hexoquinasa**

La actividad hexoquinasa se determinó midiendo espectrofotométricamente a 340 nm, la velocidad de reducción del NADP, según el método de Mc Leod y col (1963) que utiliza un sistema acoplado a glucosa 6-fosfatodehidrogenasa (G6PD), según el siguiente esquema de reacción:

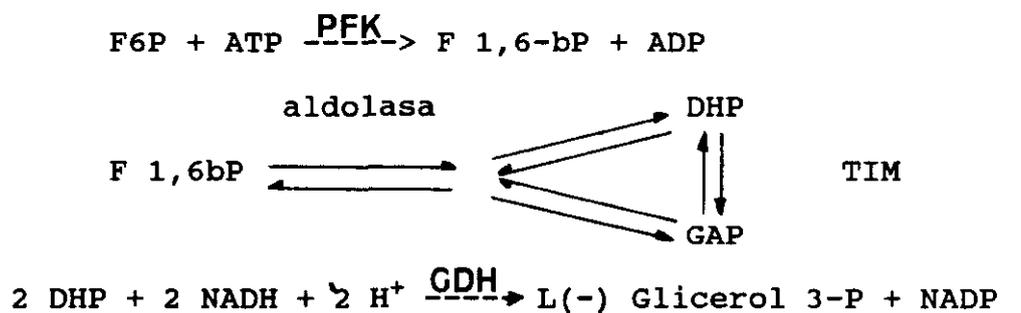


La cantidad de NADP reducida por unidad de tiempo es proporcional a la actividad hexoquinasa.

Los reactivos y sus concentraciones en cubeta para cada una de las poblaciones celulares estudiadas, se indican en el apartado III.2

### II.2.8.2.- Determinación de la actividad fosfofructoquinasa

La actividad fosfofructoquinasa se determinó midiendo espectrofotométricamente a 340 nm la velocidad de oxidación de NADH, según el método de Layzer (1975) que utiliza un sistema acoplado de aldolasa, triosafosfato isomerasa (TIM) y glicerolfosfato dehidrogenasa (GDH) según el siguiente esquema de reacciones:



La cantidad de NADPH oxidado por unidad de tiempo está en relación 2:1 con la F6P que se fosforila.

Los reactivos utilizados en los ensayos, y sus concentraciones en cubeta, se indican en el apartado III.2

### II.2.8.3.- Determinación de la actividad piruvatoquinasa

La determinación de la actividad piruvatoquinasa, se

nm es de  $6,22 \cdot 10^3 \text{ mol l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Horecker y Kornberg, 1948).

## **II.2.9.- Estudio de la unión de transferrina en células de médula ósea**

### **II.2.9.1.- Marcaje de transferrina humana**

Se utilizó transferrina humana comercial (10 mg/ml en PBS, Sigma Chemical).

El marcaje de la transferrina saturada de hierro con  $\text{Na}^{125}\text{I}$  se realizó en presencia de un antioxidante (cloramina T) inmovilizado en bolitas de poliestireno (Iodobeads, Pierce). De ésta forma el procedimiento de marcaje es menos agresivo para la proteína ya que no es necesario usar agentes reductores (Markwell, 1982).

Protocolo experimental: se disuelven 100  $\mu\text{g}$  de transferrina en 0,1 ml de PBS 0,05 M pH 7,4 quedando una concentración final de 1 mg/ml. A continuación, se incuba durante 30 minutos en baño de hielo con 0,5 mCi  $\text{Na}^{125}\text{I}$  en presencia del catalizador (Iodobeads). Después del periodo de incubación, se toma una alícuota (2,5  $\mu\text{l}$ ) de la mezcla y se cuantifica la radioactividad total (la debida a la que se ha unido a Tf y la de el  $^{125}\text{I}$  libre) ésta será el 100% de actividad para determinar posteriormente el rendimiento de incorporación.

Para eliminar el exceso de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  se separa la

proteína mediante filtración en gel con Sephadex G-25, a continuación se recogen las fracciones y se cuantifica la radioactividad. Se utilizan las fracciones en las que aparece la mayor radiactividad.

#### **II.2.9.2.- Incubación de las células con I<sup>125</sup>- transferrina**

Los ensayos de unión con células de médula ósea, se realizaron previa obtención de la suspensión de médula tal como se indica en el apartado II.2.2.

Se incubaron  $0,7-0,9 \cdot 10^8$  células/ml con cantidades crecientes de I<sup>125</sup>-transferrina (0,5-30 µg/ml) en un volumen final de 0,3 ml de HBSS con 1% de BSA. Los tubos se gasearon con un 5% CO<sub>2</sub> y se incubaron durante 90 minutos a 4°C con agitación permanente. Después del período de incubación, se lavaron las células 3 veces con HBSS y se midió la radioactividad en un contador gamma. Para calcular la unión no específica se realizaron incubaciones paralelas con transferrina no marcada en una proporción 200 veces superior a la de I<sup>125</sup>-transferrina.

Los datos se analizaron con un método de regresión no lineal capaz de utilizar los valores de unión total directamente. Con este fin, se utilizó el programa Ligand (Munson y Rodbard, 1980), el cual permite tratar la pendiente de la unión no específica como un parámetro variable y el ajuste de los datos a modelos con uno o

varios sitios de unión.

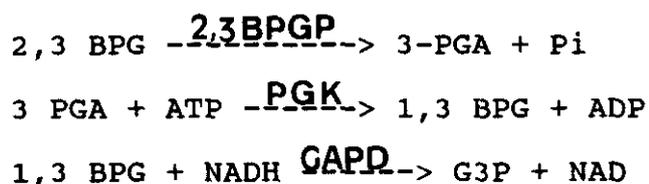
#### **II.2.10.- Determinación de los niveles de 2,3 BPG**

La sangre inmediatamente después de ser extraída en tubos heparinizados, se desproteinizó en tricloroacético (TCA) 8% en relación 1:3 y se mantuvo en baño de hielo al menos 5 minutos para asegurar la total precipitación de las proteínas.

A continuación, se centrifugó a 2.200 xg durante 10 min. El sobrenadante obtenido se utilizó para la determinación del 2,3 BPG. En estas condiciones, las muestras son estables durante 2 semanas a 4°C; no obstante las determinaciones de 2,3 BPG se realizaron siempre el mismo día de la extracción de sangre.

Los niveles intracelulares de 2,3 BPG, se determinaron según el método de Lowry y col (1964) modificado por Rose y Liebowitz (1970).

El método consiste en la conversión del 3-PGA a gliceraldehído-3-fosfato en un sistema de reacciones acoplado a 3-fosfogliceratofosfoquinasa (PGK) y gliceraldehído-3-fosfatodehidrogenasa con la formación simultánea de NAD a partir de NADH. Según el siguiente esquema de reacciones:



El descenso de absorbancia a 340 nm, debido a la oxidación de NADH es proporcional a la concentración de 2,3 BPG presente en la célula.

La mezcla contenía en un volumen final de 1 ml: Tampón trietanolamina pH 8, 160 mM; NADH 0,1 mg/ml; ATP 3,3 mg/ml; 0,25 ml de muestra se agitó, y a continuación se añadieron las enzimas GAPD 5,3 UI/ml; PGK 3 UI/ml; PGM 15,8 UI/ml. Esta mezcla se agitó, se dejó reposar 5 min y se leyó la absorbancia a 340 nm frente a agua destilada. A continuación, se añadió 0,66 mM de ácido fosfoglicólico, se incubó durante 15 min a 37°C y se registró la absorbancia a 340 nm una vez completada la reacción.

Para la realización de los cálculos, se halla la diferencia entre las absorbancias registradas antes y después de la adición de fosfoglicólico y se corrige según la dilución de este compuesto.

Para calcular la concentración de 2,3 BPG, se aplica la siguiente expresión (Bergmeyer, 1974):

$$c \text{ (}\mu\text{mol/ml)} = \frac{\text{AE} \times V_{\text{total}}}{\epsilon^{340}_{\text{NADH}} \times V_{\text{muestra}} \times d}$$

en la que:  $V_{total}$  es el volumen de la mezcla de reacción en cubeta.

$\xi$  es el coeficiente de extinción molar de NADH a 340 nm.

$V_{muestra}$  es el volumen de la muestra problema en cubeta.

$d$  es el paso óptico de la cubeta. Su valor es 1 cm.

Los valores de 2,3 BPG se expresan como  $\mu\text{mol/ml}$  de sangre.

#### II.2.11.- Determinación de los niveles de $O_2^-$

La determinación de la generación de anión superóxido se realizó cuantificando la reducción del ferricitocromo c según una modificación del método descrito por Babior y col (1973).

La mezcla de reacción contenía para ambas cubetas (referencia y muestra): 50 nmol de ferricitocromo c, granulocitos ( $10^6$  células del LTBMK y  $5 \times 10^5$  células de sangre periférica) y HBSS suplementado con glucosa. A la cubeta de referencia se añadió 50 UI/ml de SOD. Ambas cubetas se estimularon simultáneamente con 1  $\mu\text{g}$  de PMA y se registró el cambio de absorbancia a 550 nm.

La concentración de  $O_2^-$  producido, se calculó al dividir el incremento de absorbancia entre el valor del

coeficiente de extinción molar del ferricitocromo c que es de  $21,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Los resultados se expresan como  $\text{nmol O}_2^-/\text{min}/10^6$  células.

El tiempo de activación (lag time) se calculó determinando el punto de intersección entre la porción curva antes de la activación y la parte lineal después de la misma. Los resultados de este parámetro se expresan en segundos.

#### **II.2.12.- Determinación de hemoglobina**

El método utilizado fue el de la cianmetahemoglobina (Van Kampen y Zijlstra, 1961). Se basa en la transformación de la hemoglobina total a cianmetahemoglobina a pH alcalino. Este compuesto cianoderivado es estable con un coeficiente de extinción molar de  $44.000 \text{ mol l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### **II.2.13.- Valoración de proteínas**

La determinación de la concentración de proteínas se realizó según el método de Lowry y col (1951). Para ello, se utilizó seroalbúmina bovina de suero cristalizado como patrón.

#### II.2.14.- Análisis electroforético de proteínas

El análisis de las proteínas de los granulocitos obtenidos en el cultivo "in vitro" se realizó por electroforesis bidimensional de alta resolución (O'Farell, 1975).

Esta técnica separa las proteínas en función del punto isoeléctrico en la primera dimension y del peso molecular en condiciones desnaturalizantes en la segunda dimension.

Se utilizaron granulocitos de animales 6 meses después de la irradiación y a la 4ª semana de cultivo. Paralelamente, se utilizaron células obtenidas de cultivos establecidos con animales control de la misma edad.

##### Preparación de la muestra

Se recogieron las células del sobrenadante del LTBMC según se indica en II.2.11 y se resuspendieron en tampón de lisis.

Las muestras se distribuyeron en viales que se mantuvieron a -70°C hasta el momento de aplicarlos a la primera dimensión.

El método seguido para la primera dimensión fue el desarrollado por O'Farell y col (1977).

El gel contenía urea 5,5 g; solución de acrilamida 1,3 ml; NP-40 10%; anfolitos para un rango de pH 5-7 y 3-10. Una vez mezclados los reactivos, se degasifica la urea y se añade el catalizador (TEMED) y el iniciador de la reacción (APS) (10%). Con esta mezcla se cargan los tubos y se deja polimerizar durante 3 horas, tras las cuales, los geles se transfieren a una cámara de electroforesis y se llena el reservorio con  $\text{PO}_4\text{H}_3$  10 mM. A continuación, se realiza la precorrida de los geles, para eliminar los iones sulfato de APS y así el sistema queda dispuesto para cargar las muestras.

La capacidad de carga del gel, depende de la naturaleza de la muestra aplicada. En nuestro caso, se aplicaron 111  $\mu\text{g}$  de proteína tanto para la muestra de animales control como de irradiados. La concentración de células de la muestra control fue de  $358 \cdot 10^3$  células/ml y la de la muestra de irradiado de  $186 \cdot 10^3$  células/ml.

En la primera dimensión, los geles se dejaron correr durante 18 horas a 1000 V, finalmente se equilibraron durante 10-15 minutos para eliminar los anfolitos y la urea y así, permitir la interacción de las proteínas con el SDS, de éste modo quedan preparados para aplicarlos a la segunda dimensión.

La electroforesis de la segunda dimensión, se realizó según la técnica de geles en placa con hendidura (Studier, 1973), usando el sistema de geles discontinuos con

SDS descrito por Laemmli (1970). Se preparó el gel de resolución y el gel de concentración como indica Laemmli (1970). A continuación, se aplicó el gel de la primera dimensión en la parte superior de la placa de la segunda dimensión. Una vez selladas las placas, se recubren con agarosa y se colocan en la cámara de electroforesis. Finalmente, se añade el tampón de corrida en los tanques de la cámara, se conectan los electrodos y se dejan correr los geles durante toda la noche a corriente constante (12-15 mA). Al final del proceso, se separaron las placas de las cámaras y se procesaron los geles por el método de tinción con plata. El método de tinción utilizado fué el descrito por Morrissey JH (1981). Este método consiste en prefijar el gel durante 30 minutos en una solución de metanol 50% y ácido acético 10%, a continuación se incuba de nuevo el gel en una solución de metanol 5% y ácido acético 10%. Seguidamente se fija el gel en glutaraldehído 10% durante 30 minutos y se lava con agua destilada durante 2 horas mediante pases sucesivos. A continuación, se incuba el gel en una solución de DTT (5  $\mu$ g/ml) durante 30 minutos; se retira la solución de DTT y se incuba en una solución de nitrato de plata 0,1% durante 30 minutos. Por último, se lava el gel con agua destilada y con una pequeña cantidad de solución de revelado formada por formaldehído 0,018% y carbonato sódico 3%. Para alcanzar el nivel de tinción adecuado, se introduce el gel en una nueva solución de revelado.

### II.2.15.- Valoracion de datos

El tratamiento estadístico de los valores experimentales obtenidos, se ha realizado mediante el cálculo de media aritmética ( $\bar{x}$ ), desviación típica (DS) y error estandar (ES).

Se calculó la significancia estadística por la distribución de Student, que es una corrección de la distribución normal de frecuencias para pequeños muestreos (Spiegel,1970). Con el cálculo de la "t" de Student para distintas probabilidades, evaluamos la mayor o menor probabilidad de que la diferencia de un resultado con otro sea o no estadísticamente significativa.

Se calcularon los límites de confianza a partir de los cuales la diferencia es altamente significativa (\*\*\*,  $p < 0,001$ ); muy significativa (\*\*,  $p < 0,01$ ); significativa (\*,  $p < 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

### **III.- RESULTADOS**

#### **III.1.- ESTUDIO DEL DAÑO RESIDUAL EN POBLACIONES CELULARES HEMATOPOYETICAS**

Para cuantificar el daño hematopoyético residual inducido por una dosis subletal de 5 Gy, hemos determinado algunos parámetros celulares que reflejan el estado de la médula ósea tras la irradiación.

La tabla 1 resume los resultados obtenidos respecto a diversos parámetros de la hematopoyesis de ratón a diferentes tiempos después de la irradiación.

Con respecto a las células nucleadas en sangre podemos indicar que no se observan diferencias entre animales control e irradiado en los tiempos postirradiación analizados superiores a un mes. El valor hematocrito a estos tiempos después de la irradiación, tampoco está significativamente afectado (Tabla 1).

La medida del número total de células nucleadas en médula refleja una recuperación completa a los 30 días después de la irradiación, alcanzando el valor control y manteniéndose estable durante el periodo estudiado (12 meses).

Como representante del compartimento de precursores

comprometidos, hemos determinado el número de células formadoras de colonias granulo-macrofágicas (CFC-GM). Los resultados se muestran en la tabla 1. Se puede observar, que el valor de CFC-GM/femur es de un 44% respecto al control un mes después de la irradiación. El número de CFC-GM se mantiene inferior al valor control a lo largo del periodo estudiado siendo de un 60% al año de la irradiación.

**Tabla 1.-** Análisis de diferentes parámetros hematológicos a distintos tiempos después de la irradiación.

| Tiempo<br>(meses) | Sangre |                          | Médula ósea                   |                             |           |
|-------------------|--------|--------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------|
|                   | Htco   | Nucl/ml<br>( $10^{-6}$ ) | CFC-GM/femur<br>( $10^{-6}$ ) | Nucl/femur<br>( $10^{-6}$ ) |           |
| 0,2               | C      |                          | 19,2±0,9                      | 17,4±0,89                   |           |
|                   | I      |                          |                               | 1,5±0,20                    |           |
| 1                 | C      | 50±3,0                   | 6,0±0,7                       | 17,4±2,30                   | 14,0±0,90 |
|                   | I      | 47±2,0                   | 6,1±0,6                       | 7,7±0,24                    | 15,1±0,40 |
| 3                 | C      | 52±3,5                   | 6,3±0,4                       | 13,7±0,21                   | 12,4±1,30 |
|                   | I      | 50±0,7                   | 5,8±0,5                       | 11,6±0,92                   | 13,0±1,30 |
| 6                 | C      | 48±1,7                   | 7,0±0,6                       | 14,2±1,75                   | 18,8±0,20 |
|                   | I      | 49±3,2                   | 6,7±0,7                       | 7,2±0,30                    | 20,0±1,20 |
| 12                | C      | 50±1,0                   | 4,7±0,7                       | 21,0±6,50                   | 25,4±3,80 |
|                   | I      | 44±2,5                   | 4,8±0,2                       | 12,6±1,30                   | 22,7±2,40 |

C: control; I: irradiado. Los valores expresan  $\bar{x} \pm ES$ . n=3-8. Cada experimento corresponde a un animal.

### III.2.- ESTUDIO PREVIO DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE ENSAYO DE ACTIVIDAD HK, PFK Y PK EN CELULAS DE MEDULA OSEA, ERITROCITOS Y GRANULOCITOS.

Con el fin de fijar las condiciones óptimas de actividad de HK, PFK y PK en cada una de las poblaciones celulares, se realizaron una serie de ensayos preliminares.

El método de análisis utilizado, consistió en medir la actividad enzimática modificando las concentraciones de los componentes de la mezcla de reacción hasta fijar la concentración adecuada para cada uno de ellos.

Para la determinación de HK, se comenzó modificando la concentración de los iones  $Mg^{2+}$  y  $K^+$  en unos rangos comprendidos entre 0,75 mM y 12 mM para los iones de  $Mg^{2+}$  y 0,12 mM a 8 mM para los iones de  $K^+$  (ClK) y 12 mM a 40 mM para los iones de FK; del mismo modo se modificó la concentración de Mg-ATP entre 0,1 mM y 10 mM y la de el coenzima NADP entre 0,4 y 1,9 mM. La enzima auxiliar G6PD se modificó en un intervalo de 1,75 UI/ml a 35 UI/ml. El sustrato de la reacción, la glucosa se modificó entre 0,05 y 10 mM. Finalmente, se ensayaron distintas concentraciones de proteína en cubeta para cada población celular analizada. Por último, y con el fin de comprobar que no había actividad glucoquinasa endógena, se ensayó la actividad en ausencia de glucosa. Una vez comprobado esto se fijó la adición de glucosa antes de iniciar la reacción enzimática. Las condiciones óptimas de actividad HK para

cada una de las poblaciones celulares estudiadas se muestran a continuación:

.médula ósea

Tampón tris-maleico pH 6,9 90 mM; MgCl<sub>2</sub> 6 mM; Mg-ATP 3 mM; KF 25 mM; KCl 2 mM; NADP 0,75 mM; G6PD 17,5 UI/ml; proteína 0,04 mg/ml. La reacción se inició con la adición de glucosa 1,5 mM.

.eritrocitos

Tampón tris-maleico pH 6,9 90 mM; MgCl<sub>2</sub> 6 mM; Mg-ATP 6 mM; KF 25 mM; KCl 0,12 mM; NADP 1,5 mM; 35 UI/ml G6PD; proteína 0,3 mg/ml. La reacción se inició tras la adición de glucosa 10 mM.

.granulocitos

Tampón tris-maleico pH 6,9 90 mM; MgCl<sub>2</sub> 0,75 mM; Mg-ATP 6 mM; KF 25 mM; NADP 0,75 mM; G6PD 35 UI/ml proteína 0,13 mg/ml. La reacción se inició tras la adición de glucosa 6 mM.

Para determinar las condiciones óptimas de PFK, se modificaron las concentraciones de los iones Mg<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup> en unos intervalos comprendidos entre 0,1 mM y 9 mM para el Mg<sup>2+</sup> y de 5 mM a 80 mM para el ión K<sup>+</sup>; los sustratos Mg-ATP y F6P se modificaron en rangos comprendidos entre 0,3 mM

y 4 mM para el ATP-Mg y de 0,3 mM a 16 mM para la F6P; el coenzima NADH se ensayó a concentraciones de 0,12 mM a 0,6 mM. El DTT se modificó en rangos comprendidos entre 2 mM y 16 mM. Las enzimas auxiliares, se ensayaron a unas concentraciones entre 0,1 UI/ml y 1 UI/ml para la aldolasa, 1,7 UI/ml a 7 UI/ml para la GDH y de 7,5 UI/ml a 21 UI/ml para la TIM. Por último, se ensayaron diversas concentraciones de proteína en cubeta para cada población celular. Las condiciones óptimas de actividad PFK para cada una de las poblaciones celulares analizadas se indican a continuación:

#### .médula ósea

Tampón tris-maleico pH 6,9 90 mM; MgCl<sub>2</sub> 4,5 mM; KCl 80 mM; Mg-ATP 2 mM; NADH 0,5 mM, DTT 8 mM; F6P 8 mM; G6P 24 mM; TIM 15 UI/ml; GDH 5 UI/ml; aldolasa 0,2 UI/ml; proteína 0,077 mg/ml.

#### .eritrocitos

Tampón tris-maleico pH 6,9 90 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; KCl 10 mM; DTT 8 mM; Mg-ATP 1 mM; NADH 0,25 mM; aldolasa 0,2 UI/ml; GDH 5 UI/ml; TIM 15 UI/ml; F6P 4 mM; G6P 12 mM; proteína 1,0 mg/ml.

#### .granulocitos

Tampón tris-maleico 6,9 90 mM; Mg Cl<sub>2</sub> 4,5 mM; KCl 10

mM; NADH 0,5 mM; DTT 8 mM; F6P 8 mM; G6P 24 mM; Mg-ATP 2 mM; aldolasa 0,2 UI/ml; GDH 5,1 UI/ml; TIM 14,8 UI/ml; proteína 0,25 mg/ml.

La actividad PK se determinó según el método de Bücher y Pfleiderer (1955), modificando las condiciones de ensayo para cada componente de la reacción.

Se modificaron las concentraciones de  $K^+$  y  $Mg^{2+}$  en intervalos comprendidos entre 35 mM y 300 mM para el  $K^+$  y 4 mM a 16 mM para el  $Mg^{2+}$ . Las concentraciones de los sustratos PEP y ADP se variaron entre 2 mM y 8 mM para el PEP y de 3,5 mM a 16 mM para el ADP. El coenzima NADH se modificó entre 0,1 mM y 0,5 mM. La enzima auxiliar LDH se ensayó entre 1,5 UI/ml a 4,5 UI/ml. Al igual que para las otras enzimas se ensayaron diversas concentraciones de proteína en cubeta hasta ajustar la concentración idónea. Las condiciones óptimas de actividad para la PK se indican a continuación:

#### .médula ósea

Tampón Tris-maleico pH 6,9 90 mM; KCl 150 mM;  $MgCl_2$  8 mM; PEP 5 mM; ADP 8 mM; LDH 3 UI/ml; NADH 0,2 mM; proteína 7  $\mu$ g/ml.

#### .eritrocitos

Tampón Tris maleico pH 6,9 90 mM; KCl 75 mM;  $MgCl_2$  8

mM; PEP 5 mM; ADP 8 mM; NADH 0,25 mM; LDH 3 UI/ml; proteína 0,7 mg/ml.

.granulocitos

Tampón Tris-maleico pH 6,9 90 mM; KCl 75 mM; MgCl<sub>2</sub> 8 mM; NADH 0,25 mM; PEP 5 mM; ADP 8 mM; LDH 3 UI/ml; proteína 0,03 mg/ml.

### **III.3.- ESTUDIO DE LA FUNCION Y METABOLISMO DE CELULAS DE MEDULA OSEA**

#### **III.3.1.- Unión de transferrina a células de médula ósea**

Dada la necesidad de  $Fe^{+3}$  que poseen las células de médula ósea para cumplimentar los procesos de proliferación y diferenciación celular, determinamos la capacidad de unión de transferrina en las células de médula ósea de ratón a diferentes tiempos después de la irradiación (3, 6 y 12 meses).

