

Formación de los glóbulos rojos de la sangre

por Julio Coll Morales

Mediante cultivos en medio semisólido se han podido identificar dos clases de precursores diferentes de los glóbulos rojos de la sangre y estudiar factores moleculares estimuladores de su crecimiento y diferenciación, como la eritropoietina y la transferrina.

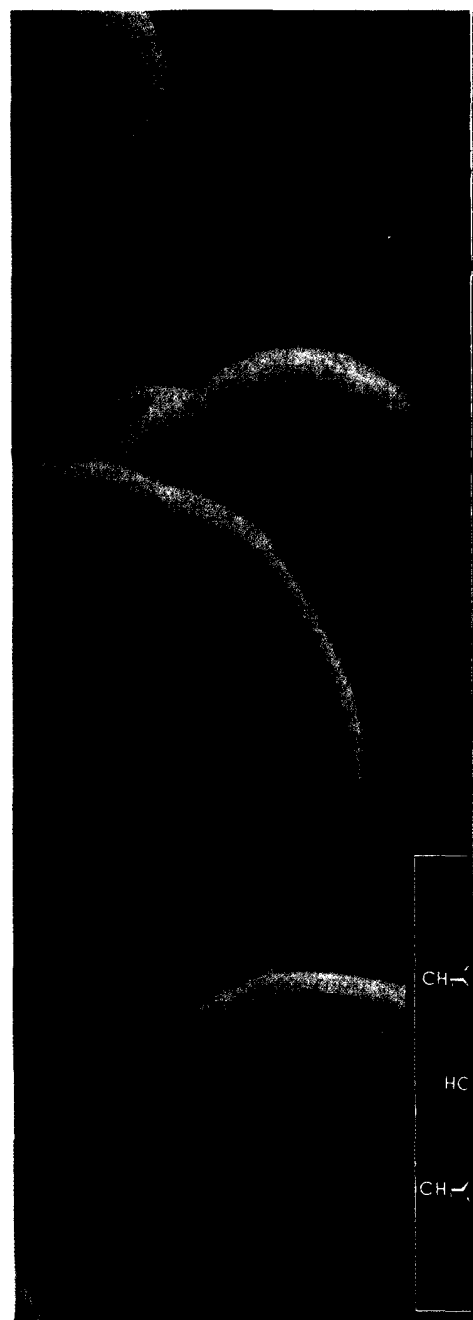
La mayor parte de las células que circulan en nuestra sangre son eritrocitos, más conocidos como glóbulos rojos. Pero, ¿dónde y cómo se originan? ¿Cómo se regeneran después de una hemorragia? ¿Cómo controla nuestro organismo su abundancia? Muchos investigadores se han planteado estas preguntas u otras similares, a través de la experimentación, tanto in vivo, utilizando el animal completo, como in vitro, utilizando cultivos celulares. Gran parte del esclarecimiento de estas cuestiones se debe a las técnicas de cultivos en medios semisólidos que han permitido estudiar la progenie de precursores celulares individuales.

En el animal adulto, el proceso de formación de los glóbulos rojos se localiza principalmente en la médula ósea y en el bazo. Cada uno de los tipos celulares que circulan en la sangre: glóbulos rojos, linfocitos, granulocitos, macrófagos y plaquetas se derivan de una célula madre común. Las células madres primitivas se encuentran en el embrión y después aparecen en la circulación sanguínea mientras emigran a la médula ósea y al bazo. Dos poblaciones de glóbulos rojos hacen su aparición al principio y al final del desarrollo embrionario, la línea primitiva y la línea definitiva, respectivamente. La línea primitiva desaparece de la circulación

durante la vida embrionaria y parece consistir en múltiples divisiones celulares en cadena mientras que la línea definitiva consiste en células madres autorregenerativas que se dividen y diferencian alternativamente dependiendo de las necesidades fisiológicas de células rojas (figura 1). Las líneas primitiva y definitiva difieren morfológica y molecularmente; por ejemplo, en las hemoglobinas que contienen. Las hemoglobinas, localizadas específicamente en los eritrocitos, son proteínas transportadoras de oxígeno.