El estudio de la capacidad de unión de transferrina a las células de médula ósea, se realizó utilizando las condiciones experimentales indicadas en el apartado **II.2.9.2.**

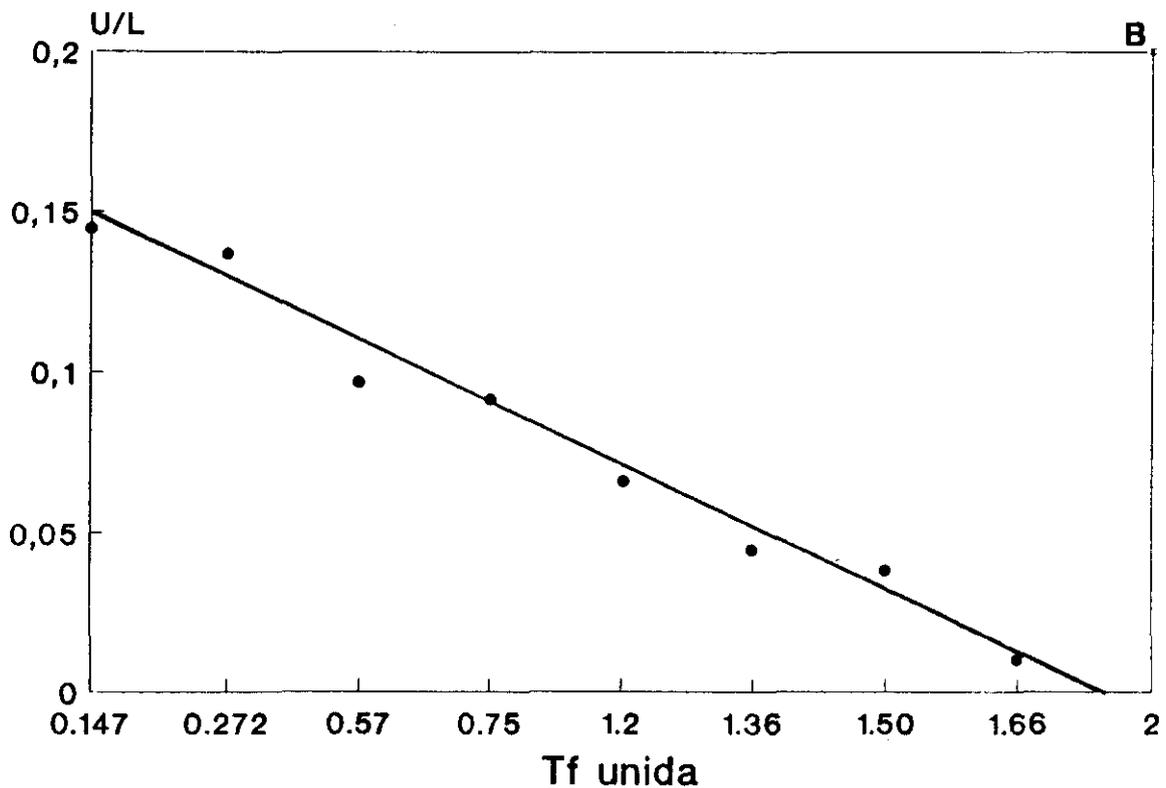
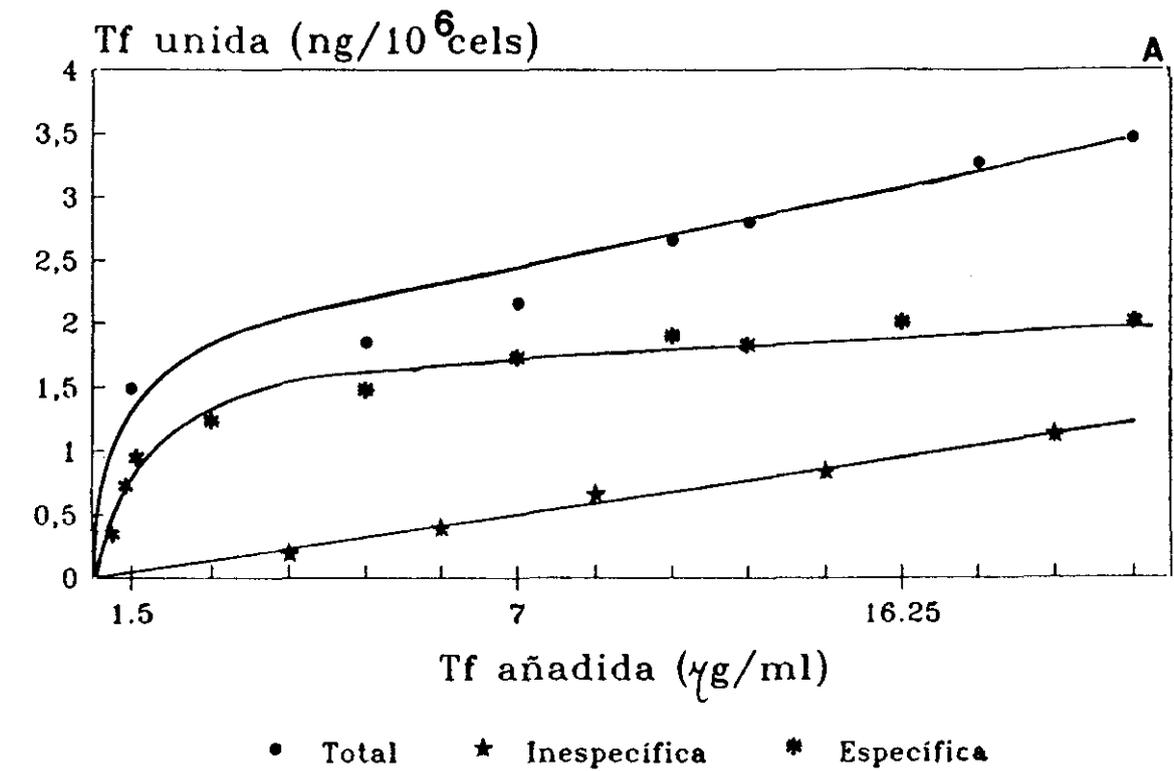
La figura 1A muestra los valores obtenidos de la unión total, específica y no específica. Como se puede observar, para una concentración de Tf aproximadamente de 20  $\mu\text{g/ml}$ , utilizada en nuestros experimentos, la saturación de la unión específica de la Tf a su receptor es total.

La representación de Scatchard de los valores de unión específica (fig. 1B) indican que, la distribución de los valores se ajustan a una línea recta.

Los resultados, respecto a la capacidad de unión de transferrina ( $B_{\text{max}}$ ) y la constante de asociación ( $K_a$ ) en

las células de médula ósea de ratones controles e irradiados se indican en la Tabla 2. Como se puede observar, los valores obtenidos de  $K_a$  varían entre  $1,08 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$  y  $1,42 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ , no encontrándose diferencias significativas de éste parámetro entre animales control e irradiado a lo largo del periodo estudiado. Del mismo modo, y respecto a los valores de  $B_{\text{max}}$  no existen diferencias en cuanto al número de sitios de unión de Tf entre las células de animales control e irradiados. Estos valores variaron entre  $1,75 \text{ ng Tf}/10^6 \text{ células}$  y  $2,25 \text{ ng Tf}/10^6 \text{ células}$  durante el periodo postirradiación analizado.

La densidad máxima de sitios de unión varió entre  $1,6 \pm 0,22$  y  $2,0 \pm 0,13 \text{ ng}/10^6$  tanto para animales control como tratados. Estos valores corresponden a un intervalo de sitios de unión entre 13.180-15.550 moléculas de Tf/célula.



**Fig.1.-** (A) Unión de transferrina a células de médula ósea. (B) Representación de Scatchard de los datos de unión específica para células de médula ósea. Condiciones experimentales: 0,7-0,9 10<sup>8</sup> células/ml y 0,5-30 µg/ml transferrina.

**Tabla 2.-** Capacidad de unión de transferrina (Bmax) y constante de asociación (Ka) en células de médula ósea de ratón control e irradiado.

| Tiempo postirradiación<br>(meses) |   | Ka<br>( $\times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ) | Bmax<br>(ng Tf/ $10^6$ cel) |
|-----------------------------------|---|--|-----------------------------|
| 3                                 | C | 1,42 $\pm$ 0,07                        | 1,97 $\pm$ 0,20             |
|                                   | I | 1,40 $\pm$ 0,24                        | 1,87 $\pm$ 0,25             |
| 6                                 | C | 1,13 $\pm$ 0,16                        | 1,75 $\pm$ 0,17             |
|                                   | I | 1,19 $\pm$ 0,14                        | 1,83 $\pm$ 0,22             |
| 12                                | C | 1,08 $\pm$ 0,18                        | 2,14 $\pm$ 0,10             |
|                                   | I | 1,16 $\pm$ 0,06                        | 2,25 $\pm$ 0,28             |

C: control; I: irradiado. Los valores se expresan como  $x \pm \text{ES}$ .  
n=3-6.

### **III.3.2.- Actividades de HK, PFK y PK en células de médula ósea**

Como ya hemos indicado en el apartado III.1 la médula ósea manifiesta disminuciones en el número de precursores a largo plazo después de la irradiación. Con objeto de estudiar si estas modificaciones se reflejaban en los niveles de actividad de las enzimas glicolíticas, determinamos la actividad de estas enzimas en células de médula ósea.

Los resultados, respecto a los niveles de actividad de HK, PFK y PK se han realizado en extracto crudo, obtenido según se indica en el apartado II.2.7.1.

Las figuras 2, 3 y 4 muestran los niveles de actividad obtenidos para las enzimas glicolíticas estudiadas, HK, PFK y PK en células de médula ósea de ratón a diferentes tiempos postirradiación.

En relación a la HK (figura 2), se puede indicar la existencia de una disminución no significativa respecto al control a 1, 3 y 6 meses postirradiación. Al final del periodo estudiado (12 meses), se observa que los niveles de actividad HK superan de manera no significativa al control.

La PFK (figura 3) muestra un descenso no significativo de actividad respecto al control para todos los tiempos

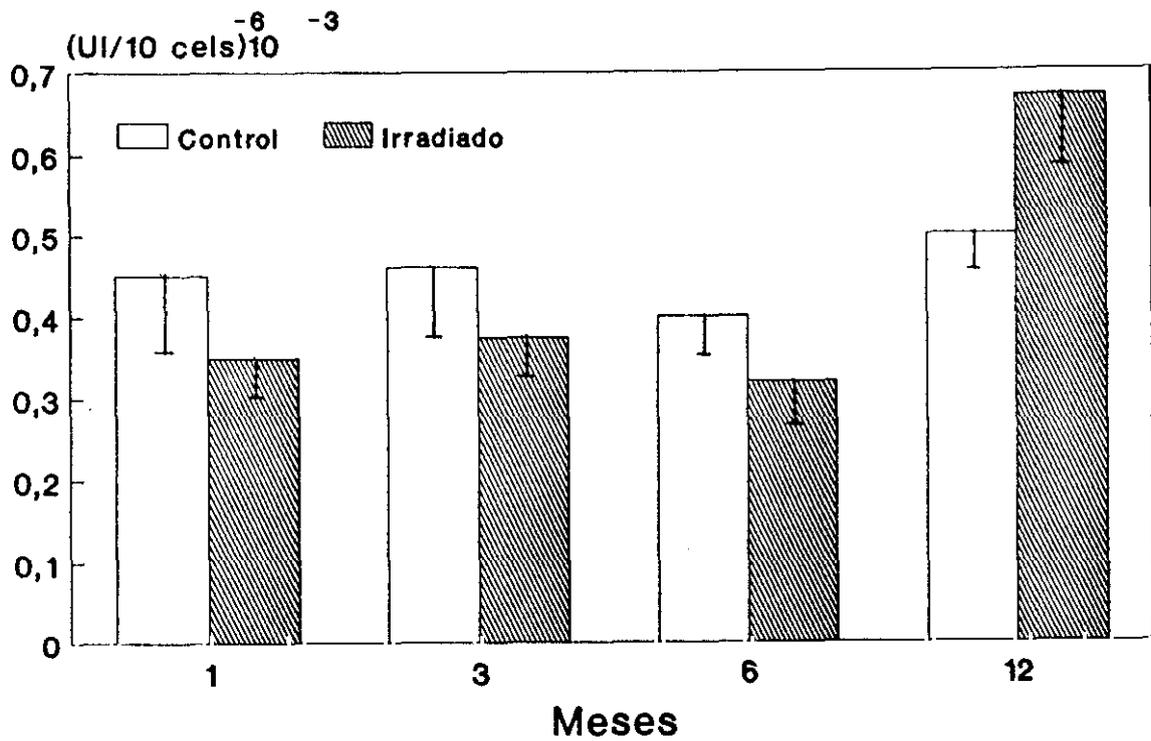
postirradiación analizados.

La figura 4, muestra los niveles de actividad de la PK. Podemos señalar la existencia de un descenso significativo en la actividad respecto al control a 1 mes postirradiación ( $p < 0.01$ ); mientras que para los otros tiempos postirradiación no se observan diferencias significativas.

De los resultados obtenidos, respecto a las alteraciones que la irradiación induce en el metabolismo glicolítico de células de médula ósea, podemos concluir que sólo se produce una disminución significativa en la actividad PK a 1 mes postirradiación, mientras que las actividades de HK y PFK no muestran modificaciones significativas durante el periodo analizado.

# Medula osea

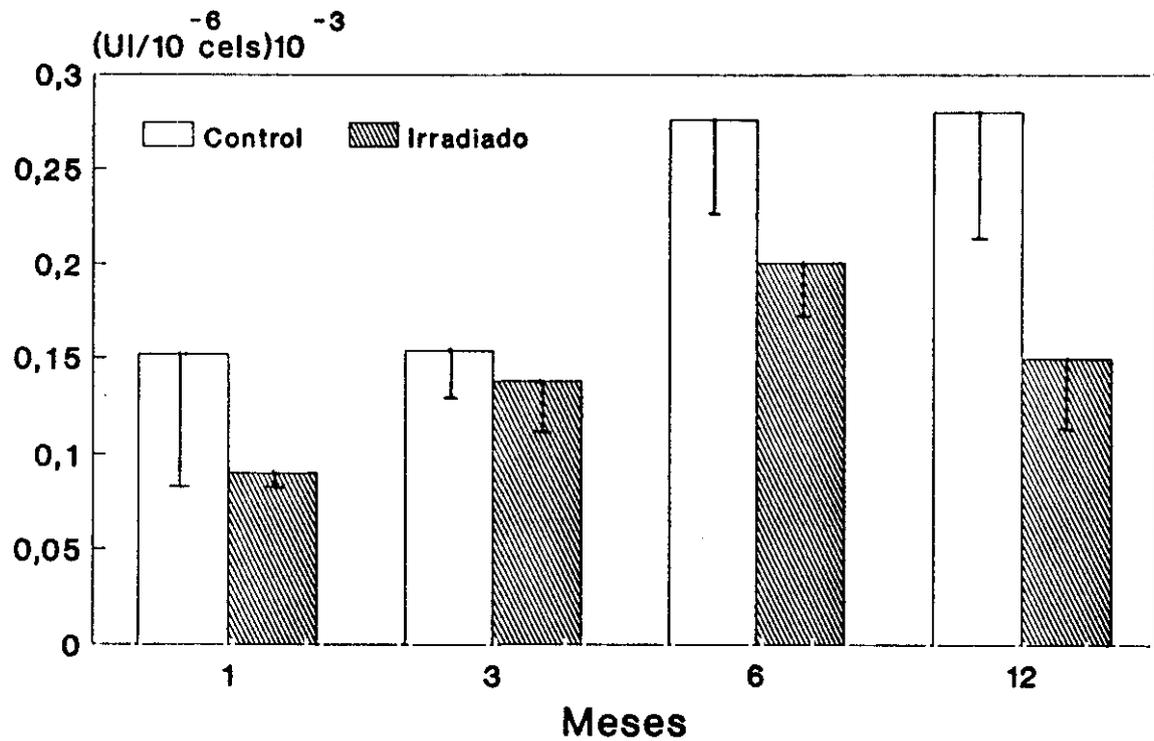
## Actividad Hexoquinasa



**Fig.2.-** Actividad hexoquinasa en células de médula ósea a diferentes tiempos después de la irradiación. Los valores expresan  $x \pm ES$ . Número de experimentos 3-4 para cada punto.

# Medula ósea

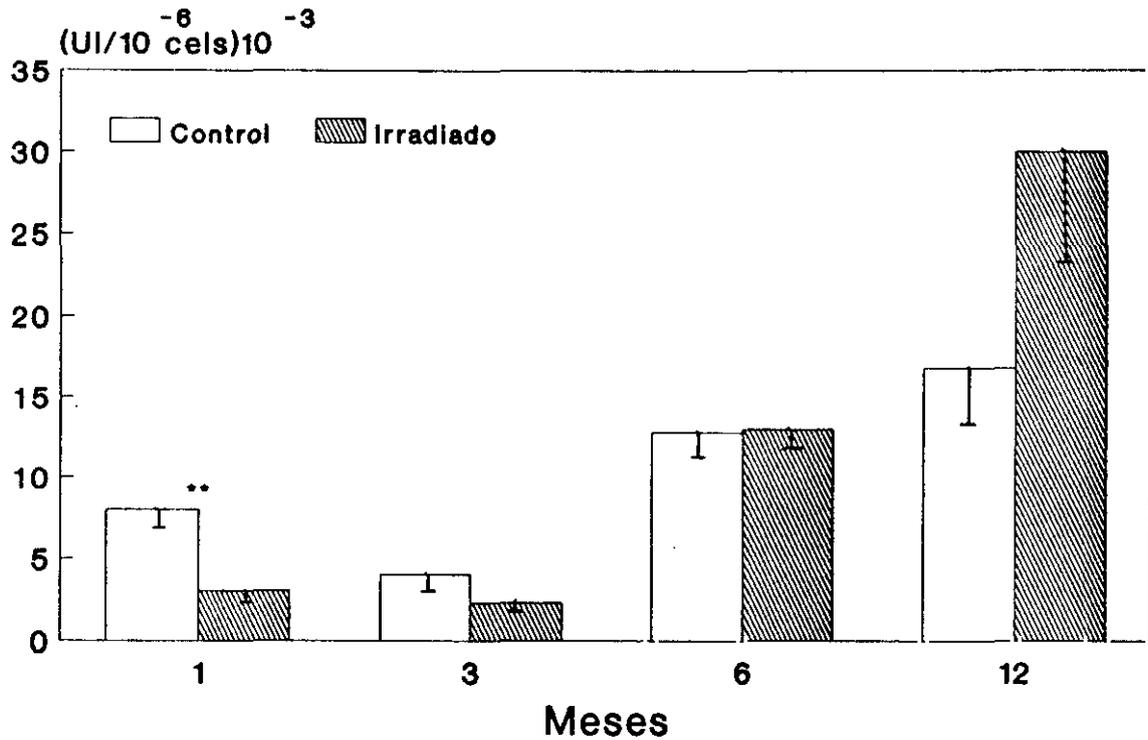
## Actividad Fosfofructoquinasa



**Fig. 3.-** Actividad fosfofructoquinasa en células de médula ósea a diferentes tiempos después de la irradiación. Los valores expresan  $\bar{x} \pm ES$ . Número de experimentos 3-4 para cada punto.

# Medula ósea

## Actividad Piruvatoquinasa



**Fig.4.-** Actividad piruvatoquinasa en células de médula ósea a diferentes tiempos después de la irradiación. Los valores expresan  $\bar{x} \pm ES$ . Número de experimentos 3-4 para cada punto. (\*\*)  $p < 0.01$ .

### **III.4.- ESTUDIO DE LA FUNCION Y METABOLISMO DE ERITROCITOS**

#### **III.4.1.- Determinación de los niveles de 2,3 BPG; hemoglobina (Hb) y proteína total**

Como es sabido, la función fisiológica fundamental del eritrocito maduro es el transporte de oxígeno a los diversos tejidos. Esta función está regulada por los niveles intracelulares de 2,3-BPG que controlan la liberación del oxígeno de la hemoglobina.

Para evaluar las posibles alteraciones en la función de los eritrocitos en animales que expresan daño hematopoyético residual, hemos determinado los niveles intracelulares de 2,3-BPG y la concentración de Hb en eritrocitos obtenidos de animales a diferentes tiempos postirradiación.

Los resultados obtenidos (Tabla 3), indican que no existen diferencias en los niveles intracelulares de 2,3 BPG entre animales irradiados y control a lo largo de los periodos postirradiación estudiados (3, 6 y 12 meses).

Respecto a los niveles de Hb a los 6 y 12 meses postirradiación (Tabla 3) tampoco existen diferencias entre los animales tratados y control.

Los niveles de 2,3-BPG encontrados en eritrocitos de animales control e irradiados guardan relación

equimolecular con los niveles de Hb presentes en la célula, tanto a los 6 como a los 12 meses después de la irradiación.

Así mismo, en cuanto a los niveles de proteína expresados por ml de eritrocitos (Tabla 3), no se observan tampoco diferencias entre los animales irradiados y los controles a lo largo del periodo estudiado (3, 6 y 12 meses)

**Tabla 3.- Niveles de 2,3 BPG, hemoglobina y proteína en eritrocitos a diferentes tiempos después de la irradiación.**

| Tiempo<br>(meses) |   | 2,3-BPG<br>( $\mu\text{mol/ml}$ ) | hemoglobina<br>( $\mu\text{mol/ml}$ ) | proteína<br>( $\text{mg/ml}$ ) |
|-------------------|---|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| 3                 | C | 6,8 $\pm$ 0,80                    |                                       | 317 $\pm$ 27                   |
|                   | I | 7,0 $\pm$ 0,60                    |                                       | 325 $\pm$ 21                   |
| 6                 | C | 6,9 $\pm$ 0,95                    | 8,3 $\pm$ 0,40                        | 353 $\pm$ 27                   |
|                   | I | 6,6 $\pm$ 1,30                    | 7,8 $\pm$ 0,22                        | 297 $\pm$ 48                   |
| 12                | C | 8,2 $\pm$ 0,85                    | 9,3 $\pm$ 0,74                        | 268 $\pm$ 38                   |
|                   | I | 7,4 $\pm$ 1,30                    | 9,7 $\pm$ 0,57                        | 324 $\pm$ 49                   |

C: control; I: irradiado. Valores expresan  $x\pm\text{ES}$ . N=3-12. Cada experimento corresponde a un ratón.

#### III.4.2.- Actividad de HK, PFK y PK en eritrocitos

Dado que la glicolisis es la ruta metabólica fundamental del eritrocito, hemos estudiado la posible variación de los niveles de actividad de las 3 enzimas glicolíticas correspondientes a extracto crudo de eritrocitos, a lo largo de 15 meses después de la irradiación.

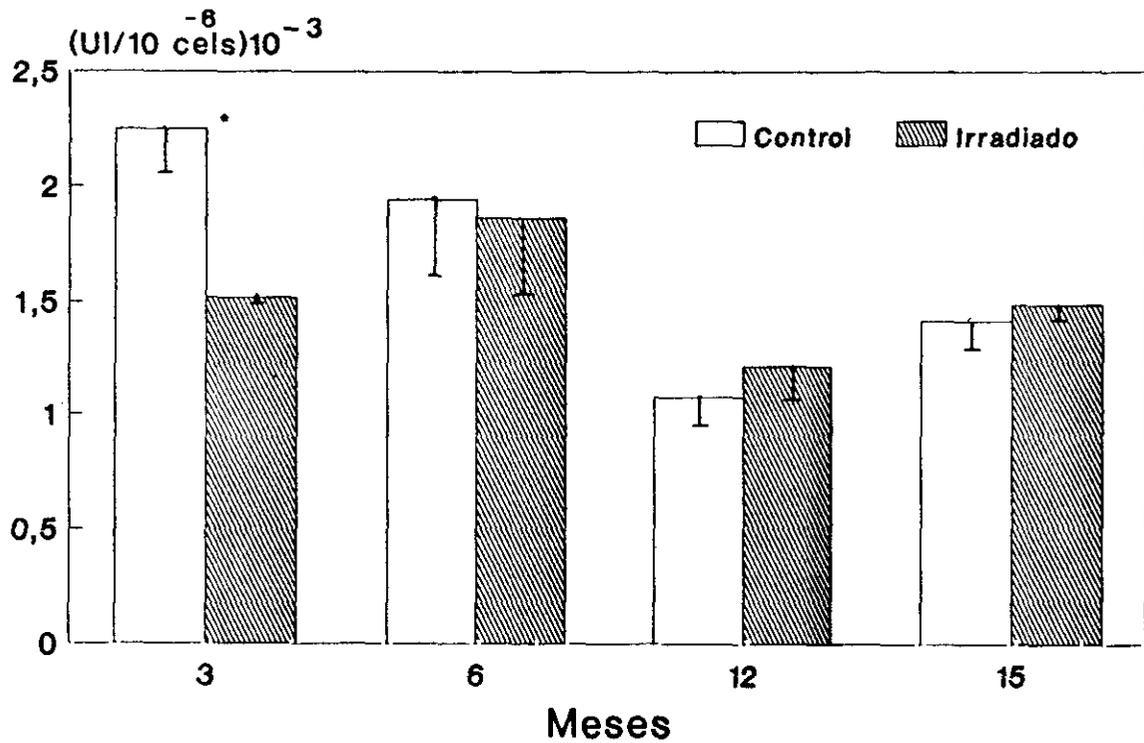
Los niveles de actividad Hexoquinasa se indican en la figura 5. Se destaca una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de la actividad enzimática respecto al control a los 3 meses después de la irradiación; mientras que a los 6, 12 y 15 meses postirradiación la recuperación de la actividad enzimática es completa.

La figura 6 muestra los niveles de actividad PFK obtenidos a diferentes tiempos postirradiación. Podemos destacar un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) en la actividad PFK de animales irradiados respecto al control a los 6 meses. La actividad PFK recupera valores normales a los 12 y 15 meses después de la irradiación.

Los niveles de actividad PK, se indican en la figura 7. Como se observa, existe una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de la actividad PK a los 3 meses después de la irradiación en animales tratados respecto al control. A partir de este tiempo, se observa una recuperación de la actividad enzimática.

# Eritrocitos

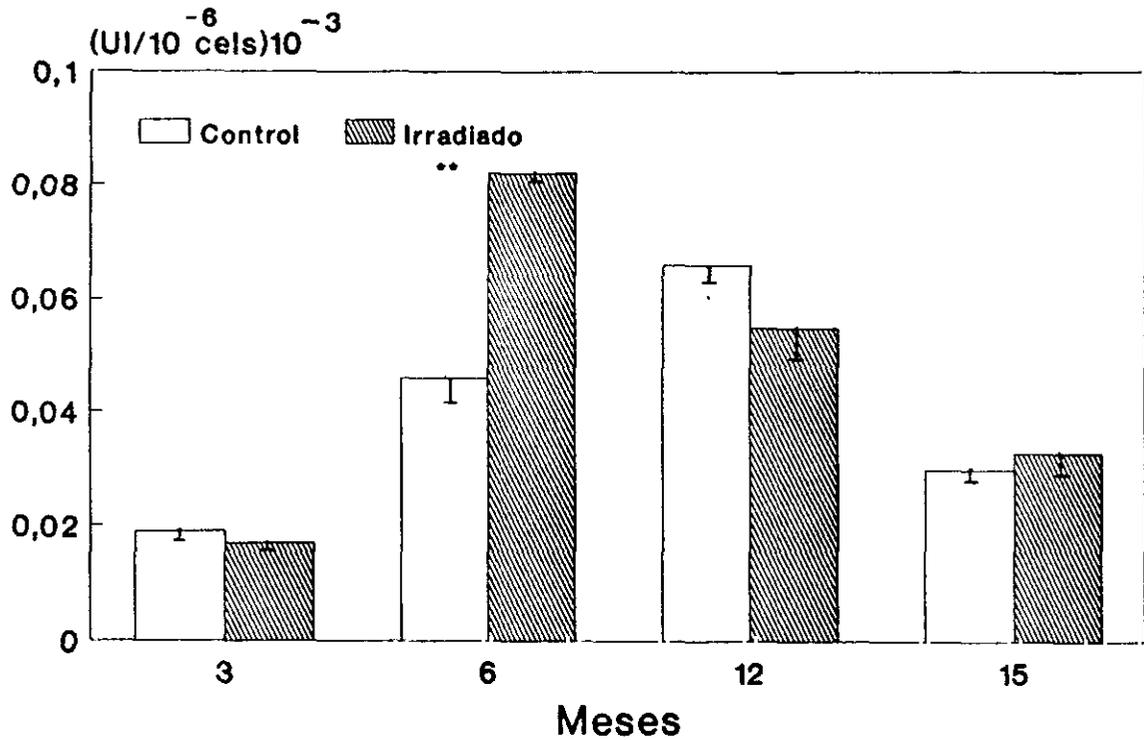
## Actividad Hexoquinasa



**Fig.5.-** Actividad hexoquinasa en eritrocitos a diferentes tiempos después de la irradiación. Los valores expresan  $\bar{x} \pm ES$ . Número de experimentos 3 para cada punto. (\*) $p < 0.05$

# Eritrocitos

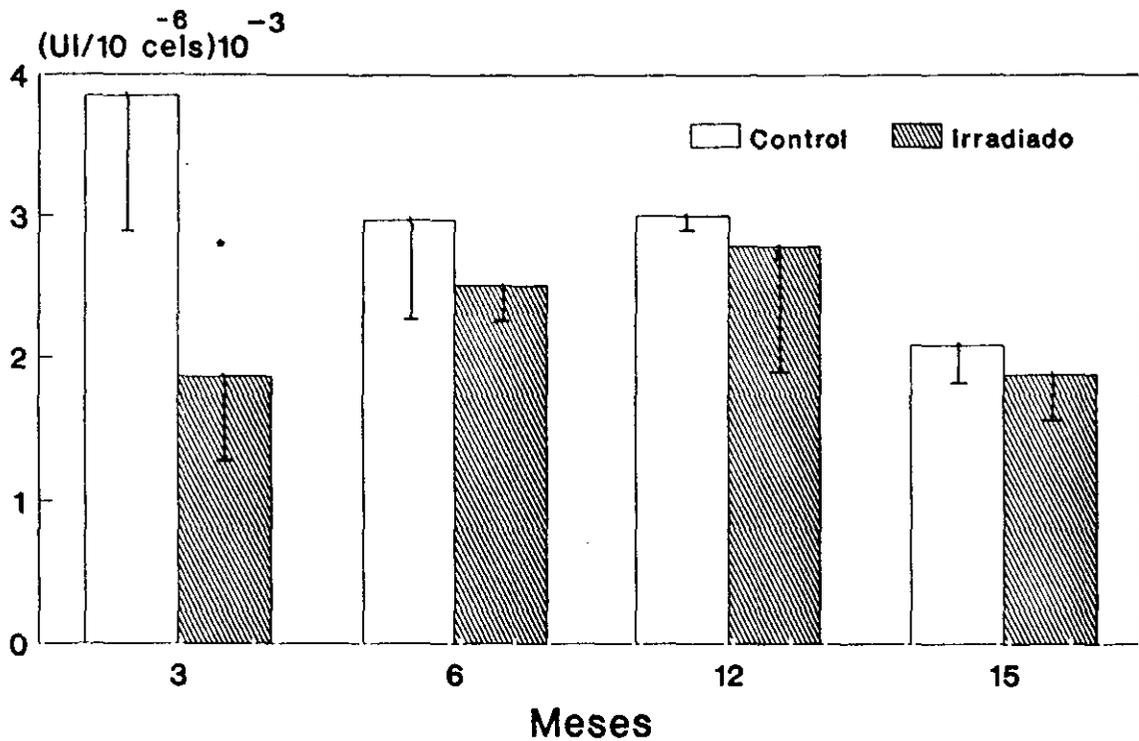
## Actividad Fosfofructoquinasa



**Fig.6.-** Actividad fosfofructoquinasa en eritrocitos a diferentes tiempos después de la irradiación. Los valores expresan  $\bar{x} \pm ES$ . Número de experimentos 3 para cada punto. (\*\*)  $p < 0.01$ .

# Eritrocitos

## Actividad Piruvatoquinasa



**Fig.7.-** Actividad piruvatoquinasa en eritrocitos a diferentes tiempos después de la irradiación. Los valores expresan  $\bar{x} \pm ES$ . Número de experimentos 3 para cada punto. (\*)  $p < 0.05$ .

### III.5.- ESTUDIO DE LA FUNCION Y METABOLISMO DE GRANULOCITOS

#### III.5.1.- Determinación de la producción de $O_2^-$ y concentración de proteína en granulocitos obtenidos de sangre periférica.

Los estudios de la producción de los niveles de  $O_2^-$  en granulocitos aislados de sangre periférica según se indica en II.2.3., se realizaron a los 6 y 12 meses después de la irradiación. Cada experimento se ha realizado utilizando animales control de la misma edad.

Como se puede observar en la Tabla 4, a los 6 meses después de la irradiación, la producción de  $O_2^-$  en granulocitos de animales tratados es 1,9 veces superior a la correspondiente a granulocitos de animales control; esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). A los 12 meses después de la irradiación la diferencia en la producción de  $O_2^-$  entre células de animales tratados y de control se mantiene en 2,1 veces. Esta diferencia es también estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). Como se observa en la Tabla 4 el valor del tiempo de activación a los 12 meses después de la irradiación no muestra diferencias significativas entre los granulocitos de animales irradiados respecto a los animales control.

Los niveles de proteína determinados un año después de la irradiación (tabla 4), presentan un aumento de 1,4 veces respecto al control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ).

**Tabla 4.-** Producción de  $O_2^-$ , tiempo de activación y niveles de proteína en granulocitos de sangre periférica a los 6 y 12 meses después de la irradiación.

|                               |   | Tiempo postirradiación (meses) |             |
|-------------------------------|---|--------------------------------|-------------|
|                               |   | 6                              | 12          |
| nmol $O_2^-$ /min/ $10^6$ cel | C | 0,72±0,04                      | 1,10±0,04   |
|                               | I | 1,36±0,02                      | 2,30±0,40   |
| Tiempo activación             | C | --                             | 72,00±15,50 |
|                               | I | --                             | 85,70±15,60 |
| mg proteína/ $10^6$ cel       | C | --                             | 0,24±0,02   |
|                               | I | --                             | 0,33±0,02   |

C: control; I: irradiado. Valores expresan  $x \pm ES$ . N=3-7. Cada experimento corresponde a un ratón.

### III.5.2.- Niveles de producción de $O_2^-$ en granulocitos de LTMC.

Para analizar los parámetros que están implicados en los cambios funcionales observados en sangre periférica, establecimos cultivos de larga duración de médula ósea (LTMC) que permiten obtener poblaciones homogéneas de granulocitos, a partir de la activa proliferación de precursores hematopoyéticos adheridos al estroma celular.

Como ya indicamos en el apartado I.3.1., el cultivo de larga duración de médula ósea es un sistema de cultivo "in vitro" que mimetiza la hematopoyesis que se produce "in vivo" y permite estudiar el posible daño residual en las células hematopoyéticas y en el estroma hematopoyético.

Los granulocitos obtenidos del sobrenadante del cultivo de larga duración de médula ósea, se han utilizado, para determinar los niveles de producción de  $O_2^-$ .

Los cultivos se establecieron 6 y 12 meses después de la irradiación; paralelamente, se establecieron cultivos de médula ósea de animales control de la misma edad. Las determinaciones de los niveles del  $O_2^-$  se realizaron entre la 3ª y 6ª semana de cultivo.

Los resultados se expresan en la figura 8. Como se puede observar, a los 6 meses de la irradiación los granulocitos de animales irradiados muestran un aumento en

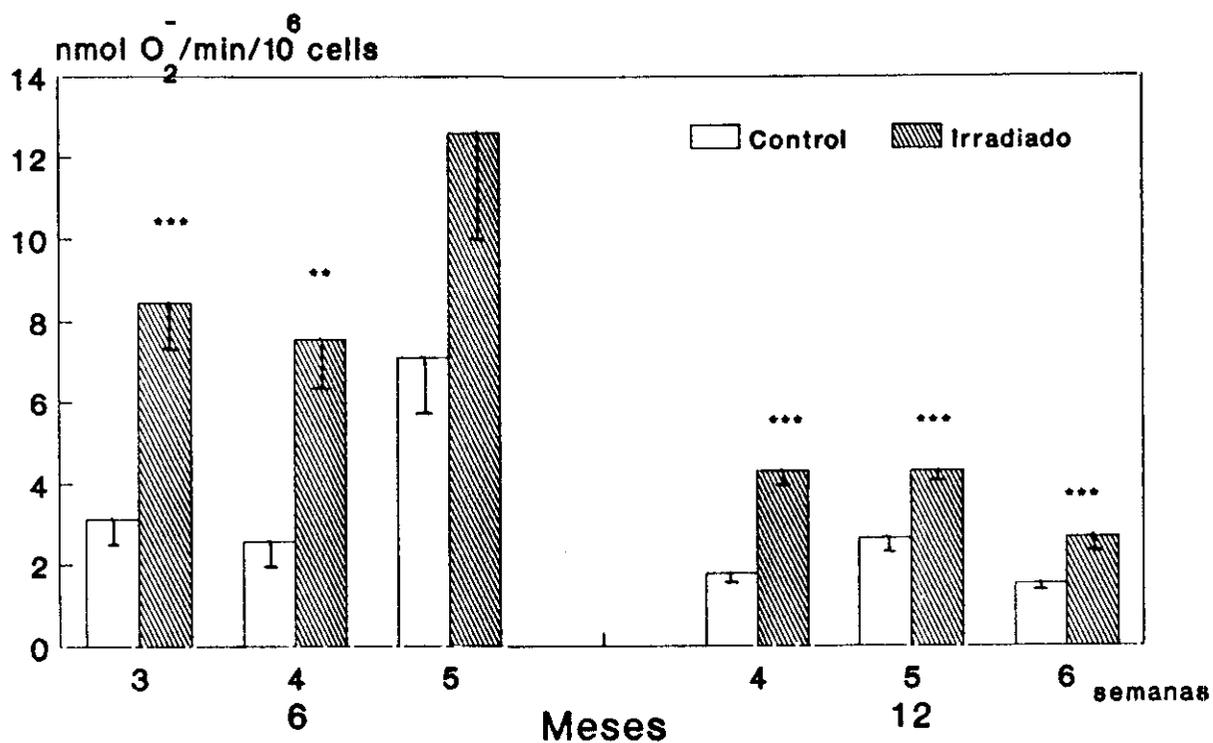
la producción de  $O_2^-$ , tanto en la 3ª como en la 4ª y 5ª semana de cultivo, respecto al control. Estos incrementos son significativos estadísticamente ( $p < 0,001$  y  $p < 0,01$ ) en la 3ª y 4ª semana de cultivo.

Los resultados obtenidos a los 12 meses de la irradiación, indican igualmente que los granulocitos de animales irradiados generan concentraciones de  $O_2^-$  superiores a las de animales control. Los incrementos observados son estadísticamente significativos ( $p < 0,001$ ) para todas las semanas de cultivo analizadas (4ª, 5ª y 6ª semana).

Los resultados obtenidos sobre el tiempo de activación figura 9, muestran que a los 6 meses de la irradiación los valores son superiores al control, aunque de una forma no significativa. A los 12 meses, los valores del tiempo de activación para los granulocitos de animales tratados son superiores a los control. Los incrementos encontrados son significativos a la 4ª y 5ª semana ( $p < 0,001$ ).

# Granulocitos

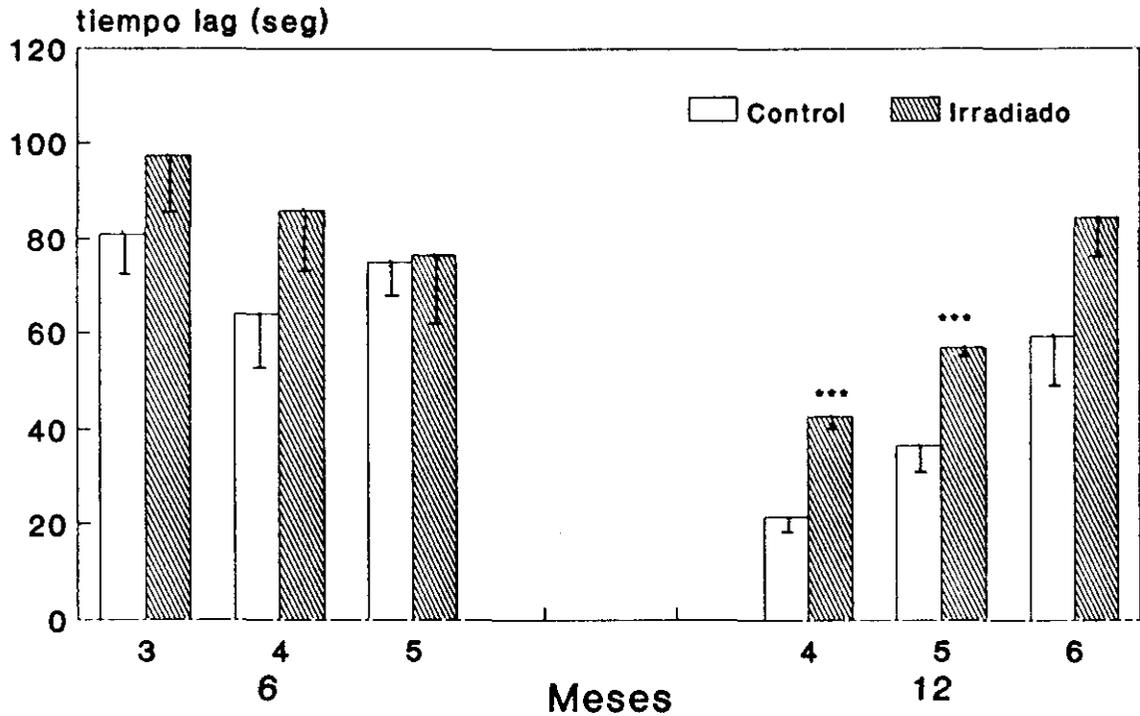
## Anión superóxido



**Fig.8.-** Producción de anión superóxido en granulocitos de LTBM a los 6 y 12 meses después de la irradiación a diferentes semanas de cultivo. Los valores expresan  $\bar{x} \pm ES$ . Número de experimentos 3-11 para cada punto. (\*\*\*)  $p < 0.001$ ; (\*\*)  $p < 0.01$ .

# Granulocitos

## Tiempo de activación (seg)



**Fig.9.-** Tiempo de activación en granulocitos de LTBMCM a los 6 y 12 meses después de la irradiación a diferentes semanas de cultivo. Los valores expresan  $\bar{x} \pm ES$ . Número de experimentos 3-11 para cada punto. (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

### III.5.3.- Actividad de HK, PFK y PK en granulocitos de LTBMC

Como ha sido indicado anteriormente, la glicolisis es la ruta fundamental de obtención de energía que poseen los granulocitos, de ahí la importancia del estudio de las enzimas claves de esta ruta. El estudio se ha realizado determinando los niveles de actividad enzimática de la Hexoquinasa, Fosfofructoquinasa y Piruvatoquinasa en granulocitos obtenidos a la 3ª semana del cultivo de larga duración de médula ósea, a diferentes tiempos postirradiación y a lo largo de un año.

Las figuras 10, 11 y 12 muestran los niveles de actividad obtenidos para las tres enzimas glicolíticas estudiadas (HK, PFK y PK) a diferentes tiempos postirradiación (1,5; 3; 6; y 12 meses).

Los niveles de actividad obtenidos para la HK (figura 10), indican un incremento en la actividad enzimática que se manifiesta a lo largo del periodo estudiado. Estas diferencias son significativas 3 y 6 meses después de la irradiación ( $p < 0,01$  y  $p < 0,01$  respectivamente).

La figura 11 muestra los niveles de actividad para la PFK a diferentes tiempos de la irradiación. Destaca un incremento a 1,5; 3 y 6 meses postirradiación, siendo estas diferencias estadísticamente significativas a los 3 y 6 meses ( $p < 0,01$  en ambos tiempos). A los 12 meses después de

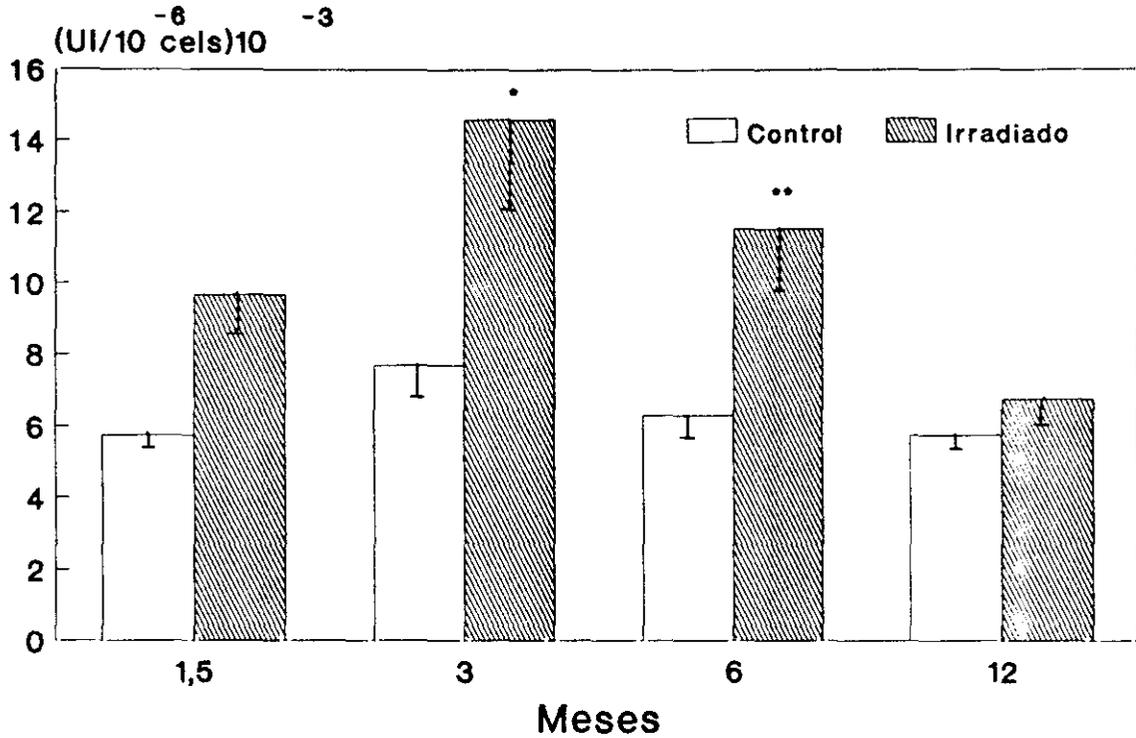
la irradiación, no existen diferencias en la actividad enzimática de animales tratados respecto al control.

Los niveles de actividad enzimática para la PK se indican en la figura 12. Podemos observar un incremento en los niveles de actividad a 1,5; 3 y 12 meses de la irradiación. Estos incrementos son estadísticamente significativos con valores de  $p < 0,05$  a los 1,5 y 3 meses de la irradiación y de  $p < 0,01$  a los 12 meses. Al contrario de lo observado a otros tiempos, la actividad PK a los 6 meses de la irradiación no muestra diferencias con el control.

De los resultados obtenidos respecto a los niveles de actividad enzimática de HK, PFK y PK, podemos indicar que, en los granulocitos obtenidos de animales irradiados existe un incremento neto en los niveles de actividad de las enzimas glicolíticas. Este incremento se mantiene a los 12 meses de la irradiación en el caso de la PK, por el contrario las actividades HK y PFK no muestran diferencias respecto al control para este mismo periodo de tiempo.

# Granulocitos

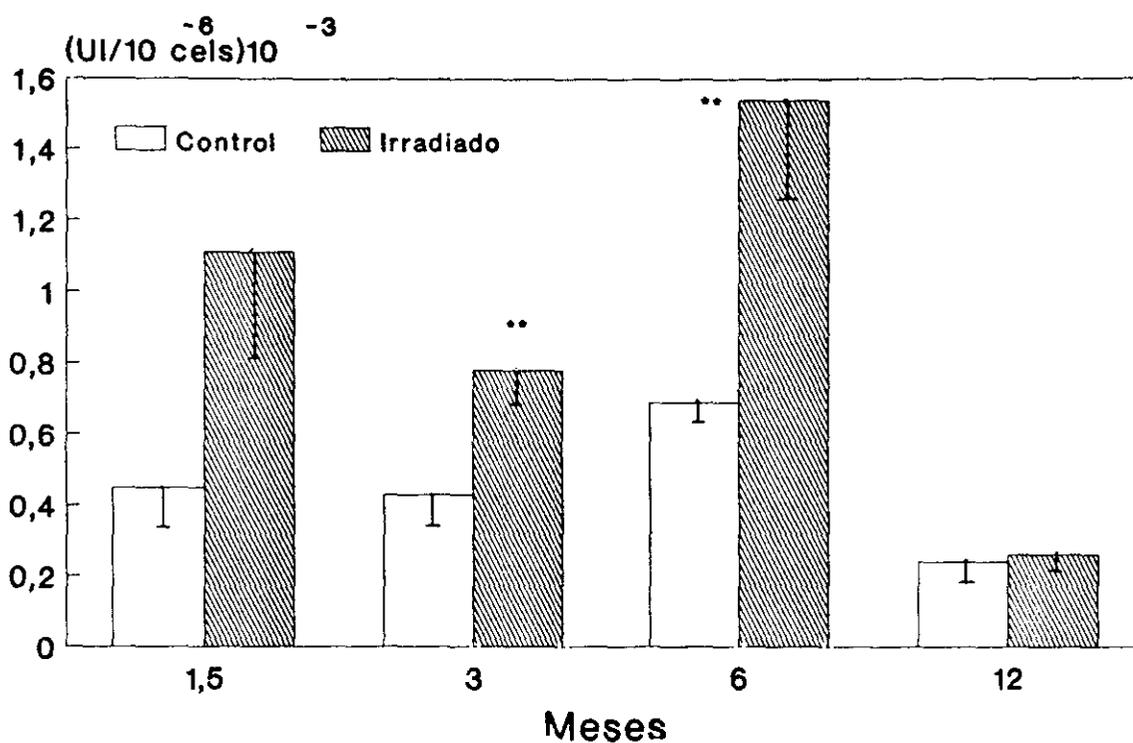
## Actividad Hexoquinasa



**Fig.10.-** Actividad hexoquinasa en granulocitos de LTBMC a diferentes tiempos después de la irradiación a la 3ª semana de cultivo. Los valores expresan  $\bar{x} \pm ES$ . Número de experimentos 3-6 para cada punto. (\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.01$

# Granulocitos

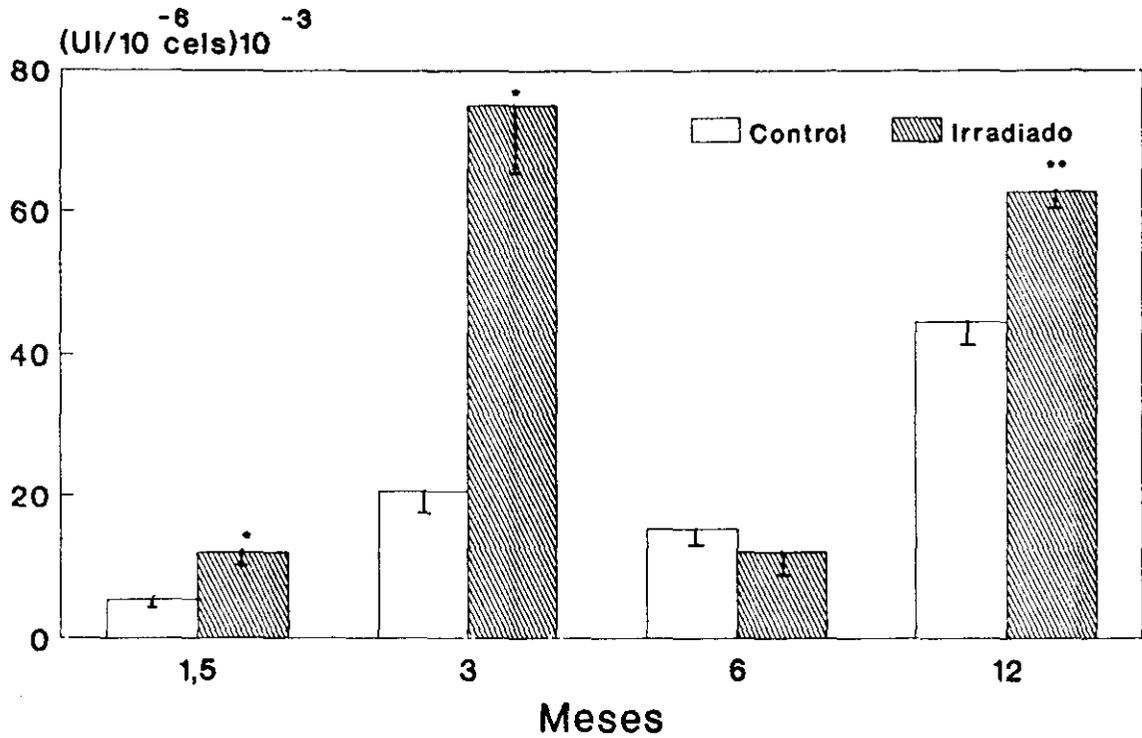
## Actividad Fosfofructoquinasa



**Fig.11.-** Actividad fosfofructoquinasa en granulocitos de LTBM a diferentes tiempos después de la irradiación a la 3ª semana de cultivo. Los valores expresan  $\bar{x} \pm ES$ . Número de experimentos 3-6 para cada punto. (\*\*)  $p < 0.01$

# Granulocitos

## Actividad Piruvatoquinasa



**Fig.12.-** Actividad piruvatoquinasa en granulocitos de LTBMC a diferentes tiempos después de la irradiación a la 3ª semana de cultivo. Los valores expresan  $\bar{x} \pm ES$ . Número de experimentos 3-6 para cada punto. (\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.01$ .