En el proceso de formación de los glóbulos rojos de la sangre, tanto la proliferación o división celular como la diferencia-

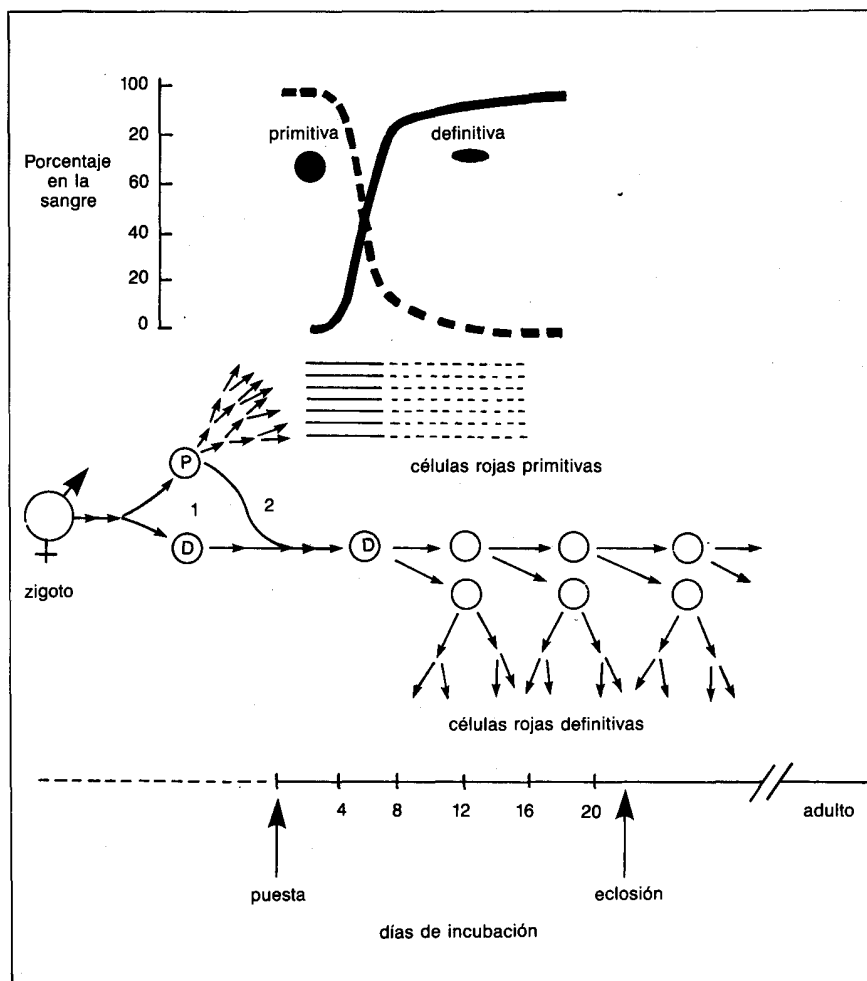
ción o adquisición de la capacidad para sintetizar hemoglobina parecen estar reguladas por factores hormonales producidos por el animal. Una vez que la célula madre se ha «decidido» a diferenciarse en glóbulos rojos, se divide en varias veces para dar lugar a las células sensibles al regulador hormonal de su fabricación. Estas células preparadas para la diferenciación se denominan eritroblastos, siendo características morfológicas de todos ellos su gran tamaño y aspecto ameboso (figura 2). Estas células son activas en síntesis macromolecular: ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico de los ribosomas (ARN-r), ácido ribonucleico mensajero (ARN-m) y pro-



Julio Coll Morales es investigador principal en el Depto. de Sanidad Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias del Ministerio de Agricultura.

Los glóbulos rojos, vistos en una fotografía obtenida con el microscopio electrónico de barrido, tienen como misión transportar el oxígeno desde los pulmones hacia las células del cuerpo. Un adulto posee unos cinco millones de glóbulos rojos por milímetro cúbico de sangre, o sea veinticinco trillones en la totalidad de la sangre. Su conjunto cubriría una superficie de unos 2500 m². Cada segundo se producen y se destruyen de dos a tres millones; toda la sangre de un individuo se renueva en dos o tres meses. El componente principal de los glóbulos rojos es la hemoglobina que fija para ellos el oxígeno. Las moléculas de hemoglobina están formadas por cuatro proteínas.

Figura 1. Origen embrionario de las células rojas. El esquema muestra la hipótesis del origen de la serie primitiva y de la serie definitiva de las células rojas según los resultados de los trabajos en embrión del pollo de Vernon Ingram, del Massachusetts Institute of Technology. 1 y 2 son modelos alternativos. La serie primitiva desaparece de la circulación durante el desarrollo embrionario y parece consistir en múltiples divisiones en cadena a partir de una célula precursora P. La serie definitiva hace su aparición durante el desarrollo embrionario para constituir el total de las células rojas de la sangre del adulto, a partir de células precursoras D autorregenerativas.