**III.5.4.- Análisis cuantitativo y cualitativo de proteínas de granulocitos de LTBM. Electroforesis bidimensional.**

Los resultados obtenidos respecto a la concentración de proteínas en los granulocitos del cultivo de larga duración de médula ósea se indican en la figura 13. Como se puede observar existe un incremento en la concentración de proteínas en los granulocitos de animales irradiados respecto al control. Este incremento se observa para todos los tiempos postirradiación estudiados y para todas las semanas de cultivo. Estas diferencias son más acentuadas a los 6 meses después de la irradiación en la 4ª y 5ª semana de cultivo, en las que el incremento en la concentración de proteínas alcanza un valor 4 veces superior al control.

Con el fin de comprobar si este aumento en la concentración de proteína se debía a la expresión generalizada de las proteínas o, por el contrario, se manifestaba un aumento específico en la expresión de determinadas proteínas, realizamos una electroforesis bidimensional.

La electroforesis sobre gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (en presencia de SDS) separa las proteínas en disolución según sus masas moleculares. Por otro lado, las proteínas también se pueden separar electroforéticamente según sus puntos isoeléctricos, lo que

se denomina isoelectroenfoque (IEF).

La combinación de estas técnicas permite obtener una distribución bidimensional de las proteínas con un alto poder de resolución.

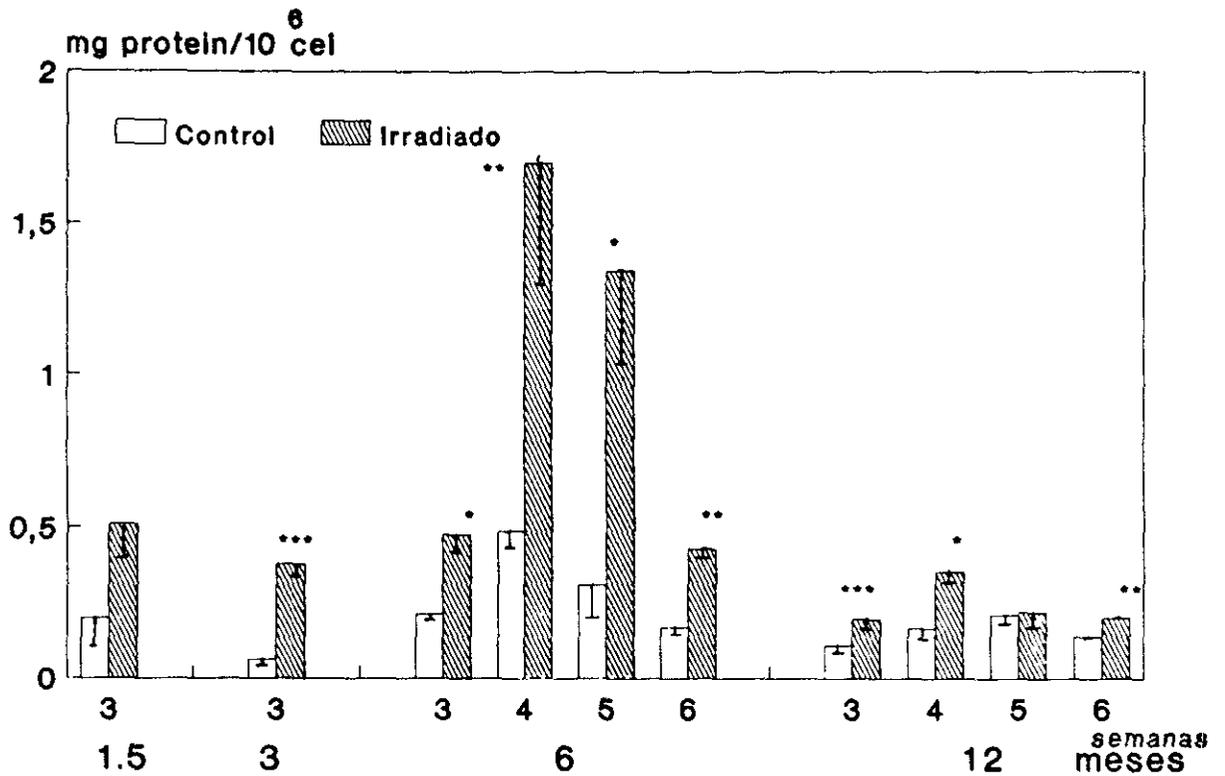
La electroforesis se realizó según se indica en II.2.14. Para ello, se utilizaron granulocitos lisados del sobrenadante del LT BMC a la 4ª semana de cultivo, establecidos 6 meses después de la irradiación y células lisadas de LT BMC de animales normales. Los geles se cargaron con la misma cantidad de proteína, tanto para la muestra control como para la muestra de animales irradiados. Concretamente, se cargaron 111  $\mu\text{g}$  de proteína equivalentes a  $358 \times 10^3$  células de la muestra control y a  $186 \times 10^3$  células de la tratada.

La figura 14, muestra el resultado de la segunda dimensión de granulocitos correspondientes a animales control (A) e irradiado (B).

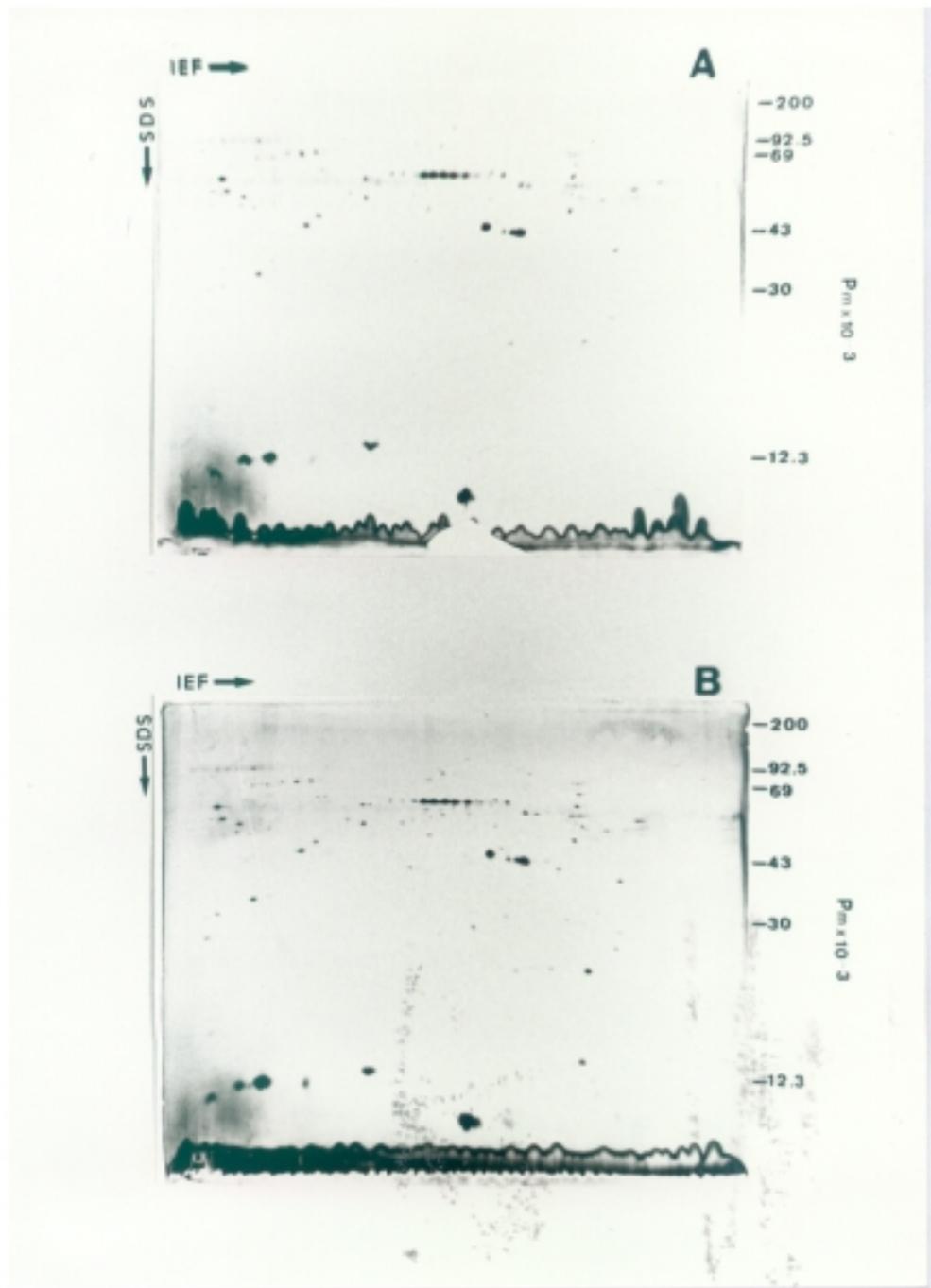
Como se puede observar, en las zonas de Pm próximos a los valores que poseen las enzimas glicolíticas de diversas especies de mamíferos, comprendidos entre  $57-62 \times 10^3$  D para la PK (Kahn y Marie, 1982);  $85 \times 10^3$  D para la PFK (Kenneth, 1982) y  $104-105 \times 10^3$  D para la HK (Fornaini y col., 1982) y de las enzimas implicadas en la producción de  $O_2^-$ , comprendidos entre  $43$  y  $69 \times 10^3$  D (Segal, 1989) no se aprecian diferencias en la expresión de estas enzimas en granulocitos de ambos tipos de animales.

# Granulocitos

## Proteínas



**Fig.13.-** Concentración de proteínas en granulocitos obtenidos del LTBMC a diferentes tiempos después de la irradiación y diferentes semanas de cultivo. Los valores expresan  $\bar{x} \pm ES$ . Número de experimentos 3-15 para cada punto. (\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.01$ ; (\*\*\*)  $p < 0.001$



**Fig.14.-** Electroforesis bidimensional (IEF, SDS) en granulocitos obtenidos de LTBMC a los 6 meses después de la irradiación y 4ª semana de cultivo. A: Control; B: Irradiado.

### **III.6.- ANALISIS COMPARATIVO DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ESTUDIADAS EN MEDULA OSEA, ERITROCITOS Y GRANULOCITOS.**

Dado que los niveles de actividad enzimática son procesos complejos que responden a diversos factores, hemos analizado las actividades enzimáticas obtenidas en cada tejido estudiado. En la literatura, se han descrito las modificaciones que manifiestan las enzimas en su actividad según la edad celular y los procesos de diferenciación celular de diferentes tejidos (Nijhof y col.,1984; Gaitán y col.,1989; Zimran y col.,1990). Con el fin de comprobar si la radiación pudiera modificar el patrón de diferenciación de las distintas enzimas estudiadas en los diferentes tejidos, analizamos los niveles de actividad obtenidos según el tejido y enzima estudiada.

Al comparar los niveles de actividad, obtenidos para cada enzima y para cada tejido estudiado, hemos observado la existencia de diferencias en dichos niveles. Estas diferencias pueden ser observadas en función de la edad del animal y según el tejido estudiado.

Las tablas 5 y 6, resumen los valores de actividad enzimática, expresados como (UI/10<sup>6</sup> cél) de HK, PFK y PK para los animales control e irradiado de los distintos tipos celulares analizados.

Nuestras determinaciones de los niveles de actividad

HK indican que, la actividad de esta enzima es superior en eritrocitos que en células de médula ósea total. El resultado encontrado por nosotros, puede ser justificado por la necesidad de incrementar los niveles de G6P para iniciar la ruta de las pentosas fosfato y obtener el poder reductor necesario para la célula.

El aumento observado en los niveles de actividad HK al comparar células de médula con granulocitos, podría justificarse por la necesidad de un incremento en los niveles de G6P para seguir la ruta de las pentosas fosfato y obtener NADPH necesario para la actividad del sistema oxidasa, responsable de la producción de  $O_2^-$ .

Los valores de actividad PFK y PK disminuyen de médula ósea a eritrocitos para animales control y tratados. Este resultado esta de acuerdo con la disminución descrita para las enzimas glicolíticas durante los procesos de diferenciación celular en el sistema hematopoyético de diversas especies (Rodríguez-Horche y col.,1988; Gaitán y col.,1989).

Los niveles de actividad PFK y PK aumentan de médula ósea a granulocitos. Este aumento está asociado a la necesidad energética de los granulocitos para cumplir la fagocitosis, proceso en el que la glicolisis adquiere especial relevancia (Lane y Lamkin,1984).

Es de destacar que, las modificaciones observadas en

los niveles de actividad de las 3 enzimas estudiadas a lo largo de la diferenciación del sistema hematopoyético hacia las líneas granulocítica y eritroide son cuantitativamente equivalentes entre animales control e irradiado.

Al analizar los resultados obtenidos entre los 3 y 12 meses tabla 5 y 6 observamos un aumento significativo de la actividad PK con la edad del animal tanto en médula ósea ( $p < 0,05$ ) como en granulocitos ( $p < 0,01$ ) tanto en control como en tratados. Mientras que, los niveles de actividad HK y PFK de estas mismas poblaciones celulares, no muestran diferencias con la edad.

Otras modificaciones, observadas en la médula ósea con la edad son el aumento en la celularidad y en el número de CFC-GM por fémur, así como una menor proporción de precursores CFC-GM en fase de síntesis (Tejero y col., 1989).

El aumento en los niveles de PK de granulocitos según la edad podría asemejarse al aumento en la actividad de las enzimas lisosómicas observado en macrófagos peritoneales de ratón en función de la edad del animal (Heidrick, 1972). Por lo que, el incremento en la actividad PK en estas células puede ser un reflejo de los cambios descritos en diversos parámetros fisiológicos y metabólicos de células del sistema inmune (De la Fuente, 1985).

En relación a los eritrocitos (tabla 5) podemos

indicar la existencia de leves modificaciones en la actividad HK, PFK y PK en función de la edad.

De los resultados analizados en este apartado, podemos indicar que la irradiación no altera sustancialmente el patrón de modificación de las actividades enzimáticas estudiadas en función de los distintos tejidos analizados y edad de los animales.

**Tabla 5.-** Niveles de actividad enzimática (HK, PFK y PK) en médula ósea, eritrocitos y granulocitos de animales control. Los valores se expresan en (UI/10<sup>6</sup> cel)10<sup>-3</sup>.

**HK**

| Tiempo (meses) | Médula ósea | Eritrocitos | Granulocitos |
|----------------|-------------|-------------|--------------|
| 1              | 0,45±0,10   | ---         | ---          |
| 1,5            | ---         | ---         | 5,75±0,50    |
| 3              | 0,46±0,09   | 2,25±0,26   | 7,69±0,90    |
| 6              | 0,40±0,05   | 1,94±0,53   | 6,31±0,60    |
| 12             | 0,50±0,05   | 1,08±0,22   | 5,75±0,46    |
| 15             | ---         | 1,42±0,18   | ---          |

**PFK**

|     |           |            |           |
|-----|-----------|------------|-----------|
| 1   | 0,15±0,09 | ---        | ---       |
| 1,5 | ---       | ---        | 0,45±0,10 |
| 3   | 0,15±0,03 | 0,02±0,003 | 0,43±0,09 |
| 6   | 0,27±0,06 | 0,05±0,005 | 0,69±0,06 |
| 12  | 0,28±0,08 | 0,07±0,004 | 0,24±0,07 |
| 15  | ---       | 0,03±0,002 | ---       |

**PK**

|     |            |           |            |
|-----|------------|-----------|------------|
| 1   | 8,00±0,90  | ---       | ---        |
| 1,5 | ---        | ---       | 5,40±0,10  |
| 3   | 4,00±0,90  | 3,85±0,86 | 20,50±3,20 |
| 6   | 12,80±1,40 | 2,97±0,65 | 15,20±2,60 |
| 12  | 16,80±6,00 | 3,00±0,01 | 44,50±3,20 |
| 15  | ---        | 2,09±0,27 | ---        |

**Tabla 6.-** Niveles de actividad enzimática (HK, PFK y PK) en médula ósea, eritrocitos y granulocitos de animales irradiados. Los valores se expresan en  $(UI/10^6 \text{ cel})10^{-3}$

**HK**

| Tiempo (meses) | Médula ósea | Eritrocitos | Granulocitos |
|----------------|-------------|-------------|--------------|
| 1              | 0,35±0,005  | ---         | ---          |
| 1,5            | ---         | ---         | 9,70±1,00    |
| 3              | 0,37±0,004  | 1,52±0,04   | 14,60±1,40   |
| 6              | 0,32±0,060  | 1,86±0,58   | 12,00±1,60   |
| 12             | 0,67±0,090  | 1,22±0,22   | 6,70±0,56    |
| 15             | ---         | 1,49±0,08   | ---          |

**PFK**

|     |            |            |           |
|-----|------------|------------|-----------|
| 1   | 0,09±0,010 | ---        | ---       |
| 1,5 | ---        | ---        | 1,11±0,29 |
| 3   | 0,14±0,040 | 0,02±0,003 | 0,78±0,09 |
| 6   | 0,20±0,035 | 0,08±0,002 | 1,58±0,26 |
| 12  | 0,15±0,045 | 0,06±0,009 | 0,26±0,03 |
| 15  | ---        | 0,03±0,003 | ---       |

**PK**

|     |            |           |            |
|-----|------------|-----------|------------|
| 1   | 3,05±0,20  | ---       | ---        |
| 1,5 | ---        | ---       | 12,00±1,40 |
| 3   | 2,30±0,60  | 1,87±0,30 | 75,00±9,00 |
| 6   | 13,00±1,10 | 2,51±0,25 | 12,00±2,90 |
| 12  | 30,00±7,00 | 2,79±0,89 | 62,00±1,78 |
| 15  | ---        | 1,88±0,33 | ---        |

### **III.7.- IMPLICACIONES DEL ESTROMA EN LA HEMATOPOYESIS DEL RATON.**

#### **III.7.1.- Cuantificación de células en el sobrenadante del LT BMC. Aspectos morfológicos del estroma**

Con objeto de analizar en qué medida los animales que expresan daño residual manifestado por una disminución de precursores hematopoyéticos, generan estromas funcionalmente activos, desde el punto de vista hematopoyético se establecieron LT BMC con la médula ósea de animales irradiados y animales control a distintos tiempos postirradiación.

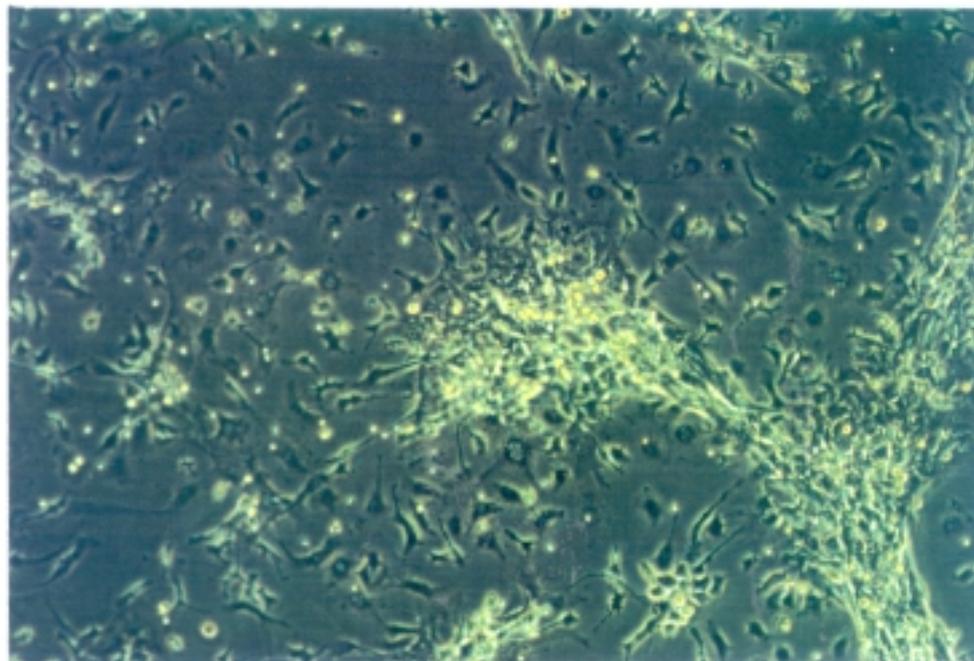
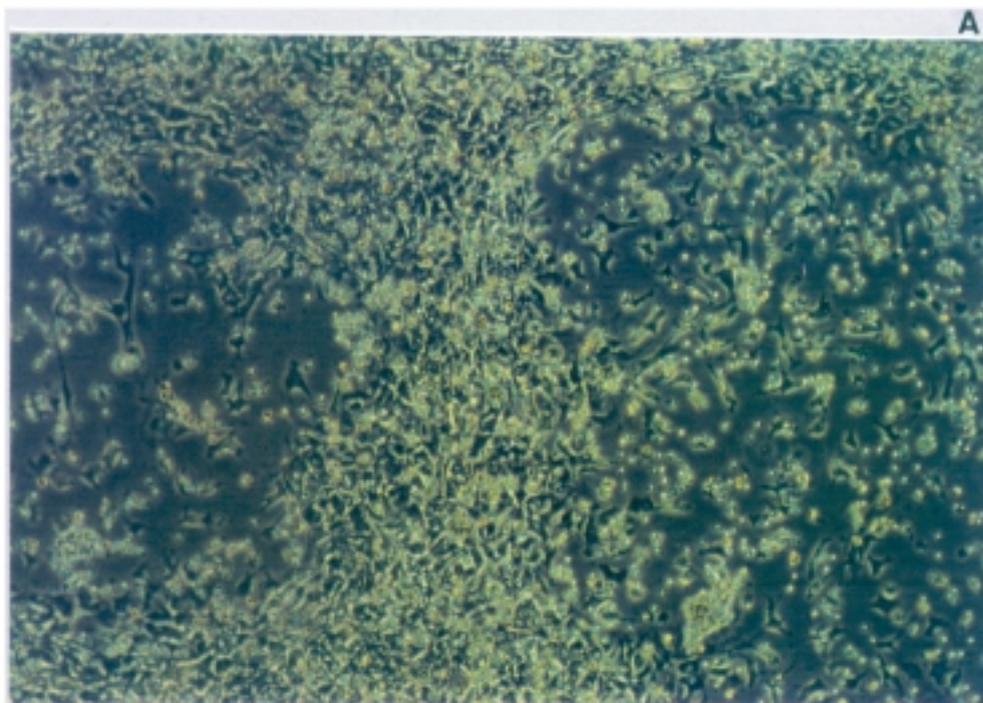
La observación de los LT BMC mostró que la formación de la capa adherente (estroma) en cultivos procedentes de animales irradiados, no es completa respecto a los cultivos establecidos con médula ósea de ratón control, presentando una reducción en el número de áreas hematopoyéticas activas. Estas características morfológicas se mantienen a lo largo de todas las semanas de cultivo y se observan para todos los tiempos postirradiación analizados.

Las figuras 15 y 16 muestran el aspecto de la capa adherente del LT BMC de animales control (A) e irradiados (B) a los 6 y 12 meses después de la irradiación. La fotografía de los 6 meses ( fig.15) fué tomada a la 3ª semana de cultivo; mientras que la fig. 16 muestra el aspecto del estroma a los 12 meses postirradiación en la

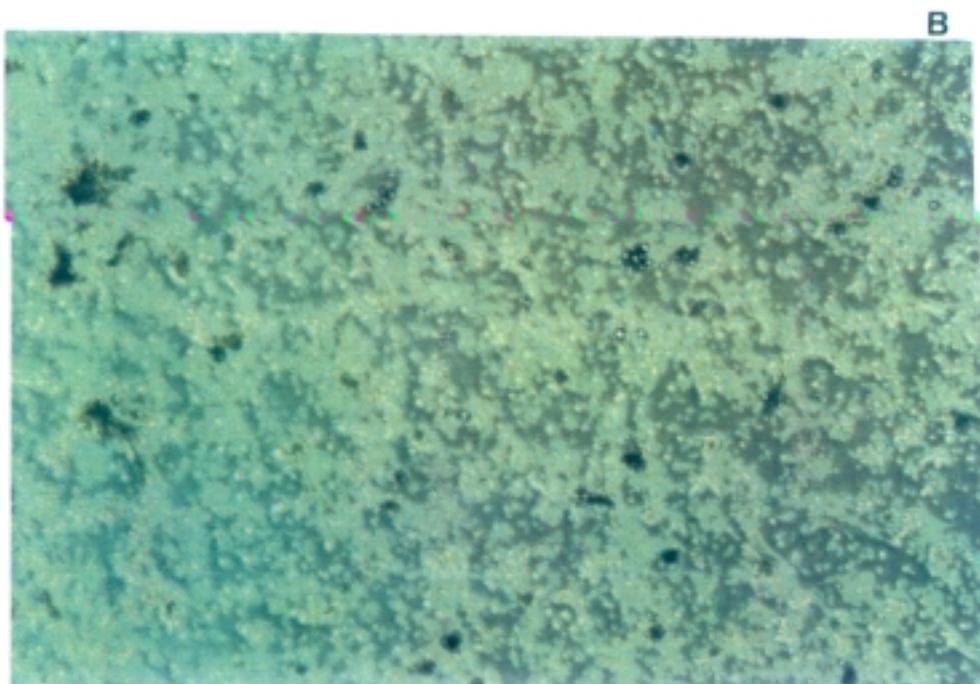
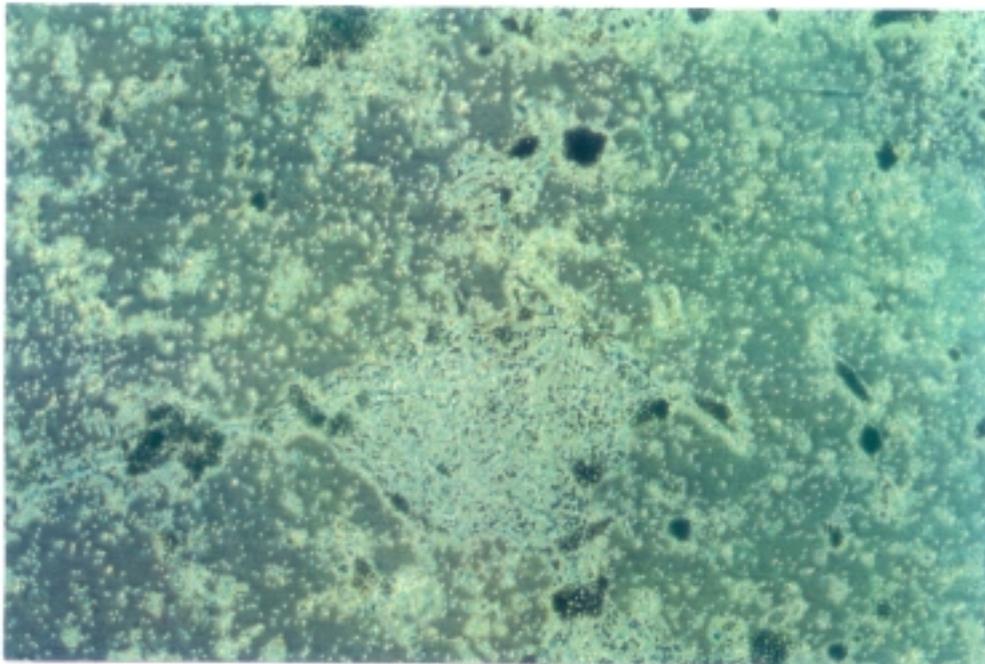
7ª semana de cultivo.