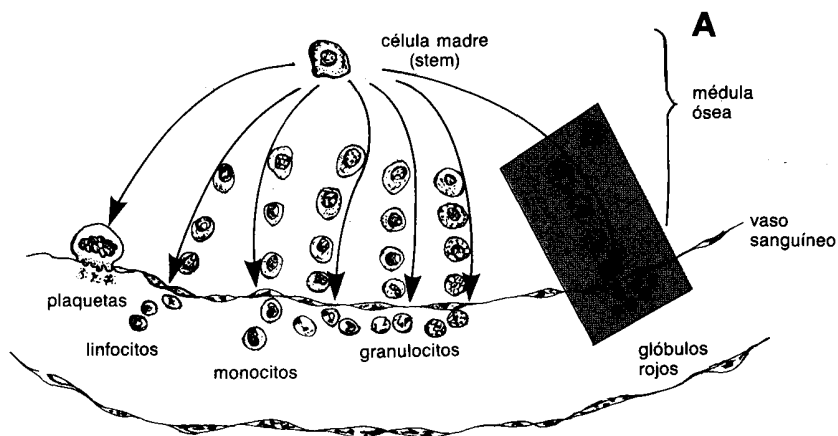
teínas. Tras recibir la señal hormonal, el eritroblasto se divide y comienza su diferenciación, caracterizada por una serie de cambios bioquímicos que se manifiestan en alteraciones morfológicas observables al microscopio óptico mediante coloración con benzidina. Progresivamente va disminuyendo su carácter ameboide y su tamaño a la vez que el núcleo sufre una condensación. El citoplasma cambia de coloración como consecuencia de la síntesis y consiguiente acumulación de hemoglobina, lo que se manifiesta en un viraje de su color de tinción desde el azul (benzidina-negativo) hasta el anaranjado (benzidina-positivo), pasando por el gris. Estos estados se deno-

minan eritroblastos policromatófilos: temprano, medio y tardío. La célula resultante después de unas 4-5 divisiones celulares es el llamado reticulocito, que está empaquetado con hemoglobina, contiene ribosomas y que es inactivo en síntesis de ADN y ARN, aunque continúa sintetizando globina gracias al ARN mensajero estable. El eritrocito maduro o célula roja completamente hemoglobinizada carece de síntesis macromolecular y es redondo sin núcleo, en los mamíferos y oval con núcleo en el resto de los vertebrados (figura 2).

¿Cuáles son las señales hormonales que deciden a dividirse y a diferenciarse a los precursores de los glóbulos rojos? Desde el

descubrimiento de la regulación de la formación de glóbulos rojos de la sangre o eritropoiesis mediante señales hormonales en 1906 por Carnot y Deflandre, se ha hecho un considerable esfuerzo investigador para esclarecer y entender los mecanismos de esta regulación. Las investigaciones han incluido el diseño de métodos de ensayo para señales hormonales, el aislamiento de las hormonas reguladoras, su caracterización química, el esclarecimiento de su mecanismo regulador *in vivo*, su posible potencial clínico y últimamente el análisis de sus efectos utilizando cultivos en medios semisólidos de las células precursoras de los glóbulos rojos. Este último método ha permiti-

Figura 2. Diferenciación del eritroblasto. Los glóbulos rojos se originan a partir de los eritroblastos, que a su vez se derivan de las células madres pluripotenciales de la médula ósea. Las células madres («stem») dan lugar a las plaquetas, linfocitos, monocitos, diversas clases de granulocitos y a los glóbulos rojos (A). Los cambios progresivos del eritroblasto hasta llegar al glóbulo rojo se esquematizan en B. Este proceso de diferenciación celular se caracteriza por: aumento del contenido de hemoglobina, disminución de la síntesis macromolecular, disminución del tamaño del núcleo (hasta su expulsión en el caso de mamíferos), pérdida del carácter ameboide y pérdida de mitocondrias, entre otros. Los colores que aparecen en la figura son similares a los que se observan con una tinción doble a base de hematoxilina y benzidina. Los niveles de otras variables son indicativos.