La figura 17 muestra la producción de células en el sobrenadante de los cultivos de larga duración de médula ósea de animales control e irradiados. Es de destacar la menor producción de células maduras (granulocitos) de los cultivos de animales irradiados respecto a la producción de células de animales control. El efecto se mantiene apreciable a los 12 meses después de la irradiación.

Así mismo, como se indica en la figura 17, se aprecia una tendencia a que la producción de células aumente en función de la edad del cultivo y del animal. Esta tendencia se observa tanto en los cultivos control como en los tratados. No obstante, datos recientes obtenidos en nuestro laboratorio, indican que a partir de la 6ª semana de cultivo el número de células del sobrenadante de animales control e irradiados manifiesta una tendencia descendente.



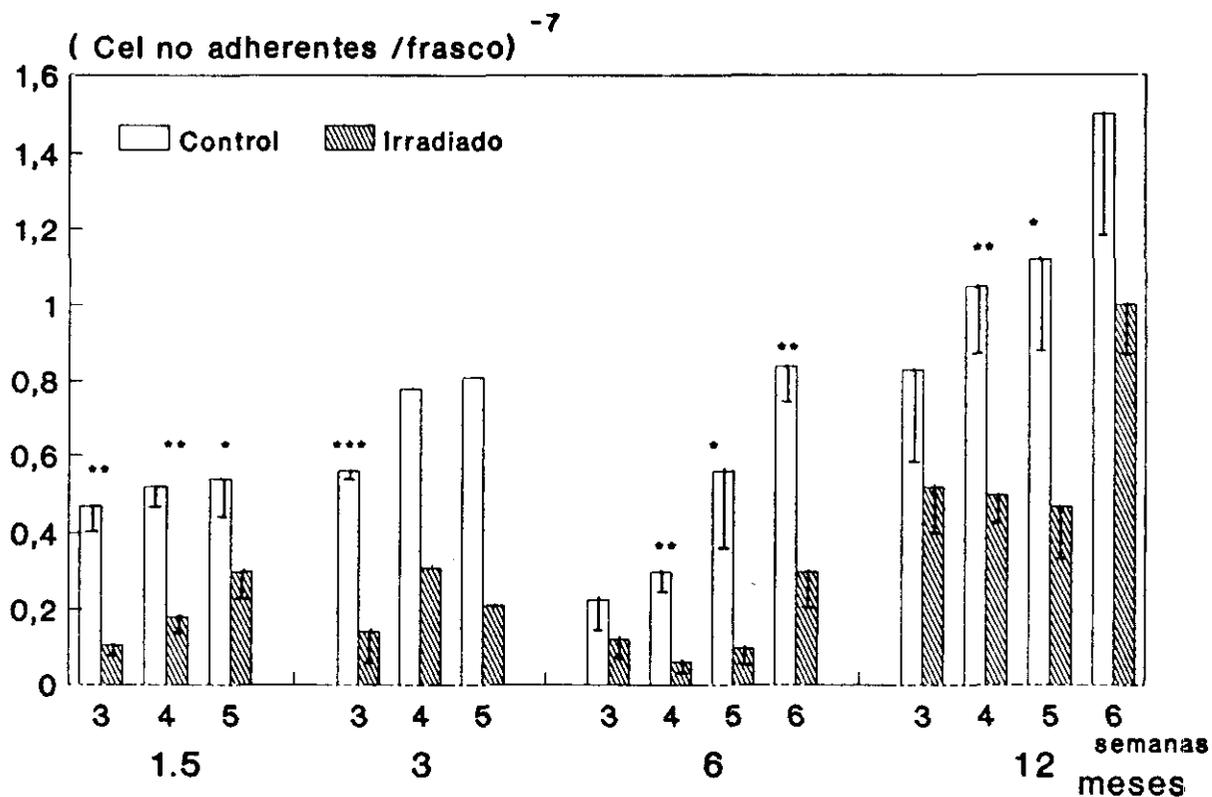
**Fig.15.-** Microfotografía (x100) en contraste de fases de la capa adherente del LTBMC a los 6 meses después de la irradiación. La imagen fué tomada a la 3ª semana de cultivo. A:Control; B:Irradiado.



**Fig.16.-** Microfotografía (x100) en contraste de fases de la capa adherente del LTBMC a los 12 meses después de la irradiación. La imagen fué tomada a la 7<sup>a</sup> semana de cultivo A:Control; B:Irradiado.

# Estroma hematopoyético

## Células no adherentes



**Fig.17.-** Producción de granulocitos en el sobrenadante de LTBM a diferentes tiempos después de la irradiación y distintas semanas de cultivo. Los valores expresan  $x \pm ES$ . Número de experimentos 3-15 para cada punto. (\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.01$ ; (\*\*\*)  $p < 0.001$

### III.7.2.- Detección de CSFs en el sobrenadante del LTBMC

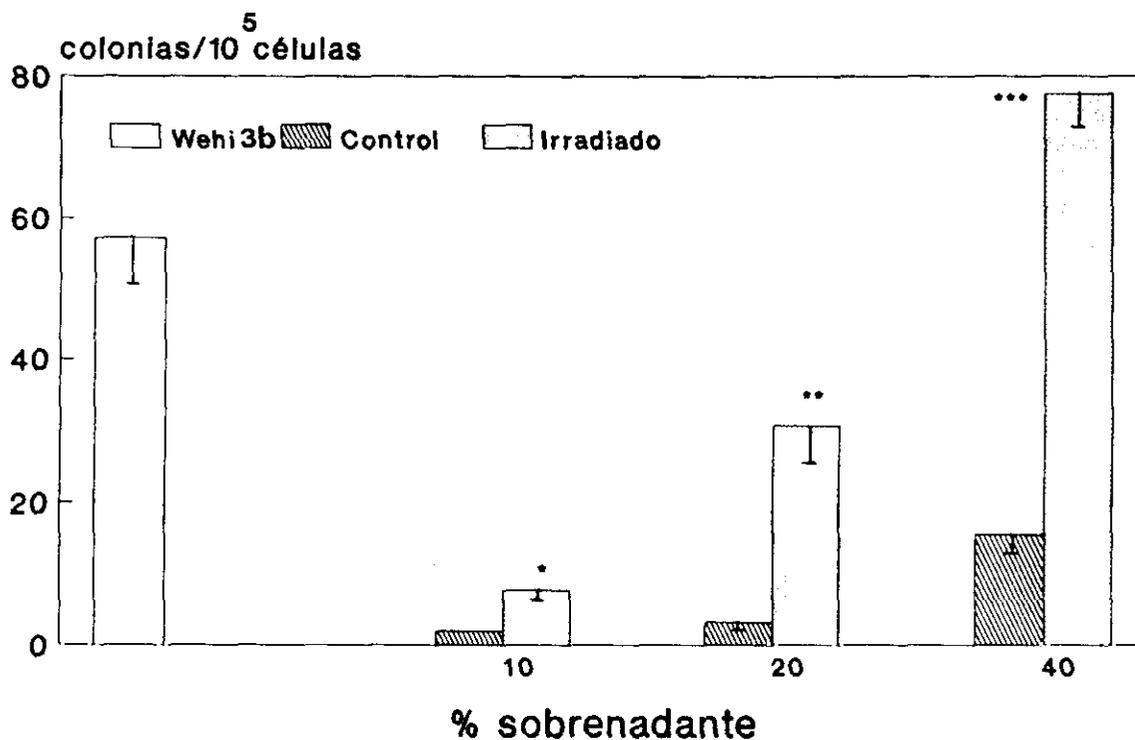
Para determinar la presencia de factores estimulantes del crecimiento hematopoyético en el sobrenadante de los cultivos de larga duración establecidos a partir de animales control e irradiado, analizamos la estimulación del precursor CFC-GM mediante cultivo "in vitro" en matriz semisólida de agar (II.2.6).

Los ensayos se realizaron, estableciendo cultivos con distintas concentraciones (10%, 20% y 40%) del sobrenadante de los LTMBC de animales irradiados. Paralelamente, y como control, se establecieron cultivos con el 10% de medio condicionado de la línea celular Wehi-3b fuente de IL-3 como factor estimulador de colonias.

Los resultados, representados en la figura 18 muestran el número de colonias originadas en función de la fuente de CSFs utilizada. Como se puede observar, los sobrenadantes de LTMBC establecidos con médula ósea de ratones irradiados 12 meses antes son muy activos, mientras que los sobrenadantes de los cultivos de ratón control presentan una escasa capacidad de estimular la formación de colonias GM. Las colonias obtenidas fueron pequeñas y compactas, el análisis mediante tinción con May-Grunwald Giemsa, indicó que estaban formadas por granulocitos y macrófagos.

# Estroma hematopoyético

## Expresión precursor CFC-GM



**Fig.18.-** Expresión del precursor CFC-GM utilizando como factor estimulante de colonias, los sobrenadantes (libres de células) del LTBM establecidos a los 12 meses después de la irradiación y 4<sup>a</sup> semana de cultivo. Los valores expresan  $\bar{x} \pm ES$ . (\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.01$ ; (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

Para comprobar que los factores (CSFs) presentes en el sobrenadante de los LTBM de animales irradiados eran los responsables de la activación de la producción de  $O_2^-$  en los granulocitos, realizamos ensayos que consistieron en la incubación de los granulocitos obtenidos del LTBM de animales control con el sobrenadante de los LTBM de animales irradiados 6 meses antes. Las incubaciones se realizaron durante 3 h a 37°C, siendo la concentración de células de  $2 \times 10^5$  cel/ml de sobrenadante. Esta concentración, corresponde por término medio, a la que se encuentran las células en el medio de cultivo a los 6 meses postirradiación (fig. 15).

Los resultados (fig.19) demuestran que los granulocitos obtenidos de LTBM normales generan niveles de  $O_2^-$  significativamente superiores ( $p < 0,01$ ) cuando permanecen en contacto con sobrenadantes correspondientes a LTBM establecidos con médula ósea de animales irradiados 6 meses antes.

# Estroma hematopoyético

## Cuantificación anión superóxido

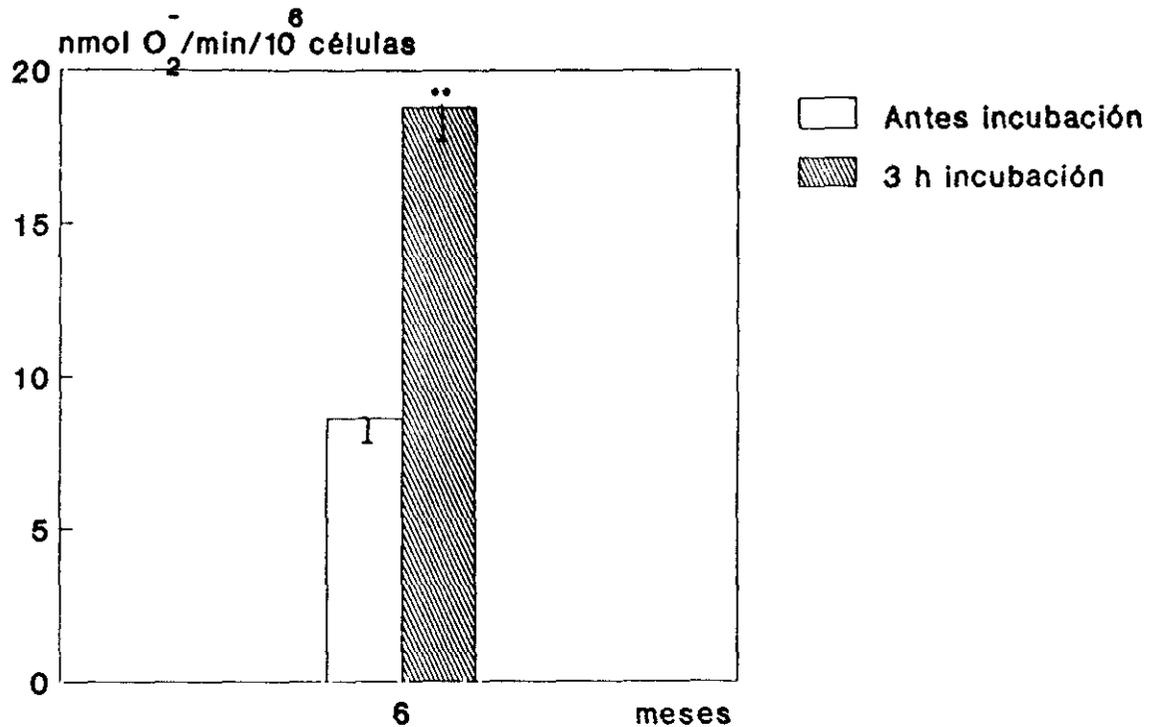


Fig.19.-Producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en granulocitos obtenidos de cultivo control, incubados con el sobrenadante de LTBM a los 6 meses después de la irradiación. Los datos expresan  $\bar{x} \pm \text{ES}$ . (\*\*)  $p < 0.01$

## **DISCUSSION**

#### **IV.- DISCUSION**

##### **IV.1.- ESTUDIO DEL DAÑO RESIDUAL EN POBLACIONES CELULARES HEMATOPOYETICAS.**

El primer objetivo de esta memoria ha sido cuantificar el daño hematopoyético residual, manifestado a través de alteraciones en el número de células correspondientes a los distintos compartimentos hematopoyéticos después de una irradiación subletal con 5 Gy.

Tal como ha sido anteriormente descrito, el daño hematopoyético producido por la radiación se manifiesta en una reducción temprana en el tamaño de los compartimentos proliferativos. Como consecuencia de este daño, las células madre hematopoyéticas supervivientes, aumentan el índice proliferativo para reconstituir el sistema hematopoyético (Lajtha,1982), de tal manera, que el número de células en sangre periférica alcanza valores normales transcurrido un tiempo después de la irradiación próximo al mes (Hendry y col,1984; Testa y col,1985; Xu y col,1986). Sin embargo, numerosos estudios en pacientes y en sistemas experimentales, muestran la evidencia de un daño residual en la población de precursores hematopoyéticos después de un tratamiento citotóxico (Testa y col.,1985). Así, se han descrito deficiencias en el número y en la capacidad de automantenimiento de células madre hematopoyéticas (CFU-S), en el número de precursores (CFC-GM) y en el estado proliferativo de ambos tipos celulares después de una irradiación (Testa y col,1985; Tejero y col,1988). Un hecho

común en estos estudios es que el daño es permanente y se mantiene a lo largo del tiempo (Testa y col,1985).

Nuestros resultados sobre el estado del sistema hematopoyético después de una irradiación con 5 Gy muestran, respecto a los parámetros determinados en sangre periférica (hematocrito y células nucleadas) y número total de células nucleadas/femur, la existencia de una recuperación total, 1 mes después de la irradiación (Tabla 1).

Este resultado está de acuerdo con la recuperación descrita en ratones tratados con dosis y protocolos de irradiación comprendidos entre 1,5 y 5 Gy (Necas y Znojil, 1988; Xu y col.,1983; Schofield y Dexter,1981). Esta recuperación se produce también en diversos modelos experimentales con drogas citotóxicas (Xu y col,1986). Otros resultados han mostrado que, en tiempos más tempranos se evidencia una recuperación exponencial de la lesión producida por la irradiación (Grande y col.,1990).

En relación con la edad del animal, tanto en control como en irradiado, podemos indicar una tendencia a aumentar el número de células nucleadas por fémur desde las 12 semanas hasta las 48 semanas de edad y una tendencia a disminuir el número de células nucleadas en sangre periférica. Estos resultados coinciden con los descritos por Tsuboi y col., (1991) en ratones SAM-P, los cuales presentan el proceso de envejecimiento acelerado.

Como se observa en la tabla 1, existe una disminución en el número de precursores CFC-GM después de una dosis subletal de rayos X (5 Gy), que se mantiene a lo largo de un año postirradiación. Esta disminución es similar al descenso descrito a lo largo de 10 meses después del tratamiento en el número de precursores CFC-GM de la cepa B<sub>6</sub>D<sub>2</sub>F<sub>1</sub> de ratón, irradiado con dosis repetidas de 4,5 Gy de rayos X (Tejero y col,1988). También, se ha observado en modelos experimentales en los que los animales han sido tratados con las dosis máximas toleradas de las drogas citotóxicas BCNU (bis-cloroetil nitrosourea) y ciclofosfamida, a lo largo de 8 meses después del tratamiento (Xu y col,1986). Para estas mismas drogas es conocido el daño hematopoyético residual que producen no sólo en el número de precursores CFC-GM sino también en la capacidad de automantenimiento de la célula madre (CFU-S) (Testa y col.,1989).

Reducciones similares, se han descrito en el número de otros precursores de la línea mieloide como CFU-E y BFU-E (Testa y col.,1985) y para el precursor de la línea linfoide (CFC-BL) (Hendry y col,1984).

Los resultados presentados en este apartado, sobre la medida de diferentes parámetros celulares de la médula ósea y sangre periférica de ratón, nos indican que, tras una irradiación con 5 Gy, la médula manifiesta un daño residual en la población de precursores mieloides CFC-GM, que se mantiene al menos un año después de la irradiación. Sin

embargo y dado que el número de células nucleadas en sangre periférica y en médula se recupera, podemos considerar que, en analogía a lo descrito con otras dosis, tipos de irradiación y cepas de ratones (Hendry y col.,1984; Tejero y col.,1988; Testa y col.,1989) la población de precursores hematopoyéticos queda sometida a mecanismos compensatorios de regulación (aumento en el número de divisiones, incrementos en el número de precursores en fase de síntesis) dirigidos a neutralizar el daño hematopoyético residual.

En el siguiente apartado, se analiza en qué medida este cambio en la regulación afecta al conjunto de las células hematopoyéticas que componen la médula ósea.

#### **IV.2.- ESTUDIO DE LA FUNCION Y METABOLISMO EN CELULAS DE MEDULA OSEA.**

##### **IV.2.1.- Unión de transferrina a células de médula ósea**

Dado que la expresión del receptor de transferrina está asociada a la proliferación del sistema hematopoyético (Ho y col,1989). El estudio de las alteraciones inducidas en este parámetro nos indicará la existencia de posibles cambios en la cinética del compartimento de proliferación y tránsito, mayoritario en la médula ósea.

La transferrina y la lactoferrina, proteínas capaces

de unir  $\text{Fe}^{+3}$ , han sido descritas como antioxidantes en el organismo. Esta característica deriva de su capacidad de resistir el ataque oxidativo producido por agentes oxidantes (  $\text{HOCl}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y peróxidos orgánicos) y de la capacidad que poseen de reaccionar con el  $\text{Fe}^{+3}$  y así impedir las reacciones de radicales libres que dependen de este elemento (Halliwell y col,1988). Por ello, la molécula de transferrina puede proteger a la célula del ataque de los radicales libres producidos tras la irradiación.

Como se observa en la figura 1, la representación de Scatchard de los valores de unión específica se ajusta a una línea recta. Este patrón de comportamiento es común para todos los tiempos postirradiación estudiados, tanto en controles como en células procedentes de animales tratados. Este tipo de ajuste, indica la presencia de un único sitio de unión para los receptores de Tf en células de médula de ratón.

Los valores de  $K_a$  obtenidos por nosotros (tabla 2) guardan similitud con los valores descritos para los sitios de unión de alta afinidad en células de médula ósea de rata en donde se han descrito dos sitios de unión, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad (Mendieta, J.,1990).

Por otro lado, los valores de  $B_{\text{max}}$  (tabla 2) en células de médula ósea de ratón, tanto controles como tratados, son inferiores a los descritos para células de la línea eritroide de ratón (Nunez y col.,1977). Esta

diferencia en los valores de Bmax, puede ser atribuida al elevado número de receptores de transferrina que necesita la línea eritroide, dado su papel esencial en la síntesis de Hb. Además, el número de receptores por célula tanto en el control como en el irradiado es 3,6 veces inferior al descrito para células de médula de rata (Mendieta, J,1990).

Estos resultados están de acuerdo con los descritos para células eritroides de hígado fetal de ratón y para las células eritroides de rata, en donde los valores de Bmax así como el número de receptores por célula es bajo (Iacopetta y col.,1982).

Un aumento en el número de receptores de Tf se ha descrito en eritroblastos de pacientes anémicos que no han sido tratados con hierro, mientras que, el número de éstos no cambia si a los pacientes se les administra hierro (Muta y col.,1987), lo que sugiere que la expresión del receptor de transferrina está sometido a un proceso de "down regulation". En nuestro caso, y dado que no se modifica el número de receptores en las células de animales tratados, podemos afirmar que, después de la irradiación no se altera la regulación de la expresión de este receptor.

En resumen, los resultados obtenidos indicados en la Tabla 2, muestran que no se producen modificaciones significativas en la Bmax y Ka en la médula ósea de animales que expresan daño residual y por tanto no hay

cambios a través del receptor de transferrina en la incorporación de  $Fe^{+3}$ .

#### **IV.2.2.- Actividad de HK, PFK y PK en células de médula ósea**

Como ya hemos indicado en el apartado I.2.4, la ruta metabólica fundamental de la mayoría de los tejidos de mamíferos es la glicolisis. Esta ruta adquiere especial importancia en las células de médula ósea, en virtud de las características de proliferación de este tejido.

La medida de los niveles de actividad enzimática de HK, PFK y PK en células hematopoyéticas indican que en el nuevo estado estacionario que se alcanza después de la irradiación, no se observan alteraciones significativas en dichos niveles. Tan sólo podemos destacar una disminución significativa en la actividad PK 1 mes después de la irradiación.

La disminución de la actividad PK observada a un mes postirradiación podría ser un reflejo indirecto del efecto de las radiaciones ionizantes sobre el estroma hematopoyético. Como es sabido, el estroma regula la hematopoyesis a través de mecanismos complejos que podrían ser los responsables de alteraciones en el metabolismo celular, que se traducirían en modificaciones de algunas actividades enzimáticas.

La HK, PFK y la PK, enzimas limitantes de la glicolisis en la mayoría de los tejidos de mamíferos, tienen un comportamiento regulador complejo a causa de la gran variedad de factores que intervienen en él, así como por los numerosos mecanismos de control a las que están sometidos (Bloxham y Lardy, 1973).

En relación a las determinaciones realizadas a lo largo del periodo estudiado, hay que considerar el hecho de que inmediatamente después de la irradiación hay una deplección, primero de precursores hematopoyéticos y luego de células nucleadas que se recuperan al mes postirradiación (tabla 1). El número de precursores hematopoyéticos se estabiliza en niveles subóptimos comprendidos entre un 40% y un 50%. A partir de este momento los precursores adquerirían una mayor capacidad proliferativa, incrementando su porcentaje en fase de síntesis a lo largo de la vida del animal (Tejero y col., 1988), lo que implicaría, que en estas células haya un incremento en las necesidades energéticas (Vora, 1983; Oskam y col., 1985). La complejidad de la médula ósea, en la que tan sólo un 3% son precursores hematopoyéticos, justifica que tal incremento energético no se vea reflejado en aumentos globales de la actividad HK, PFK y PK a largos tiempos postirradiación. Estos resultados, junto a los obtenidos en el apartado anterior, ponen de manifiesto que en la población mayoritaria de este tejido, células de proliferación y tránsito, no se produzcan modificaciones de carácter residual como consecuencia de una irradiación

subletal.

Los valores absolutos de actividad HK, PFK y PK obtenidos en células de médula ósea, tanto de animal control como irradiado son del mismo orden de magnitud a los descritos en diversas líneas celulares. Así, la actividad HK guarda similitud con la descrita en la línea celular H-EP-2 derivada de un carcinoma de laringe y con la línea MRC5 derivada de fibroblastos normales. Los niveles de actividad PFK son similares a los descritos en la línea supresora ESH-P6 y las líneas celulares normales rcc 1-3 y rcc 1-4. Y la actividad PK guarda relación con la encontrada en la línea celular ESH P-6 designada como línea supresiva (Board y col.,1990)

En otro contexto, resulta interesante destacar que, a lo largo del periodo analizado, en los animales irradiados, no se han observado alteraciones morfológicas en las poblaciones celulares objeto de estudio. Así mismo, no se han detectado mortalidad temprana ni inducción de neoplasias tardías. Estos datos junto con el hecho de que los niveles de actividad PK esten dentro de los márgenes dados por Board y col.,1990, según los cuales pertenecerían al grupo de células metabólicamente normales, nos permite corroborar la ausencia de un número significativo de células con potencial tumorigénico, como consecuencia de la irradiación administrada.

#### IV.3.- ESTUDIO DE LA FUNCION Y METABOLISMO DE ERITROCITOS

Aunque la recuperación del sistema hematopoyético después de la irradiación es total, en lo que al número de células en sangre periférica se refiere (III.1), pueden producirse alteraciones en la función o en el metabolismo de estas células. Así, se han descrito cambios en los niveles de actividad de enzimas de diversas rutas metabólicas en eritrocitos como consecuencia del tratamiento citotóxico (Etiemble, 1979; Jansen y col., 1985).

En relación a la posible alteración de los niveles de proteína, hemoglobina y 2,3-BPG (Tabla 3), nuestros resultados indican que no existen diferencias entre los animales control e irradiados a lo largo del periodo estudiado.

Los niveles de Hb encontrados por nosotros en los eritrocitos de ratón F1(C57 Bl/BalbC), tanto de animal control como irradiado, oscilaron en un rango comprendido entre 7,8 y 9,7 mM (11,5 y 12,8 g/dl) (tabla 3). Estos valores son equivalentes a los descritos para otras cepas de ratón (Crispens, 1975); y guardan una estrecha similitud a los descritos en eritrocitos de conejo, los cuales son del orden de 12,9 g/dl (Smith, 1990).

Los niveles de 2,3-BPG encontrados por nosotros, tanto en animal control como en irradiado a diferentes tiempos después de la irradiación, oscilaron en unos valores

comprendidos entre 6,8 y 8,2 mmoles/l. Estos valores, guardan similitud con los niveles descritos en eritrocitos de diversas especies de mamíferos. Así, en humanos, rata y conejo, los niveles de 2,3 BPG se encuentran comprendidos entre 3-12 mmol/l (Sasaki y col.,1982; Isaaks y Harkenss,1983).

El hecho de que los niveles de 2,3 BPG en eritrocitos de ratón, sean equimoleculares con los niveles de Hb (tabla 3), supone que en el ratón, al igual que sucede en los eritrocitos de diversas especies de mamíferos, el metabolito 2,3 BPG modula la liberación del oxígeno de la Hb; lo cual nos permite indicar que el mecanismo de oxigenación de la Hb no está afectado por la irradiación.

Dado que la vida media del eritrocito de ratón es aproximadamente de 30 días (Magnani y col,1980), las disminuciones observadas en los niveles de actividad HK y PK (figuras 4 y 6 respectivamente) a los 3 meses después de la irradiación, indican que ésta anomalía metabólica se mantiene durante 3 periodos consecutivos de renovación de la población eritroide, y por lo tanto, que la lesión se ha producido sobre alguno de sus progenitores o sobre otro tipo celular de más lenta renovación, tal vez el estroma capaz de modular el metabolismo de estas células.

Los valores de actividad HK tanto en los controles como en los tratados son aproximadamente 2 órdenes de

magnitud superiores a lo largo del periodo estudiado a los descritos para la HK de eritrocitos de conejo, que corresponde a la forma molecular Ia (Fornaini y col.,1982) y es similar a la descrita para esta enzima en linfocitos del mesentérico y en las líneas celulares 2BITG y 2BI (Board y col.,1990).

La actividad PFK supera los valores control a los 6 meses después de la irradiación (fig.5). Este incremento aunque no reproducible para otros tiempos postirradiación, está de acuerdo con la recuperación descrita para otras enzimas glicolíticas como enolasa, aldolasa y fosfogliceratoquinasa de eritrocitos de pacientes tratados con quimioterapia durante un periodo de tiempo comprendido entre 3 meses y 11 años (Etiemble,1979; Jansen y col.,1985). Por otro lado, hemos de indicar que, la actividad PFK es similar a la encontrada por Board y col.,1990 en la línea celular rcc-1 que posee una ligera actividad tumorigénica.

Los niveles de actividad PK en eritrocitos de ratón son 1,6 veces superiores a los encontrados en eritrocitos de rata (Rodriguez,1988). Mientras que son 3,3 veces superiores a los encontrados en eritrocitos humanos (Kahn y Marie,1982). Así mismo, también son similares a los descritos en la línea híbrida derivada de keratinocitos humanos denominada ESH P6 (Board y col.,1990).

Del mismo modo que indicábamos para médula ósea y

siguiendo los estudios realizados por Board y col (1990), en los cuales clasifica a las células en tumorales ó no atendiendo a la actividad PK. Podemos afirmar que los valores de actividad enzimática respecto a esta enzima, obtenidos por nosotros tanto en eritrocitos de animal control como tratado, nos permite clasificarlos como pertenecientes al grupo de células normales.

De los resultados obtenidos para los niveles de actividad enzimática de las 3 enzimas reguladoras de la glicolisis, HK, PFK y PK en eritrocitos, podemos indicar pues, que después de algunas alteraciones observadas durante los 6 primeros meses postirradiación, se produce una normalización en los niveles de actividad de las enzimas estudiadas. Esta recuperación, descarta la posibilidad de que las alteraciones se deban a modificaciones producidas en el genoma de las células madre hematopoyéticas que impliquen cambios moleculares de las enzimas.

#### **IV.4.- ESTUDIO DE LA FUNCION Y METABOLISMO DE GRANULOCITOS**

Como parámetro indicativo del posible daño residual inducido por la radiación sobre la función fisiológica de granulocitos, hemos determinado los niveles de  $O_2^-$  generados por granulocitos obtenidos de animales irradiados.

Diversos estudios realizados en animales de

experimentación sobre la funcionalidad de granulocitos, se han llevado a cabo con células obtenidas de exudado peritoneal (Udupa y Lipschitz,1987). La extravasación de células hacia los tejidos o lugares de infección implica una serie de cambios en diversos parámetros de la funcionalidad celular, entre ellos destacan las modificaciones en los niveles de producción de anión superóxido (Zimmerli y col.,1984; Donowitz y Quesenberr,1986; y Zinkl,1989). Con el fin de evitar estas modificaciones, los resultados presentados en esta memoria se han realizado con células obtenidas de sangre periférica. Siendo los primeros descritos en ratones.

Por otro lado, para evaluar el papel del estroma en los cambios de funcionalidad de granulocitos observados en sangre periférica, establecimos cultivos de larga duración de médula ósea y determinamos los niveles de  $O_2^-$  generados por los granulocitos obtenidos en cultivo.

Numerosos estudios han indicado que, los granulocitos obtenidos de cultivo son morfológica y funcionalmente equivalentes a las células obtenidas de sangre periférica (Dexter,1982; Udupa y Lipschitz,1987).

Discutiremos conjuntamente, los resultados obtenidos en células de sangre periférica y en cultivo.

Antes de discutir el efecto residual producido como consecuencia de la irradiación comentaremos los diferentes

valores de producción de  $O_2^-$  de granulocitos de sangre periférica y de cultivo (tabla 4, fig.8), estas diferencias pueden explicarse considerando los distintos orígenes de granulocitos, independientemente de que, los granulocitos obtenidos de cultivo de médula ósea son fisiológicamente equivalentes a las células de sangre periférica (Udupa y Lipschitz,1987). Diferencias en los valores absolutos de producción de  $O_2^-$ , se han descrito no sólo entre células de la misma especie que difieren en su origen tisular (sangre periférica o exudado peritoneal) sino también entre especies distintas (Zimmerli y col.,1984).

En la fig.8, podemos observar que existen diferencias en la producción de  $O_2^-$  con respecto a las semanas de cultivo. Estos resultados coinciden con los descritos por Meagher y col (1988), quienes también destacan diferencias en la producción de  $O_2^-$  de granulocitos según las semanas de cultivo. Así mismo, los valores de producción de  $O_2^-$  encontrados por nosotros, son superiores a los descritos por estos mismos autores en granulocitos humanos obtenidos en cultivo. Este hecho puede deberse a las diferencias observadas en la actividad NADPH-oxidasa de granulocitos según las especies (Meagher y col.,1988).

En relación al efecto residual producido por la radiación, los niveles de  $O_2^-$  producidos por los granulocitos de sangre periférica y por los granulocitos obtenidos en cultivo (tabla 4, figura 8 respectivamente) indican que, en el caso de los animales previamente

expuestos a 5 Gy, tanto los granulocitos de sangre periférica como los obtenidas en cultivo, generan niveles de  $O_2^-$  superiores a los respectivos controles. Estos incrementos se observan a los 6 y 12 meses después de la irradiación. Este aumento en la producción de  $O_2^-$  observado por nosotros resulta análogo a los aumentos descritos en diversas especies de animales y de humanos tratados con los factores hr-GM-CSF y hr-G-CSF (Sullivan y col,1989; Whetton y Dexter,1989; Yuo y col,1990). Por tanto consideramos que este aumento pudiera indicar un mecanismo de preactivación realizado por los factores GM-CSF y G-CSF (Corey y Rosoff,1989; Yuo y col.,1990). De hecho, ha sido descrito que los factores GM-CSF y G-CSF pueden incrementar la respuesta fagocítica preparando a la célula para responder de una manera "extra" al estímulo recibido. Estos mecanismos están mediados por la presencia en la membrana de los granulocitos de sitios de unión específicos para estos factores (Gough y Nicola,1990; Nicola,1990; Oez y col.,1990).

Los resultados obtenidos respecto al tiempo de activación (Tabla 4; Figura 9) indican que, los granulocitos de sangre periférica y los granulocitos obtenidos en cultivo a los 12 meses postirradiación poseen unos valores de tiempo de activación significativamente superiores a los respectivos controles. Las diferencias de este parámetro podrían indicar modificaciones en el mecanismo de activación de granulocitos.

Las reacciones de fosforilación mediadas por la PK-C, son el eje central de la explosión respiratoria (Hartfield y Robinson, 1990). Por lo que, las diferencias encontradas en el tiempo de activación podrían deberse a alteraciones en el mecanismo de fosforilación o a alteraciones en los componentes de la PK-C. Investigaciones acerca del mecanismo de la transmisión de la señal en estas células, serán objeto de estudio por nuestro grupo de investigación en un futuro próximo.

Como ha sido indicado en esta memoria, la explosión respiratoria se caracteriza por un aumento en el consumo de oxígeno y producción de  $O_2^-$ , así como por un incremento en la velocidad glicolítica. Por ello, hemos determinado la actividad de las tres enzimas reguladoras de la glicolisis en granulocitos de LTBMBC.

Como se desprende de las figuras 10, 11 y 12; los niveles de actividad HK, PFK y PK de granulocitos obtenidos del cultivo de médula ósea procedentes de animales irradiados son significativamente superiores en general, a los niveles de actividad enzimática de las células control.

El aumento generalizado en los niveles de actividad de estas enzimas en granulocitos, puede estar asociado al incremento en la capacidad de generar anión superóxido que presentan estas mismas células. El aumento de actividad HK implica un incremento en los niveles de G6P necesarios para

seguir la ruta de las pentosas fosfato y obtener NADPH necesario para la actividad del sistema oxidasa responsable de la producción de anión superóxido.

Por otro lado, y en base a la hipótesis planteada sobre la implicación de CSFs en la preactivación de granulocitos correspondientes a animales que expresan daño residual radioinducido, se ha descrito por otros autores que ciertos CSFs son capaces de provocar un aumento en el transporte de glucosa. Así, el mantenimiento de la viabilidad de las células de la serie mieloide, radica en la capacidad que presentan los factores hematopoyéticos para mantener niveles intracelulares de ATP óptimos, a través de incrementar el transporte de glucosa (Whetton y Dexter, 1983; Silberstein y col., 1989; Whetton, A., 1990). Por ejemplo, en la línea celular FDC-P<sub>2</sub> precursora de granulocitos se ha descrito un aumento en el consumo de glucosa asociado a la presencia de IL-3 (Whetton y col., 1985).

Un aumento en el transporte de glucosa intracelular podría suponer una mayor actividad en las enzimas claves de la glicolisis, para mantener la regulación de la ruta.

Por lo tanto, el incremento observado por nosotros, en los niveles de actividad HK, PFK y PK de granulocitos a distintos tiempos después de la irradiación, podría estar asociado a un aumento en el transporte de glucosa en estas células debido a la presencia de factores liberados tras

la irradiación.

Con el fin de comprobar, si el aumento cuantitativo observado en las proteínas de granulocitos (tabla 4, fig.13) podría corresponder a un aumento en la expresión de las proteínas implicadas en la producción de  $O_2^-$  y en la glicolisis, realizamos una electroforesis bidimensional.

La fig.14 A y B indica que no hay modificaciones en el Pm y en la carga de las proteínas que aparecen en los geles y concretamente, en la zona de Pm (  $43 \cdot 10^3$  a  $104 \cdot 10^3$  D) correspondiente a las enzimas glicolíticas y las implicadas en el sistema oxidasa.

Este resultado nos permite afirmar que, como consecuencia de la irradiación no se ha producido una expresión diferencial de proteínas ni se han modificado los parámetros de Pm y carga de las mismas. Por otro lado, considerando que la cantidad de proteína cargada en ambos geles procedía de la mitad de células en el animal irradiado, podemos señalar que a los 6 meses después de la irradiación, se produce una expresión incrementada en todas las proteínas de la célula.

Estos incrementos en los niveles de proteínas de granulocitos de sangre periférica y de células obtenidas en cultivo (tabla 4, fig. 13), podrían deberse a la presencia de un exceso de CSFs. Como ha sido indicado, el estroma hematopoyético es el encargado de liberar factores

que regulan la hematopoyesis y concretamente, se ha descrito que el factor GM-CSF induce la transcripción y síntesis de proteínas (Horiguchi y col.,1987; Cannistra y col.,1988).

En resumen, los resultados presentados en este apartado, en cuanto a los niveles de producción de  $O_2^-$ , tiempo de activación, niveles de actividad enzimática y proteínas a distintos tiempos después de la irradiación, nos permiten plantear que, los aumentos encontrados en estos parámetros son reflejo de un daño residual en el sistema hematopoyético en el cual, el estroma hematopoyético podría ejercer un papel primordial mediante la producción de CSFs.

#### **IV.5.- IMPLICACIONES DEL ESTROMA EN LA HEMATOPOYESIS DEL RATON**

Si bién, los mecanismos responsables del daño residual no son del todo conocidos, ha sido ampliamente indicado en la literatura que el estroma hematopoyético tiene un papel fundamental en el desarrollo de este tipo de daño (Hendry,1985; Testa y col.,1985; Bierkens y col.,1989; Bierkens y col.,1991).

Una de las manifestaciones del daño consiste en la lesión proliferativa de las células del estroma que se expresa por la formación de capas adherentes subconfluentes y consecuentemente en una disminución en el número de

nichos hematopoyéticos activos (figs. 15 y 16). Esta disminución se observa a los 6 y 12 meses después de la irradiación. Concomitante a esta reducción, existe una menor liberación de células al sobrenadante en los cultivos de animales irradiados (fig.17) que, también se observa a los 6 y 12 meses después de la irradiación. Estos resultados nos permiten afirmar que existe un daño en el estroma de médula ósea de ratón, que no se recupera a los 6 meses y que se sigue manifestando a los 12 meses después de la misma. Esta lesión del microambiente hematopoyético probablemente esté implicada en la deplección persistente de precursores hematopoyéticos, característica de los animales irradiados (tabla 1).

Efectos similares han sido descritos en la literatura, así Quesenberry y col (1984) ha descrito una reducción en el número de células liberadas al sobrenadante tras la irradiación de la capa adherente con dosis de 9-9.5 Gy a la 4ª semana de cultivo. Dosis de 9.5 Gy de irradiación total del animal producen una reducción de un 80% en la celularidad del estroma, que se mantiene a los 18 meses después del tratamiento; y dosis de 7 Gy y superiores provocan un daño en el estroma que no se recupera a los 6 meses después de la irradiación (Chamberlain y col., 1979; Wilson y col., 1974; Fried y col., 1976).

La respuesta de las células del estroma a la irradiación es muy variable, depende de la cepa del animal, de la dosis y de la tasa de dosis aplicada.

Por otro lado, a causa de la baja capacidad de recambio de estas células, los tiempos en los cuales se expresa y regenera el daño producido tras la irradiación son en general elevados. La dosis máxima de irradiación que permite la recuperación del estroma depende de la cepa del ratón, de la dosis y de la tasa de dosis aplicada (Bierckens y col,1989). Nuestros resultados señalan que, la irradiación global y aguda del ratón con 5 Gy, daña el estroma hematopoyético y éste no se recupera a lo largo de un año después de la irradiación.

Con el fin de comprobar la implicación de los CSFs en el desarrollo del daño hematopoyético residual observado, determinamos la presencia de CSFs, en los sobrenadantes de los cultivos establecidos con animales irradiados, a través de ensayos clonales de CFC-GM. Como se observa en la Figura 18, los sobrenadantes a distintas concentraciones, 12 meses después de la irradiación, son capaces de estimular la proliferación del precursor CFC-GM. El análisis morfológico de las colonias indicó que estaban formadas por granulocitos y macrófagos, lo cual nos permite apuntar la posibilidad de que factores con rango de acción sobre el precursor CFC-GM sean los liberados por las células del estroma tras la irradiación.

Finalmente, y para corroborar que los factores liberados por el estroma hematopoyético son los responsables de la activación de la capacidad fagocítica de los granulocitos, realizamos los experimentos que se

representan en la fig.19, en donde se observa que, los sobrenadantes de LTBM de animales irradiados son capaces de aumentar los niveles de producción de  $O_2^-$  de células control al ser incubados 3 h a 37°C con ellos. Este resultado demuestra la hipótesis descrita en esta memoria según la cual, los responsables del incremento en la producción de  $O_2^-$  son factores hematopoyéticos liberados por el estroma tras la irradiación.

Los resultados expuestos en esta memoria ponen de manifiesto la existencia de una relación entre daño residual en el estroma, activación en la funcionalidad de células maduras y alteraciones en el compartimento de precursores y, nos permiten establecer una sucesión de acontecimientos en la hematopoyesis del ratón tras la irradiación. Estos consisten en una deplección de precursores hematopoyéticos y posterior caída de células maduras, si bien el síndrome se corrige en un periodo próximo a un mes (tabla 1). Por otro lado, la irradiación produce una lesión del estroma que impide mantener una hematopoyesis normal (figs. 15, 16 y 17). Nuestros resultados sugieren que el estroma responde mediante la liberación de un exceso de CSFs que serían la causa directa del incremento en la capacidad proliferativa de los precursores y fagocítica de los granulocitos.

**CONCLUSIONES**

## V.- CONCLUSIONES

Del conjunto de los resultados aportados en esta memoria, podemos concluir que:

La irradiación total del cuerpo, con dosis única de 5 Gy produce un daño residual en el compartimento de precursores comprometidos con la serie granulomacrofágica de ratón que se manifiesta al menos durante un año postirradiación. La población de células de médula ósea no manifiesta modificaciones respecto a la incorporación del hierro a través del receptor de transferrina. Las enzimas glicolíticas se encuentran recuperadas a partir de los 3 meses.

En la línea eritroide, la irradiación no produce alteraciones en los mecanismos responsables de la oxigenación de la Hb. De manera paralela la actividad glicolítica del eritrocito se recupera completamente al año postirradiación.

Las modificaciones funcionales observadas tanto en granulocitos como en el estroma hematopoyético, nos permiten concluir que las radiaciones ionizantes producen un daño residual que se manifiesta en una extraproducción de factores hematopoyéticos con características de GM-CSF. Estos factores son los responsables de incrementar la capacidad de producir anión superóxido por los granulocitos maduros. El incremento en la síntesis de proteínas podría ser una consecuencia de la acción de estos factores. El aumento de las actividades glicolíticas en estas células permite el incremento de la respuesta fagocítica ante un estímulo.

La aportación de este trabajo, es la constatación de que como consecuencia de la irradiación se liberan CSFs que, no sólo actúan en el compartimento de precursores comprometidos sino también en el de células maduras. Este hecho se postula como un mecanismo compensatorio para

responder a procesos infecciosos por parte de un organismo cuya capacidad de respuesta esta disminuida al encontrarse reducido el tamaño del compartimento de precursores hematopoyéticos.

**BIBLIOGRAFIA**

## VI.- BIBLIOGRAFIA

-AGAR, N.S., BOARD, P.G., (1983). En *Red Blood cells of domestic animals*. (NS Agar y PG Board, eds), 227-251. Elsevier, Amsterdam.

-AKKERMAN, JWN (1978). Regulation of carbohydrate metabolism in platelets. A review. *Thromb. Haemostas.* 39: 712-724

-ALBERICO, T.A., IHLE, N.I., LIANG, C., McGRATH, H.E. y QUESENBERRY, P.J.(1987). Stromal growth factor production in irradiated lectin exposed long-term murine bone marrow cultures. *Blood.* 69: 1120-1127

-ALLEN, T.D. y DEXTER, T.M.(1976). Cellular interrelationships during *in vitro* granulopoiesis. *Differentiation.* 6: 191-194

-ALLEN, T.D. y DEXTER, T.M.(1983). Long-term bone marrow cultures: an ultrastructural review. En: Johari (ed) *Scanning electron microscopy IV*. Chicago: SEM Inc AMF Ohare. p 1851-1906

-ALLEN, T.M. y DEXTER, T.M.(1984). The essential cells of the hemopoietic microenvironment. *Exp. Hematol.* 12: 517-521

-ARNOUT, M.A., WANG, E.A., CLARK, S.C. y SIEFF, C.A.(1986). Human recombinant GM-CSF increases cell-cell adhesion and surface expression of adhesion-promoting surface glycoproteins on mature granulocytes. *J.Clin.Invest.* 78: 597-601

-AXELRAD, A.A., McLEOD, D.L., SHREEVE, H.M. y HEATH, D.A.(1974). Properties of cells that produce erythrocytic colonies *in vitro*. En *Hemopoiesis in culture* (Ed) Robinson, W., 226-234, Washington, US. Government Printing Office.

-BABIOR, B.M., KIPNES, R.S. y CURNUTTE, J.T.(1973). Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide a potential bactericidal agent. *J.Clin.Invest.* 52: 741-746.

-BABIOR, B.M.(1978). Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *New.Engl.J.Med.* 298: 659-667.

-BABIOR, B.M.(1984). Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood.* 64: 959-966

-BADWEY, J.A. y KARNOVSKY, M.L.(1980). Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Ann.Rev.Biochem.* 49: 695-726

-BADWEY, J.A. y WESTHEAD, E.W.(1977). Activation of human erythrocyte pyruvate kinase by hexose-bisphosphates *Biochem.Biophys.Res.Commun* 77: 275-281

-BARNES, D.W., FOR, C.E., GRAY, S.M. y LOUITIT, J.F.(1959). Spontaneous and induced changes in cell populations in heavily irradiated mice. *Progress in Nuclear Energy (Biol)*. Series VI,2. Pergamon Press, London, 2: 1-10

-BAZIL, G.W., HAYNES, M., GARLAND, J. y DEXTER, T.M.(1983). Characterization and partial purification of a haemopoietic cell growth factor in Wehi-3 cell conditioned medium. *Biochem. J* 210: 747-759

-BECKER, A.J., McCULLOCH, 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

-BEGLEY, C.G., LOPEZ, A.F., NICOLA, N.A., WARREN, D.J., VADAS, M.A., SANDERSON, C.J. y METCALF, D. (1986). Purified CSFs enhance survival of human neutrophils and eosinophils *in vitro*: a rapid and sensitive microassay for CSFs. *Blood* 68: 162-166

- BELLAVITE, P. (1988). The superoxide forming enzyme system of phagocytes. *Free. Radicals. Biol. Med* 4: 225-261
- BENESCH, R. y BENESCH, R.E. (1967). The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 26: 162-167.
- BENTLEY, S.A. y FOIDART, J.M. (1980). Some properties of marrow derived adherent cells in tissue culture. *Blood* 56: 1006-1016.
- BEUTLER, E. (1990). Energy metabolism and maintenance of erythrocytes. En *Hematology* (Williams W; Beutler E,; Erslev A. y Lichtman, M) Cap. 35 p 355-368 4ª ed International edition.
- BIERKENS, J.G.; HENDRY, J.H.; TESTA, N.G. (1989). The radiation response and recovery of bone marrow stroma with particular reference to long-term bone marrow cultures. *Eur. J. Haematol* 43: 95-107
- BIERKENS, J.G.; HENDRY, J.H.; TESTA, N.G. (1991). Recovery of the proliferative and functional integrity of mouse bone marrow in long-term cultures established after whole-body irradiation at different doses and dose rates. *Exp. Hematol* 19: 81-86
- BJORNTOP, P. (1983). Interactions of adipocytes and their precursor cells with endothelial cells in culture. *Exp. Cell.Res* 149: 277-282.
- BLOXHAM, D.P y LARDY, H.A. (1973). Phosphofructokinase. En *The enzymes* 8 3ª ed. (Boyer, P.D. ed.) Academic Press. New York 239-278.
- BOARD, M.; HUMM, S. y NEWSHOLME, E.A. (1990). Maximum activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle in

normal, neoplastic and suppressed cells. *Biochem. J.* 265: 503-509.

-BORREGOARD, N.; CROSS, A.R.; HERLIN, T.; JONES, O.T y SEGAL, A.W. (1983). A variant form of X-linked chronic granulomatous disease with normal nitroblue tetrazolium slide test and cytochrome b. *Eur. J. Clin. Invest* 13: 243-248.

-BOSCA, L. y CORREDOR, C. (1984). Is phosphofructokinase the rate limiting step of glycolysis?. *Trends. Biochem. Sci* 9: 372-373

-BÖYUM, A. (1974). Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue. Antigens* 4: 269-274

-BRADLEY, T.R. y METCALF, D. (1966). The growth of mouse bone marrow cells *in vitro*. *Anst. J. Exp. Biol. Med. Sci* 44: 287-300.

-BRISTOW, J.; BIER, D.M. y LANGE, L.G. (1987). Regulation of adult and fetal myocardial phosphofructokinase. *J. Biol. Chem* 262: 2171-2175.

-BRONCHUD, M.H.; SCARFFE, J.H.; THATCHER, N. (1987). Phase I/II study of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients receiving intensive chemotherapy for small cell lung cancer. *Br. J. Cancer* 56: 809-815.

-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. *Br. J. Cancer* 58: 64-69

-BROOKOFF, D. y WEISS, L. (1982). Adipocyte development and the loss of erythropoietic capacity in the bone marrow of

mice after sustained hypertransfusion. *Blood* 60: 1337-1344.

-BRUNO, E.; BRIDDELL, R. y HOFFMAN, R. (1988). Effect of recombinant and purified haemopoietic growth factors on human megakaryocyte colony formation. *Exp. Haematol* 16: 371-377.

-BÜCHER, T. y PFLEIDERER, G. (1955). Pyruvatekinase from muscle. En *Methods in Enzymology* 1 (Colowick, S. y Kaplan, N.O. eds). Academic Press. New York 345-440

-BUNN, H.F.; RANSIL, B.J. y CHAO, A. (1971). The interaction between erythrocyte organic phosphates, magnesium ion and hemoglobin. *J. Biol. Chem* 246: 5273-5279

-BUNN, H.F.; SEAL, U.S. y SCOTT, A.F. (1974). The role of 2,3-diphosphoglycerate in mediating hemoglobin function of mammalian red cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 241: 498-512

-BURGESS, A.W. y METCALF, D. (1977). Colony stimulating factor and the differentiation of granulocytes and macrophages. En *Experimental Hematology Today* Eds. Baum, S.J. y Sedney, G.D. Springer, New York, 135-146

-BURGESS, A.W. y METCALF, D. (1980). Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemic cells. *Int. J. Cancer* 26: 647-654

-BURGESS, A.W.; BARTLETT, P.F.; METCALF, D.; NICOLA, N.A.; CLARK-LEWIS, I. y SCHRADER, J.W. (1981). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor produced by an inducible T-cell hybridoma: Molecular properties and cellular specificity. *Exp. Hematol* 9: 893-903

-CAGAN, R.H. y KARNOVSKY, M.L. (1964). Enzymic basis of the respiratory stimulation during phagocytosis. *Nature (Lond)* 204: 255-257.

-CANNISTRA, S.A.; VELLENGA, E.; GROSHEK, P.; RAMBALDI, A.

y GRIFFIN, J.D. (1988). Human GM-CSF and Il-3 stimulate monocyte cytotoxicity through a tumour necrosis factor dependent mechanism. *Blood* 71: 672-676

-CARDENAS, J.M.; DYSON, R.D. y STRANDHOLM, J:j (1975). En *The isozymes* (C.L. Markert, ed) vol.1, p.523-537. Academic Press, New York, 1975.

-CARSTEN, A.L. y BOUD, V.P. (1969). Viability of stored bone marrow colony forming units. *Nature* 219: 1082-1085.

-CHAMBERLAIN, W.; BARONE, J.; KEDO, A. y FRIED, W. (1979). Lack of recovery of murine hematopoietic stromal cells after irradiation induced damage. *Blood* 44: 385-392

-CLARK, S.A. (1990). The human neutrophil respiratory burst oxidase. *J. Infc. Dis* 161: 1140-1154.

-CLARK, S.C. y KAMEN, R. (1987). The human haemopoietic colony stimulating factors. *Science* 236: 1229-1237.

-CLARK, M.R. y SHOHET, S.B. (1985). Red cell senescence. *Clinics. Haematol* 14: 223-255

-COOK, N.; DEXTER, T.M.; LORD, B.I.; GRAGOE, E.J. y WHETTON, A.D. (1989). Identification of a common signal associated with cellular proliferation stimulated by 4 haemopoietic growth factors in a highly enriched population of granulocyte-macrophage colony-forming cells *EMBO J* 8: 2967-2974.

-COLOWICK, S.P. (1973). The enzymes (Boyer, P.D., ed) IX: 1-48 Academic Press, New York.

-CORASH, L.M.; PIOMELLI, S.; CHEN, H.C.; SEAMON, C. y GROSS, E. (1974). Separation of erythrocytes according to age on a simplified density gradient. *J. Lab. Clin. Med* 84: 147-151.

- COREY, S.J. y ROSOFF, P.M. (1989). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor primes neutrophils by activating a pertussi toxin-sensitive G protein not associated with phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem* 264: 14165-14171.
- CRISPENS, C.G. (1975). Sección IV Blood En *Handbook on the laboratory mouse*. Charles C. Thomas. Publisher. Springfield. Illinois.
- CROSS, A.R. y JONES, O.T. (1986). The effect of the inhibitor diphenylene iodonium in the superoxide generating system of neutrophils: specific labelling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochem. J.* 237: 111-116
- CUENLLAS, E.; GAITAN, S.; BUEREN, J.A. y TEJERO, C. (1990). Kinetic studies of pyruvate kinase during in vitro differentiation of GM-CFC haemopoietic precursor and bone marrow cells in mice. *Biosc. Reports* 10: 141-154.
- CURNUTTE, J.T. y BABIOR, B.M. (1990). Composition of neutrophils En *Hematology* (Williams, W.; Beutler, E.; Erslev, A, y Lichtman, M.A.) 4ª ed International edition p 770-774.
- CURRY, J.L.; TRENTIN, J.J. y WOLF, N. (1967). Haemopoietic spleen colony studies. II. Erythropoiesis. *J. Exp. Med* 125: 703-707.
- DECHATELET, L.R. (1979). En "*Phagocytosis and cellular immunity*" (H.H Gadebusch, ed) 1-55 CRC Press Florida
- DE LA FUENTE, M. (1985). Changes in the macrophage function with aging. *Comp. Biochem. Physiol* 81A: 935-938
- DEXTER, T.M. (1979). Cell interaction *in vitro*. *Clin. Haematol* 8: 453-468
- DEXTER, T.M. (1982). Stromal cell asociated haemopoiesis.

*J. Cell. Phys* suppl.1: 87-94

-DEXTER, T.M. (1983). The regulation of haemopoietic stem cells, progenitor cells and macrophage development. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Higiene* 77: 597-603

-DEXTER, T.M. (1984). The message in the medium. *Nature* 309: 746-747

-DEXTER, T.M. (1987). Growth factors involved in haemopoiesis. *J. Cell. Sci* 88: 1-6

-DEXTER, T.M.; ALLEN, T.D. y LAJTHA, L.G. (1977). Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J. Cell. Physiol* 91: 335-344

-DEXTER, T.M. y MOORE, M.A.S. (1977). In vitro duplication and cure of haemopoietic defects in genetically anaemic mice. *Nature* 269: 412-414

-DEXTER, T.M.; SCHOFIELD, R.; HENDRY, J.H. y TESTA, N.G. (1979). Congenital and induced defects in haemopoietic environments, stem cell proliferation and differentiation. En *Aplastic anaemia: Pathophysiology and approaches to therapy*. H. Heimpel, E.C. Gordon Smith, W. Heit y B. Kubanek (eds), Springer. Verlag, Berlin. pp 73-78

-DEXTER, T.M.; SPOONER, E.; TOKSOZ, D. y LAJTHA, L.G. (1980). The role of cells and their products in the regulation of in vitro stem cell proliferation and granulocyte development. *J. Supramol. Struct* 13: 513-524

-DICK, J.E.; MAGLI, M.C.; HUSZAR, D.; PHILLIPS, R.A.; BERNSTEIN, A. (1985). Introduction of a selectable gene into primitive stem cells capable of long-term reconstitution of the hemopoietic system of W/W<sup>v</sup> mice. *Cell* 42: 71-79

-DI PERSIO, J.F.; HEDNAT, C. y GASSON, J.C. (1989). GM-CSF indirectly down-regulates high-affinity LTB<sub>4</sub> synthesis. *J. Cell. Biochem* suppl.13c: 9.

-DONOWITZ, G.R.; QUESENBERRY, P. (1986). 5 fluorouracil effect on culture murine stem cell progeny and peripheral leukocytes. *Exp. Hematol* 14: 207-212.

-DOUSSIÈRE, J. y VIGNAIS, P.V. (1985). Purification and properties of an O<sub>2</sub><sup>-</sup> generating oxidase from bovine polymorphonuclear neutrophils. *Biochemistry* 24: 7231-7239

-DOUSSIÈRE, J.; LAPORTE, F. y VIGNAIS, P.V. (1986). Photolabeling of a O<sub>2</sub><sup>-</sup> generating protein in bovine polymorphonuclear neutrophils by an arylazido NADP<sup>+</sup> analog. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 139: 85-93

-DUNAWAY, G.A. y KASTEN, T.P. (1985). Nature of rat brain 6-phosphofructo-1-kinase isozymes. *J. Biol. Chem.* 260: 4180-4185.

-ERSLEY, A.J. y LICHTMAN, M.A (1990). Structure and function of the marrow. Cap. 5 En *Hematology* Williams, W.J; Beutler, E.; Ersley, A.J y Lichtman, M.A 4<sup>a</sup> ed. International Edition

-ETIEMBLE, J.; BERNARD, F.; PICAT, Ch.; BÉLPOMME, D. y BOIVIN, P. (1979). Red blood cell enzyme abnormalities in patients treated with chemotherapy. *Br. J. Haematol* 42: 391-398.

-FITZGERALD, T.J.; MCKENNA, M.; ROTHSTEIN, L.; DOUGHERTY, C.; KASE, K. y GREENBERGER, J.S. (1986). Radiosensitivity of human bone marrow granulocyte-macrophage progenitor cells and stromal colony-forming cells: effect of dose rate. *Radiat. Res* 107: 205-215.

-FRIED, W.; CHAMBERLIN, W.; KEDO, A. y BARONE, J. (1976). Effects of radiation on hematopoietic stroma. *Exp. Hematol*

-FRIEDEN, C.; GILBERT, H.R. y BOCK, P.E. (1976). Phosphofructokinase. III. Correlation of the regulatory kinetic and molecular properties of the rabbit muscle enzyme. *J. Biol. Chem* 251: 5644-5647.

-FRIEDSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LATSINIK, N.V.; PANASYNK, A.F. y KEILISS-BOROK, I.V. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of hemopoietic tissues. *Transplantation* 17: 331-340.

-FORNAINI, G.; DACHA, M.; MAGNANI, M.; STOCHI, V. (1982). Hexokinase from rabbit red blood cells. En *Methods in enzymology* 90: 3-25.

-FURCH, L.T.; MCCARTHY, J.B.; PALM, S.L.; ENENSTEIN, J.; BASARA, M. (1984). Laminin and fibronectin peptides defined by monoclonal antibodies promote haptotaxis of metastatic cells. En: *Basement membranes and cell movement* CIBA Foundation Symposium 108. London, Pitman Medical. Porter, R. y Whelan, J. (eds).

-GABIG, T.G. y LEFKER, B.A. (1985). Activation of the human neutrophil NADPH oxidase results in coupling of electron carrier function between ubiquinone-10 and cytochrome b 559. *J. Biol. Chem* 260: 3991-3994.

-GAITAN, S.; TEJERO, C. y RUIZ-AMIL, M. (1983). Some comparative properties of pyruvate kinase in haemopoietic cells and erythrocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri* R). *Comp. Biochem. Physiol* 74B: 801-805.

-GAITAN, S.; CUENLLAS, E.; RUIZ-AMIL, M. y TEJERO, C. (1989). Role of phosphofructokinase during trout haemopoiesis: physiological regulation of glycolysis. *Comp. Biochem. Physiol* 95B: 705-710.

-GAITAN, S.; RUIZ-AMIL, M. y TEJERO, C. (1990).

Phosphofructokinase during haemopoiesis of the rainbow trout (Salmo gairdneri R): its isoenzymatic forms. *Biochemistry International* 21: 883-890.

-GAMBLE, J.R.; ELLIOT, M.J.; JAIPARGAS, E.; LOPEZ, A.F y VADAS, M.A. (1989). Regulation of human monocyte adherence by GM-CSF. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 86: 7022-7026

-GARCIA, R.C. y SEGAL, W. (1984). Changes in the subcellular distribution of the cytochrome b-245 on stimulation of human neutrophils. *Biochem. J* 219: 233-242.

-GILES, M. y RANDALL, D.J. (1980). Oxigenation characteristics of the polymorphic hemoglobins of cho salmon ("Oncorhynchus Kitsutch") at different development stages. *Com. Biochem. Physiol* 65A: 265-271.

-GILMAN, J.G. (1981) Red cells of newborn rats have low bisphosphoglyceromutase and high pyruvate kinase activities in association with low 2,3-bisphosphoglycerate. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 98: 1057-1062.

-GOLDMAN, J.M (1982) in *Blood and its Disorders* (Hardisty, R.M y Weatherall, D.J. eds) pp 601-628. Blackwell, London

-GOUGH, N.M.; GOUGH, J.; METCALF, D.; KELSO, A. y GRAIL, A (1984). Molecular cloning of cDNA encoding a murine haemopoietic growth regulator, granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Nature, London* 309: 763-767.

-GOUGH, N.M. y NICOLA, A.N (1990). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *En Colony-Stimulating factors Molecular and Cellular Biology Immunology* series vol 49 p 11-153. M.T. Dexter y J.M. Garland, eds

-GRABSTEIN, K.H.; URDAL, D.L.; TUSHINSKI, R.J.; MOCHIZUKI, D.Y.; PRICE, V.L.; CANTRELL, M.A.; GILLIE, S. y COULAN, P.J. (1986). Induction of macrophages tumoricidal activity by GM-CSF. *Scienc*, 232: 506-508.

-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. *Rad. Res* 122: 53-57.

-GREGORY, C.J. y EAVES, A.C. (1978). In vitro studies of erythropoietic progenitor cell lines derived from long-term bone marrow cultures demonstrates significant mouse strain genotypic variation. *J. Supramol. Struct*, 13: 501-511.

-GUILBERT, L.J. e ISCOVE, N.N (1976). Partial replacement of serum by selenite transferrin, albumin and lecithin in haemopoietic cell cultures. *Nature* 263: 594-595.

-GUALTERI, R. J. (1987). Consequences of extremely high doses of irradiation in bone marrow stromal cells and the release of hematopoietic growth factors. *Exp. Hematol* 15: 952-957.

-HALLIWELL, B.; ARNOMA, O.I.; WASIL, M. y GUTTERIDGE, J.M.C. (1988). The resistance of transferrin, lactoferrin and caeruloplasmin to oxidative damage. *Biochem. J.* 256: 311-312.

-HARRISON, P.R. (1984). Molecular analysis of erythropoiesis. *Exp. Cell. Res* 155: 321-344.

-HARTFIELD, P.J. y ROBINSON, J.M (1990). Mg-ATP primes superoxide-generating reponses in electropermeabilized neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 170: 194-200.

-HARVEY, J.W (1989). Erythrocyte metabolism. Cap. 8 in *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* 4ª ed. Academic Press, Inc. pp-185-234.

-HEESBEN, E.C.; RIJKSEN, G.; BATENBURG, J.J; Van GOLDE, M.G.L. y STAAL, G.E.J (1987). Phosphofructokinase in rat lung during perinatal development: Characterization of subunit composition and regulation by fructose 2,6-

bisphosphate and glucose 1,6-bisphosphate. *Biochim. Biophys. Acta* 924: 284-291.

-HEIDRICK, M.L. (1972). Age related changes in hydrolase activity of peritoneal macrophages. *Gerontologist* 12: 28-32.

-HENDRY, J.H. (1985). The cellular basis of long-term marrow injury after irradiation. *Radiother. Oncology* 3: 331-338.

-HENDRY, J.H. (1988). Survival of cells in mammalian tissues after low doses of irradiation: a short review. *Int. J. Radiat. Biol* 53: 89-94.

-HENDRY, J.H.; CLARK, D.; TESTA, N.G. y KIMBER, I. (1984). Long-term injury in B-lymphocyte precursor cells in repeatedly irradiated mice. *Biomedicine* 38: 343-347.

-HEYWORTH, C.M.; PONTING, I.L.O y DEXTER, T.M (1988). The response of haemopoietic cells to growth factors: developmental implications of synergistic interactions. *J. Cell. Sci* 91: 239-247.

-HEYWORTH, C.M.; VALLANCE, S.J.; WHETTON, A.D. y DEXTER, T.M (1990). The biochemistry and biology of the myeloid haemopoietic cell growth factors. *J. Cell. Sci. Suppl* 13: 57-74.

-HIRATA, T.; BITTERMAN, P.B.; MORNEX, J.F. y CRYSTAL, R.G. (1986). Expression of the transferrin receptor gene during the process of mononuclear phagocyte maturation. *J. Immunol.* 136: 1339-1345.

-HO, P.T.C.; ISHIGURO, K. y SARTORELLI, A.C. (1989). Regulation of transferrin receptor in myeloid and monocytic differentiation of H1-60 leukemia cells. *Cancer. Research* 49: 1989-1995.

-HORECKER, B.L. y KORNBERG, G.A. (1948). The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem* 175: 385-390.

-HORIGUCHI, J.; WARREN, M.K. y KUFE, D. (1987). Expression of the macrophage-specific colony-stimulating factor in human monocytes treated with granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Blood* 69: 1211-1217.

-IACOPETA, B.J.; MORGAN, E.H. y YEOH, G.C.T. (1982). Transferrin receptors and iron uptake during erythroid cell development *Biochim. Biophys. Acta* 687: 204-210.

-IBSEN, K.H.; CARDIN, J.P.jr; CHIN, R.M.C.; GARRAT, R.N.; MARLES, S.W.; DOTH, J.R. (1980). Distribution of pyruvate kinase isozymes in adult and developing "Xenopus laevis". *Comp. Biochem. Physiol* 65B: 473-480.

-ICHIKAWA, Y.; PLUZNIK, D.H.; SACHS, L. (1966). In vitro control of the development of macrophage and granulocyte colonies. *Proct. Natl. Acad. Sci USA* 56: 488-495.

-ISAAKS, R.E. y HARKNESS, D.R. (1983). Erythrocyte organic phosphates and hemoglobin functions in domestic mammals. *En Red Blood Cells of Domestic Mammals* pp.315-337 (Agard y Board, eds) Elsevier Sci Publ.

-ISCOVE, N.N.; SIEBER, F. y WINTERHALTER, K.H. (1974). Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose concavalin A. *J. Cell. Physiol* 83: 309-320.

-ISCOVE, N.N.; SIEBER, F. (1975). Erythroid progenitors in mouse bone marrow detected by macroscopic colony formation in culture. *Exp. Hematol* 3: 32-43.

-ISCOVE, N.N. (1977a). The role of erythropoietin in regulation of population size and cellcycling of early and

late erythroid precursors in mouse bone marrow. *Cell. Tiss. Kinetic* 10: 323-334.

-ISCOVE, N.N. (1977b). Erythropoietin independent regulation of early erythropoiesis *Exp. Hematol* 5 6-11.

-ISCOVE, N.N. (1978). Regulation of proliferation and maturation at early and late stages of erythroid differentiation. In *Cell Differentiation and Neoplasia* (Ed. Sanders) GF. pp 195-209. New York: Raven Press.

-JANSEN, G.; KOENDERMAN, L.; RIJKSEN, G.; PUNT, K.; DEKKER, A.W. y STAAL, G.E.J (1985). Age dependent behaviour of red cell glycolytic enzymes in haematological disorders. *Br. J. Haematol* 61: 51-59.

-JENKINS, J.D.; KEZDY, F.J.; STECK, T.L. (1985). Mode of interaction of phosphofructokinase with the erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem* 260: 10426-10433.

-JOHNSON, G.R. y METCALF, D. (1980). Detection of a new type of mouse eosinophil colony by Luxol-Fast-Blue staining. *Exp. Hematol* 8: 549-561.

-KAHN, A. y MARIE, J. (1982). Pyruvate kinase from human erythrocytes and liver. En *Methods in enzymology* vol.92, Academic Press, Inc.

-KAKINUMA, K.; FUKUHARA, Y. y KANEDA, M. (1987). The respiratory burst oxidase of neutrophils: separation of an FAD enzyme and its characterization. *J. Biol. Chem* 262: 12316-12322.

-KAWASAKI, E.S.; LADNER, M.B.; WANG, A.M.; Van ARDSELL, J.; WARREN, K.M.; COYNE, M.Y.; SCHWEICKART, V.L.; LEE, M.T.; WILSON, K.J.; BOOSMAN, A.; STANLEY, E.R.; RALPH, P.; MARK, D.F. (1985). Molecular cloning of a complementary DNA encoding human macrophage specific colony stimulating factor (CSF-1). *Science* 230: 291-296.

-KEATING, A.; SINGER, J.W.; KILLEN, P.D.; STRIKER, G.F.; SALO, A.C.; SANDERS, J.; THOMAS, E.D.; THORMING, D. y FIALKOW, P.J. (1982). Donor origin of the *in vitro* hematopoietic microenvironment after marrow transplantation in man. *Nature* 298: 280-283.

-KELLER, H.U.; WILKINSON, P.C.; ABERCROMBE, M.; BECKER, E.L.; HIRSCH, J.G.; MILLER, M.E.; RAMSEY, W.S. y ZIGMOND, S.H. (1977). *Clin. Exp. Immunol* 27: 377-382.

-KIDRON, M.; FIBACH, E.; KLEMES, Y. y MAYER, M. (1981). Changes in acid proteolytic activity during differentiation of murine erythroleukemia cells. *Cell. Differentiation* 10: 309-315.

-KIM, H.D. (1983). En "*Red Bloods Cells of Domestic Animals*" (NS Agar y PG Boards, eds) 339-355. Elsevier, Amsterdam.

-KLEBANOFF, S.F. (1988). Phagocytic cells: products of oxigen metabolism. En *Inflamation: Basic Principles and Clinical Correlates* (Ed: Gallin J I.; Goldstein I.M.; Snyderman R.) Raven Press, New York. p: 391.

-LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227: 680-685.

-LAJTHA, L.G. (1982). En "*Blood and its disorders*" (R.M. Hardisty y D.J. Weatherall eds) Blackwell, London. 57-75.

-LANE, T.A. y LAMKIN, G.E. (1984). A reassessment of the energy requirements for neutrophil migration: adenosine triphosphate depletion enhances chemotaxis. *Blood* 64: 986-993.

-LAYZER, R.B. (1975). Phosphofructokinase. En "*Methods in enzymology*" 52: 110-114. (Edited by W.A. Wood). Academic Press, New York.

-LEMISCHKA, I.R.; RAULET, D.H. y MULLIGAN, R.C. (1986). Developmental potential and dynamic behaviour of hematopoietic stem cells. *Cell* 45: 917-927.

-LIGHT, D.R.; WALSH C O'CALLAGHAN, A.M.; GOETZL, E.J.; TAUBER, A.I. (1981). Characteristics of the cofactor requirements for the superoxide generating NADPH oxidase of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemistry* 20: 1468-1476.

-LORD, B.I. (1983). Haemopoietic stem cells. En "*Stem cells: their identification and characterization*". C.S. Potten (ed). Churchill, Livingston. 118-144.

-LORD, B.I. y TESTA, N.G. (1988). The hemopoietic system: structure and regulation. En "*Haematopoiesis: long-term effects of chemotherapy and radiation*". § Cap. 1 (Testa, N.G. y Gale, R.P. eds). Marcell Dekker, Inc New York y Basel.

-LOWRY, O.M.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193: 264-275.

-LOWRY, O.H.; PASSONNEAU, J.V.; HASSELBERGER, F.X.; SCHULZ, D.W. (1964). Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J. Biol. Chem* 239: 18-22.

-LUBENIKOVA, E. I. y DOMARATSKAY, E.I. (1976). Changes in the number of the stem cells during cultivation of mouse bone marrow on a bed of fibroblastic-like cells. *Byull. Eksp. Biol. Med* 81: 718-719.

-MAGNANI, M.; DACHA, M.; STOCCHI, V.; NINFAHI, P. y FORNAINI, G. (1980). Rabbit red blood cell hexokinase. *J. Biol. Chem* 255: 1752-1756.

-MAGNANI, M.; STOCCHI, V.; DACHA, M. y FORNAINI, G. (1984). Rabbit red blood cell hexokinase: Intracellular distribution during reticulocytes maturation. *Mol. Cell Biochem* 63: 59-64.

-MAUCH, P.; GREENBERGER, J.S.; BOTNICK, L.; HANNON, E. y HELLMAN, S. (1980). Evidence for structural variation in self-renewal capacity within long term bone marrow cultures. *Proct. Nat. Sci USA* 77: 2927-2934.

-MAX-AUDIT, I.; TESTA, U.; KECEMIR, D.; TITENX, M.; VAINCHENKER, W. y ROSE, R. (1984) Pattern of pyruvate kinase isozymes in erythroleukemia cell lines and in normal human erythroblasts. *Blood* 64: 930-936.

-MARKERT, M.; GLASS, G.A. y BABIOR, B.M (1985). Respiratory burst oxidase from human neutrophils: purification and some properties. *Proct. Nat. Acad. Sci USA* 82: 3144-3148.

-MARKWELL, M.A.K. (1982). A new solid-state reagent to iodinate proteins *Anal. Biochem* 125: 427-432.

-McLEOD, R.A.; JONES, R.E.E. y ROBERTS, E. (1963). Glycolytic enzymes in the tissues of a salmonoid fish ("Salmo gairdnerii gairdnerii"). *Can. J. Biochem. Physiol* 41: 1971-1981.

-McPHAIL, J.C. y SNYDERMAN, R. (1983). Activation of the respiratory burst enzyme in human polymorphonuclear leukocytes by chemoattractants and other soluble stimuli. *J. Clin. Invest* 72: 192-200.

-McPHAIL, L.C.; CLAYTON, C.C. y SNYDERMAN, R. (1984). The NADPH oxidase of human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for regulation by multiple signals. *J. Biol. Chem* 259: 5768-5775.

-MEAGHER, R.C.; SALVADO, A.J. y WRIGHT, D.G. (1988). An analysis of the multilineage production of human

hematopoietic progenitors in long-term bone marrow culture: evidence that reactive oxygen intermediates derived from mature phagocytic cells have a role in limiting progenitor cell self-renewal. *Blood* 72: 273-281.

-MENDIETA, J. (1990). El receptor de transferrina. Un marcador del proceso de diferenciación para las células de la línea eritrocitaria. Tesis Doctoral. Universidad Alcalá Henares.

-METCALF, D. (1980). Clonal analysis of proliferation and differentiation of paired daughter cells: action of granulocyte-macrophage colony stimulating factor on granulocyte-macrophage precursors. *Proct. Natl. Acad. Sci USA* 77: 5327-5330.

-METCALF, D. (1984). The hemopoietic colony stimulating factors. Cap. 1. Elsevier Science Publishers B.V. PO Box 211, 1000 AE Amsterdam. The Netherlands, pp 1-26.

-METCALF, D. (1986). The molecular biology and functions of granulocyte macrophage colony stimulating factors. *Blood* 67: 257-267.

-METCALF, D. y McDONALD, H.R. (1975). Heterogeneity of in vitro colony and cluster forming cells in the mouse marrow. Segregation by velocity sedimentation. *J. Cell. Physiol* 85: 643-654.

-METCALF, D. y MERCHARN S. (1982). Effects of GM-CSF deprivation on precursors of granulocytes and macrophages. *J. Cell. Physiol* 112: 411-418.

-METCALF, D.; McDONALD, H.R.; ODARTCHENKO, N. y SORDAT, B. (1975). Growth of mouse megakaryocyte colonies in vitro. *Proct. Nat. Acad. Sci USA* 72: 1744-1748.

-METCALF, D.; NOSSAL, G.J.V.; WARNER, N.L.; MILLER, J.F.A.P.; MANDEL, T.E.; LAYTON, J.E. y GUTMAN, G.A.

(1975a). Growth of B-lymphocyte colonies in vitro. *J. Exp. Med* 142: 1534-1549.

-METCALF, D.; BEGLEY, C.G.; WILLIAMSON, D.J.; NICE, E.C.; DeLAMARTER, J.; MARMOD, J.J.; THATCHER, D. y SCHMIDT, A. (1987). Hemopoietic responses in mice injected with purified recombinant murine GM-CSF *Exp. Hematol.* 15: 1-9.

-MINTZ, B.; ANTHONY, K. y LITWEN, S. (1984). Monoclonal derivation of mouse myeloid and lymphoid lineages from totipotent hematopoietic stem cells experimentally engrafted in fetal hosts. *Proct. Nat. Acad. Sci USA* 81: 7835-7839.

-MOLINEUX, G. (1991). Synergistic interactions of growth factors in vivo. *IV Congreso de Investigación sobre el Cancer* p.175. Granada España.

-MOLINEUX, G.; TESTA, N.G.; HENDRY, J.H. y SCHOFIELD, R. (1987). The radiation sensitivity of the haemopoietic microenvironment effect of dose rate on ectopic ossicle formation. *Radiother. Oncol.* 10: 57-161.

-MOLLINEDO, F. y SCHNEIDER, D.L. (1984). Subcellular localization of cytochrome b and ubiquinone in a tertiary granule of resting human neutrophils and evidence for a proton pump ATPase. *J. Biol. Chem* 259: 7143-7150.

-MOORE, M.A.S. y WARREN, D.J. (1987). Synergy of interleukin 1 and granulocyte colony-stimulating factor: in vivo stimulation of stem cell recovery and hematopoietic regeneration following 5 fluorouracil treatment of mice. *Proct. Natl. Acad. Sci USA* 84: 7134-7138.

-MORRISEY, J.H. (1981). Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* 117: 307-310.

-MUEGGLER, P.A y BLACK, J.A. (1981). En "The red cell" G.J. Brewer, ed. 245-264. Liss, New York.

-MUNSON, P.J. y RODBARD, D. (1980). Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal. Biochem* 107: 220-239.

-MUTA, K.; NISHIMURA, J.; IDEGUCHI, H.; UMEMURA, T. y IBAYASHI, H. (1987). Erythroblast transferrin receptors and transferrin kinetics in iron deficiency and various anemias. *Am. J. Hematol* 25: 155-163.

-NECAS, E. y ZNOJIL, V. (1988). Bone marrow reponse to single small doses of irradiation: implications for stem cell functional organization. *Exp. Hematol* 16: 871-875.

-NEWBURGER, P.E.; CHOVANIEC, M.E. y COHEN, H.J. (1980). Activity and activation of the granulocyte superoxide generating system. *Blood* 55: 85-92.

-NGO, J.; CHUTE, H.; SANDERS, D.; ORLANDO, R e IBSEN, K. (1983). Regulation of pyruvate kinase expression and growth in mastocytoma cells. I. Initial observations. *Exp. Cell Res.* 149: 565-575.

-NICOLA, N.A; METCALF, D.; MATSUMOTO, M. y JOHNSON, G.R. (1983). Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. *J. Biol. Chem* 258: 9017-9023.

-NICOLA, N.A. (1989). Hematopoietic cell growth factors and their receptors. *Annu. Rev. Biochem* 58: 45-77.

-NICOLA, N.A. (1990). Granulocyte colony stimulating factor. Cap. 3. En *Colony stimulating factors. Molecular and Cellular Biology*. Immunology series vol.49. Dexter, M.; Garland, J.M. y TESTA, N. G. Eds. Marcel Dekker, Inc. New York y Basel.

-NIJHOF, W.; WIERENGA, P.K.; STAAL, G.E.J. y JANSEN, G. (1984). Changes in activities and isozyme patterns of glycolytic enzymes during erythroid differentiation in vitro. *Blood* 64: 607-613.

-NOGUCHI, T.; INOUE, H. y TANAKA, T. (1986). The M1 and M2 type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing *J. Biol. Chem* 261: 13807-13812.

-NUNEZ, M.P.; GLASS, J.; FISCHER, S.; LAVIDOR, L.M.; LENK, E.M. y ROBINSON, S.H. (1977). Transferrin receptors in developing murine erythroid cells *Br. J. Haematol* 36: 519-526.

-OEZ, S.; TITTELBAACH, H.; FAHSOLD, R.; SCHAETZL, R.; BÜHRER, C.; ATZPODIEN, J. y KALDEN, J. (1990). Establishment and characterization of a granulocyte-macrophage colony stimulating factor dependent human myeloid cell line. *Blood* 76: 578-582.

-O'FARELL, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem* 250: 4007-4021.

-O'FARELL, P.Z.; GOODMAN, H.M. y O'FARELL, P.H. (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12: 1133-1142.

-OSKAM, R.; RIJKSEN, G.; STAAL, G.E.J. y VORA, S. (1985). Isozymic composition and regulatory properties of phosphofructokinase from well-differentiated and anaplastic medullary thyroid carcinomas of rat. *Cancer. Res* 45: 135-142.

-OKADA, S.; SUDA, T.; MIURA, Y.; NISHIKAWA, S.I.; NAGAYOSHI, K. y NAKAUCHI, H. (1991). Expression and function of c-kit encoded molecule on hemopoietic stem cells. *Exp. Hematol* 19: 466 abs.39.

-PESCHEL, C.; PAUL, W.E.; O'HARA, J. y GREEN, I. (1987). Effects of B-cell stimulatory factor 1/IL-4 on haemopoietic progenitor cells. *Blood* 70: 254-263.

-PHILLIPS, R.A. (1985). Comparison of different assays for multipotent hematopoietic stem cells. En *Mediators in cell growth and differentiation*. R.J. Ford and A.L. Maizel, eds (New York: Raven Press) 135-145.

-PLUZNIK, D.H. y SACHS, L. (1965). The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J. Cell. Comp. Physiol* 66: 319-324.

-PURICK, D.L.; FROMM, H.J. y RUDOLPH, F.B. (1973). The hexokinases: kinetic, physical and regulatory properties *Adv. Enzymol* 39: 249-326.

-QUESENBERRY, P.J.; COPPOLA, M.A. y GUALTERI, R.J. (1984). Lithium stimulation of murine hematopoiesis in liquid cultures : An effect mediated by marrow stromal cells. *Blood* 63: 121-127.

-RAPOPORT, S.M. (1974). The regulation of glycolysis in mammalian erythrocyte. En *Assays in Biochemistry* vol. 4 (Campbell, P. y Creville, G.D. eds) Academic Press. New York 69-103.

-REED, S.G.; NATHAN, C.F.; PIHL, O.L.; RODRICKS, P.; SHANEBECK, K.; COUSON, P.J. y GRABSEIN, K.H. (1987). Recombinant GM-CSF activates macrophages to inhibit *Typanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide. *J. Exp. Med* 166: 1734-1746.

-REIMAN, R.; KLATT, D.; TSAMALONKAS; A.G. y MARETZKI, D. (1981). Membrane phosphorylation in intact human erythrocytes *Acta Biol. Med. Germ* 40: 487-493.

-RENNICK, D.; YANG, G.; MULLER-SIEBENRG, C.; SMITH, C.; ARAI, N.; TAKABA, Y. y GEMMELI, L. (1987). IL-4 (B cell stimulatory factor 1) enhance or antagonise the factor dependent growth of haemopoietic progenitor cells *Proct. Nat. Acad. Sci USA* 84: 6889-6893.

-REINCKE, U.; HANNON, E.C. y HELLMAN, S. (1982). Residual radiation injury exhibited in long-term bone marrow cultures *J. Cell. Physiol* 112: 345-352.

-RIJKSEN, G.; AKKERMAN, J.W.N.; VAN den WALL BAKE, A.W.L.; HOFSTEDE, D.P. y STAAL, G.E.J. (1983). Generalized hexokinase deficiency in the blood cells of a patient with nonspherocytic hemolytic anemia. *Blod*: 61: 12-18.

-ROGERS, P.A.; BRENTON, D.P.; HOPKINSON, D.A. (1980). Changes in the activity and isozyme patterns of glycolytic enzymes during stimulation of hormonal human lymphocytes with phytohaemagglutinin *Ann. Hum. Genet* 42: 213-218.

-ROSE, Z.B.; LIEBOWITZ, J. (1970). Direct determination of 2,3 diphosphoglycerate. *Anal. Biochem* 35: 177-182.

-ROSSI, F. (1986). The O<sub>2</sub><sup>-</sup> forming NADPH oxidase of the phagocytes: nature, mechanisms of activation and function. *Biochim. Biophys. Acta* 853: 65-89.

-ROTHENBERG, M.E.; OWEN, W.F.; SILBERSTEIN, D.S.; WOODS, J.; SILVERMAN, R.J.; ANSTEN, K.F. y STEVENS, R.L (1988). Human eosinophils have prolonged survival enhanced functional properties and become hypodense when exposed to human IL-3. *J. Clin. Invest* 81: 1986-1992.

-RODRIGUEZ HORCHE (1988). Piruvatoquinasa en células eritroides de médula ósea, reticulocitos y eritrocitos de sangre circulante. Tesis Doctoral. Universidad Alcalá Henares.

- SASAKI, R.; IKURA, K.; NARITA, H.; YANAGAWAS, S. y CHIBA, H. (1982). 2,3 bisphosphoglycerate in erythroid cells. *Trends, Biochem. Sci* 7: 140-142.
- 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 y DEXTER, TM. (1981). CFU-S repopulation after low-dose whole body radiation *Rad. Res* 89: 607-617.
- SCHRADER, J.W y CLARK-LEWIS, I (1982). A T-cell derived factor stimulating multipotential haemopoietic stem cells molecular weight and distribution from T cell growth factor and T cell derived GM-CSF. *J. Immunol* 129: 30-35.
- SEGAL, A.W. y JONES, O.T. (1979). The subcellular distribution and some properties of the cytochrome b component of the microbicidal oxidase system of human neutrophils. *Biochem. J.* 182: 181-188.
- SEGAL, A.W. y JONES, O.T. (1980). Rapid incorporation of the human neutrophil plasma membrane cytochrome b into phagocytic vacuoles. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 92: 710-715.
- SEGAL, A.W. (1985). Variaciones sobre el tema de la enfermedad granulomatosa crónica. *The Lancet* (ed. esp) 7: 51-59.
- SEGAL, A.W (1989). The electron transport chain of the microbicidal oxidase of phagocytic cells and its involvement in the molecular pathology of chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest* 83: 1785-1793.
- SELIGMAN, P.A.; SCHLEICHER, R.B. y ALLEN, R.H. (1979). Isolation and characterization of the transferrin receptor from human placenta. *J. Biol. Chem* 254: 9943-9946.

-SETECHENSKA, M.S. y ARNSTEIN, H.R.V. (1978). Changes in lactate dehydrogenase isozyme pattern during differentiation of rabbit bone marrow erythroid cells. *Biochem. J.* 170: 193-199.

-SEUBERT, W. y SCHONER, W. (1971). In Current Topics in cellular regulation. vol.3 (eds BL Horecker y ER Stadtman) Academic Press inc. New York and London 237-267.

-SIBILLE, J.C.; OCTAVE, J.N.; SCHNEIDER, Y.J.; TROUVET, A. y CRICHTON, R.R (1982). Transferrin protein and iron uptake by cultured hepatocytes *Febs Lett* 150: 365-369.

-SILBERSTEIN, D.S.; AUSTEN, K.F. y OWEN, W.J. (1989). En *hematopoietic growth factors (hematology/Oncology clinics of North America* vol.3. Golde, D.W., ed. pp.511-533, W.J. Saunders.

-SIMINOVITCH, L.; McCULLOCH, E.A. y TILL, J.E. (1963). The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J. Cell. Comp. Physiol* 62: 327-336.

-SMITH, J.E. (1991). Comparative hematology. En *Hematology* 4 ed. International Edition (Williams J. Williams y col, eds). Cap. 15 pp.118-125.

-SMOLEN, J.E. y BOXER L.A. (1990). Functions of neutrophils En *Hematology* (Williams, W.; Beutler, E.; Erslev, A.J. y Litchman, M.A.) Cap. 83 p 780-794. 4ªEd. International edition.

-SONODA, Y.; YANG, Y.G.; WONG, G.G.; CLARK, S.C. y OGAWA, M. (1988). Erythroid burst-promoting activity of purified recombinant human GM-CSF and interleukin 3 sera and studies in serum free culture *Blood*, 72: 1381-1387.

-SORELL, J.M y WEISS, L. (1980). Cell interactions between hematopoietic and stromal cells in the embryonic chick bone marrow. *Anat. Rec* 197: 1-19.

- SPARROW, L.G.; METCALF, D.; HUNKAPILLER, M.W.; HOD, J.E. y BURGESS, A.W. (1985). Purification and partial aminoacid sequence of murine granulocyte macrophage colony stimulating factor. *Proct. Natl. Acad. Sci USA* 82: 292-296.
- SPIEGEL, M.R. (1970). En "Teoría y problemas de estadística" (Mcgrawhill, Ed). Mexico.
- SPIRAK, J.L.; SMITH, R.R e IHLE, J.N. (1985). Il-3 promotes the in vitro proliferation of murine pluripotent hematopoietic stem cells. *J.Clin. Invest.* 76: 1613-1621.
- SPOONCER, E.; HEYWORTH, C.M.; DUNN, A. y DEXTER, T.M. (1986). Self-renewal and differentiation of Il-3 dependent multipotential stem cells are modulated by stromal cells and serum factors. *Differentiation* 31: 111-118.
- STANLEY, E.R. y HEARD, P.M. (1977). Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse cells *J. Biol. Chem* 252: 4305-4312.
- STEPHENSON, J.R.; AXERLAD, A.A.; McLEOD, D.L. y SHREEVE, M.M. (1971). Induction of colonies of hemoglobin synthesis cells by erythropoietin in vitro. *Proct. Natl. Acad. Sci USA* 68: 1542-1546.
- STOCCHI, V.; MAGNANI, M.; CANESTRARI, F.; DACHA, M. y FORNAINI, G. (1982). Multiple forms of human red blood cell hexoquinase. Preparation characterization and age dependence. *J. Biol. Chem* 257: 2357-2364.
- STUDIER, F.W. (1973). Analysis of bacteriophage T7 early RNA's and proteins on slab gels. *J. Mol. Biol.* 79: 237-248.
- SULLIVAN, R.; FREDETTE, J.P.; SOCINSKI, M.; ELIAS, A.; ANTMAN, K.; SCHNIPPER, L. y GRIFFIN, J.D. (1989). Enhancement of superoxide anion release by granulocytes harvested from patients receiving granulocyte macrophage

colony stimulating factor. *Br. J. Haematol* 71: 475-479.

-SUTHERLAND, D.R.; DELIA, D.; SCHEIDER, C.; NEWMAN, R.A.; FEMSHEAD, J y GREAVES, M.F. (1981). Ubiquitous cell surface glycoproteins on tumor cell is proliferation associated receptor for transferrin. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 78: 4515-4519.

-SUZUKI, C.; OKANO, A.; TAKATSUKI, F.; MIYOSAKA, Y.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; EJIMA, D. y AKIYAMA, Y. (1989). Continuous perfusion with Il-6 enhances production of hematopoietic stem cells (CFU-S). *Biochem. Biophys. Res. Commun* 159: 933-938.

-TAETLE, R.; RALPH, S.; SMEDSRUD, S. y TROWBRIDGE, I. (1987). Regulation of transferrin receptor expression in myeloid leukemia cells. *Blood* 70: 852-859.

-TAKEGAWA, S.; FUJII, H. y MIWA, S. (1983). Change of development of the red cell. *Br. J. Haematol* 54: 467-474.

-TAVASSOLI, M. (1976). Ultrastructural development of bone marrow adipose cell. *Acta Anal.* 94: 65-77.

-TAVASSOLI, M. y TAKAHASHI, K. (1982). Morphological studies on long term culture of marrow cells: characterization of the adherent stromal cells and their interactions in maintaining the proliferation of hemopoietic stem cells. *Am. J. Anatomy* 164: 91-111.

-TEI, I.; MAKINO, Y.; SAKAGAMI, H.; KANAMURA, I. y KONNO, K. (1982). Decrease of transferrin receptor during mouse myeloid leukemia (M1) cell differentiation. *Biochem. Biophys. Res Commun* 107: 1419-1424.

-TEJERO, C.; LORD, B.I.; MASON, T.M. y HENDRY, J.H. (1988). Long term haemopoietic injury in mice after repeated irradiation: precursor cell cycling and its regulation. *Eur. J. Haematol* 41: 278-284.

- TEJERO, C.; TESTA, N.G. y HENDRY, J.H. (1989). Decline in cycling of granulocyte macrophage colony forming cells with increasing age in mice. *Exp. Hematol* 17: 66-67.
- TESTA, N.G. (1979). Erythroid progenitor cells: their relevance for the study of haematological disease. *Clin. Haematol* 8: 311-333.
- TESTA, N.G.; HENDRY, J.H. y MOLINEUX, G. (1985). Long term bone marrow damage in experimental systems and in patients after radiation or chemotherapy. *Anticancer. Res.* 5: 101-110.
- TESTA, N.G.; HENDRY, J.H. y MOLINEUX, G. (1989). Long term marrow damage after cytotoxic treatment. Stem cells and microenvironment. En "Hematopoiesis. Long term effects of chemotherapy and radiation" (Testa, NG y Gale, RP eds). vol.8 hematology series Editor 75-91.
- TILL, J.E. y McCULLOCH, E.A (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal bone marrow cells. *Rad. Res* 14: 213-222.
- TROWBRIDGE, I.S. y OMARY, M.B. (1981). Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is teh receptor for transferrin. *Proc. Natl. Acad. Sci usa* 78: 3039-3043.
- TSUBOI, I.; MARMOTO, K.; HORIE, T. y MORI, K.J. (1991). Age-related changes in various hemopoietic progenitor cells in senescence accelerated (SAM-P) mice. *Exp. Hematol* 19: 874-877.
- TSUCHIYA, M.; ASANO, S.; KAZZIRO, Y. y NAGATA, S. (1986). Isolation and characterization of the cDNA for murine granulocyte colony stimulating factor. *Proct. Natl. Acad. Sci usa* 83: 7633-7637.

-TSUJI, K.; NAKAHATA, T.; TAKAGI, M.; KOBAYASHI, T.; ISHIGURO, A.; KIKUCHI, T.; NAGANUMA, K.; KOIKE, X.; MIYAJIMA, A.; ARAI, K y AKABANE, T. (1990). Effects of IL-3 and IL-4 on the development of connective tissue type mast cells: IL-3 supports their survival and IL-4 triggers and supports their proliferation synergistically with Il-3. *Blood* 75: 421-427.

-UYEDA, K. (1979). Phosphofructokinase. En "Advances in enzymology" 48 (Meister, A. ed) J. Wiley. New York 193-244.

-UDUPA, K.B. y LIPSCHITZ, D.A. (1987). Effect of donor and culture age on the function of neutrophils harvested from long term bone marrow culture. *Exp. Hematol* 15: 212-216.

-VADAS, M.A.; NICOLA, N.A. y METCALF, D. (1983). Activation of antibody dependent cell mediated cytotoxicity of human neutrophils and eosiniphils by separate colony stimulating factors. *J. Immunol* 130: 795-799.

-VALENTINE, W.N. y PAGLIA, D.E. (1984). Erythrocyte enzymopatias hemolytic anemia and multisystem disease . An annotated review. *Blood* 64: 583-591.

-VAN BERKEL, J.C. y KOSTNER, J.F. (1973). M type pyruvate kinase of leukocytes: on allosteric enzyme *Biochem. Biophys.Acta* 203: 134-139.

-VAN KAMPEN, E.J. y ZIJLSTRA, W.G. (1961). Standarization of hemoglobinometry: I the extinction coefficient of hemoglobin cyamide at 540 nm *Clin. Chim. Acta* 6: 538-544.

-VAN VEELLEN, C.; RIJKSEN, G.; VLUG, A. y STAAL, G. (1981). Correlation between alanine inhibition of pyruvate kinase and composition of KM hybrids. *Clin. Chim. Acta* 110: 113-120.

-VIVES-CARRONS, J.L.; PUJADES, M.A.; AQUILAN, J.L.; FELIV, E. y JOU, J.M. (1980). *Sangre* 25: 51-62.

-VORA, S. (1983). Isozymes of phosphofructokinase: biochemical and genetics aspects. *Isozymes. Curr. Top. Biol. Med. Res* 11: 3-23.

-VORA, S.; HALPER, J.P. y KNOWLES, D.M. (1985). Alterations in the activity and isozymic perfile of human phosphofructokinase during malignant transformation "in vivo" and "in vitro". Transformation and progression linked discriminants of malignacy. *Cancer. Res* 45: 2953-3001.

-WEISDORF, D.J.; GRADDOCK, P.R. y JACOB, H.S. (1982). glycogenolysis versus glucose transport in human granulocytes: differential activation in phagocytosis and chemotaxis. *Blood* 60: 888-893.

-WEISS, L. y CHEN, L.T. (1975). The organisation of hematopoietic cords and vascular sinuses in bone marrow. *Blood. cells* 1: 617-638.

-WEISS, L. (1980). The haematopoietic microenvironment of bone marrow: an ultrastructural study of the interactions of blood cells, stroma and blood vessels. En "Blood cells and vessel walls: Functional interactions. Elsevier North Holland: Ciba Foundation series 71: 3-19.

- WESTHEAD, E.W.; KIENER, P.A.; CARROLL, D. y GIKNER, J. (1984). Control of oxigen delivery from the erythrocyte by modification of pyruvate kinase *Eur. Top. Regulation* 24: 21-34.

- WHETTON, A.D. y DEXTER, T.M. (1983). Effect of haemopoietic cell growth factor on intracellular ATP levels. *Nature* 303: 629-631.

- WHETTON, A.D.; BAZILL, G.W. y DEXTER, T.M. (1985). Stimulation of Hexose uptake by haemopoietic cell growth factor occurs in Wehi-3b myelomonocytic leukaemia cells: A possible mechanism for loss of growth control. *J. Cell. Physiol.* 123: 73-78.

- WHETTON, A.D.; DEXTER, T.M. (1989). Myeloid haemopoietic growth factors. *Biochim. Biophys. Acta* 989: 111-132.
- WHETTON, A.D.(1990). The biology and clinical potential of growth factors that regulate myeloid cell production. *TIPS*. 11: 285-289.
- WICKRAMASINGHE, S.N. (1986). Composition and functions of normal blood: normal haematological values. En *Hematology* 2<sup>a</sup> ed (Beutler, E).
- WIDMER, M.B. y GRABSTEIN, K.H. (1987). Regulation of cytolytic T-lymphocyte generation by B-cell stimulatory factor. *Nature*. 326: 795-798.
- WILKINSON, P.C. (1982). En "Chemotaxis and inflammation". 2th Ed. pp 1-25. Churchill Livingstone, New York.
- WILLIAMS, R.J.P. (1985). *Eur. J. Biochem.* 150: 231-248.
- WILLIAMS, N.H.; JACKSON, A.P.C.; SHERIDAN, M.J.; MURPHY, A.E. y MOORE, M.A.S. (1978). Regulation of megakaryopoiesis in long term murine bone marrow cultures. *Blood*. 51: 245-255.
- WILLIAMS, N.; BERTONCELLO, I.; KAYNOUDINAS, H.; ZSEBO, K. y McNIECE, I. (1991). Recombinant rat stem cell factor stimulates amplification and differentiation of purified mouse haemopoietic stem cell. *Exp. Hematol.* 19: 501. Abs. 166.
- WILSON, F.D.; O'GRADY, L.; McNEILL, M.C. y MUNNS, J.L. (1974). The formation of bone marrow derived fibroblastic plaques in vitro: Preliminary results contrasting these population to CFU-C. *Exp. Hematol.* 2: 343-354.
- WONG, G.G.; WITEK, J.S.; TEMPLE, K.M.; WILKENS, A.G.; LEARY, D.P.; LUXENBERG, S.S.; JONES, E.L.; BROWN, R.M.; KAY, R.M.; ORR, E.C.; SHOEMAKER, C.; GOLDE, D.W.; KAUFMMAN,

R.M.; HEWICK, R.M.; WANG, E.A. y CLARK, S.C. (1985). Human GM-CSF: molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. *Science* 228: 810-815.

- XU, C.X.; HENDRY, J.H. y TESTA N.G. (1983). The response of stromal progenitor cells in mouse marrow to graded repeated doses of X-rays or neutrons. *Rad. Res.* 96: 82-89.

- XU, C.X.; MOLINEUX, N.G. y HENDRY, J.H. (1986). Long term damage to haemopoietic cell subpopulation in mice after repeated treatment with BCNU or cyclophosphamide. *Br. J. Cancer.* 53: 174-176.

- YAMAGUCHI, Y.; SUDA, T.; SUDA, J.; EGUCHI, M.; MIURA, Y.; HARADA, N.; TOMINGA, A. y TAKATGSKU, K. (1988). Purified interleukin 5 support the terminal differentiation and proliferation murine eosinophilic precursors. *J. Exp. Med.* 167: 43-56.

- YUO, A.; KITAGAWA, S.; OHSAKA, A.; SAITO, M. y TAKAKU, F. (1990). Stimulation and priming of human neutrophils by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors: qualitative and quantitative differences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171: 491-497.

- ZIMMERLI, W.; LEW, P.D.; COHEN, J.H. y WALDVOGEL, F.A. (1984). Comparative superoxide generating system of granulocytes from blood and peritoneal exudates. *Infc. Immunity* 46: 625-630.

- ZIMRAM, A.; FORMAN, L.; SUZUKI, T.; DALE, G.L. y BEUTLER, E. (1990). In vivo aging of red cell enzymes: study of boitynylated red blood cell in rabbits. *Am. J. Hematol.* 33: 249-254.

- ZINKL, J.G. (1989). Leukocyte function. En "Clinical Biochemistry of Domestic Animals". 4th. Ed. (J. Kaneko ed.)

Academic Press. Inc. pp 316-337.