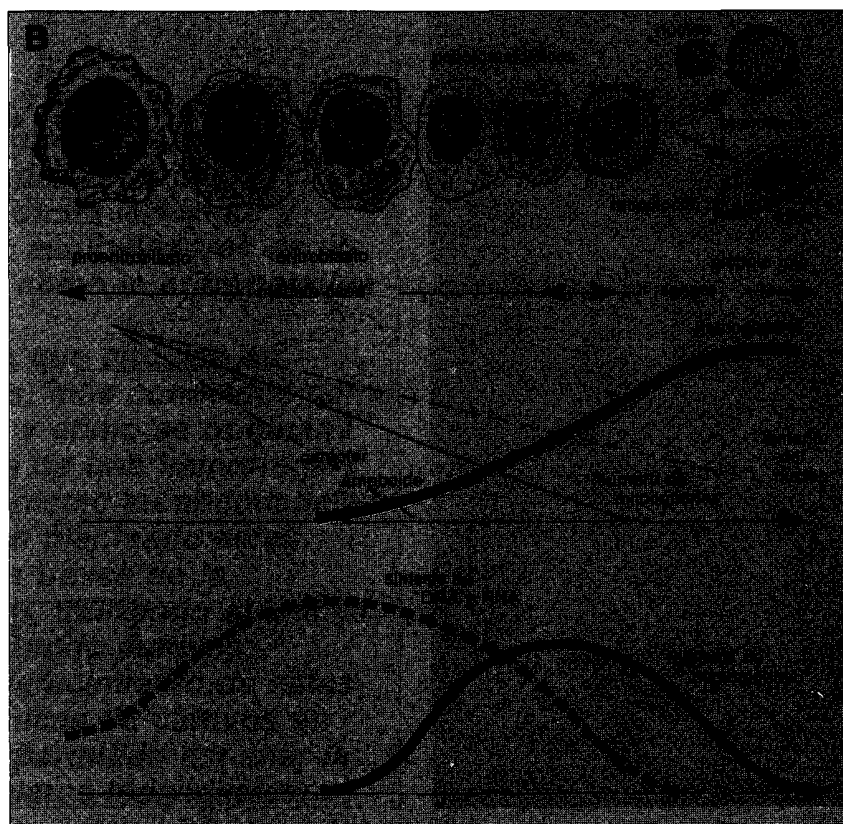


do ahondar en los mecanismos reguladores. La gran mayoría de estos estudios se han dirigido a la eritropoiesis en mamíferos.

El aumento del número de glóbulos rojos en el conejo normal después de una inyección de suero sanguíneo procedente de un conejo anémico, fue la primera observación que dio origen a la hipótesis de la regulación hormonal de la eritropoiesis (figura 3). Este resultado fue confirmado en la mayoría de los vertebrados por gran número de investigadores. A partir de estas experimentaciones, la investigación continuó lentamente y no fue hasta 1953 en que se pudo establecer que el suero de animales anémicos contenía un factor estimulante específico para la formación de glóbulos rojos y no de otras líneas celulares de la sangre, como glóbulos blancos, macrófagos, plaquetas, etc. Este factor se denominó eritropoietina, que por su definición es la hormona que aumenta el número de células rojas en circulación, encontrándose en concentración muy baja en un animal normal y aumentando unas 100 veces en anemias severas.

Los primeros criterios para la detección de la eritropoietina en suero, plasma, orina o fracciones derivadas de ellos usaban medidas del aumento en: número de glóbulos rojos, hematocritos, número de reticulocitos, concentración de hemoglobina, etc. Con la demostración, hacia 1960, de que la incorporación de un isótopo radioactivo del hierro (Fe^{59}) en las células rojas circulantes constituye un método más simple, sensible y reproducible que cada uno de los otros criterios, este método ha sido usado desde entonces para determinar la actividad de eritropoietina de cualquier muestra biológica. El método utiliza ratones cuya eritropoiesis se ha reducido al mínimo mediante transfusión de células rojas varios días antes de inyectarles la sustancia a ensayar, para aumentar de esta forma su sensibilidad.

Hasta ahora todos los intentos de purificar eritropoietina de mamíferos se han realizado mediante ensayos *in vivo* tales como el descrito. Como fuente de eritropoietina se ha utilizado plasma procedente de ovejas con anemia inducida o bien orina de pacientes con anemias agudas. La purificación de eritropoietina es una empre-



sa ardua y difícil debido a su pequeña concentración en el suero incluso en animales anémicos, a las dificultades de obtener grandes cantidades de material biológico y al poco rendimiento de los procedimientos de extracción, este último hecho debido, al menos parcialmente, a la inestabilidad de la molécula. Eugene Goldwasser y su grupo en la Universidad de Chicago han dirigido los prácticamente únicos esfuerzos en este campo durante más de 30 años. Hacia 1977 consiguieron aislar 8 mg de eritropoietina humana purificada a partir de varios miles de litros de orina de pacientes anémicos. De sus esfuerzos y de los de otros investigadores podemos decir que la eritropoietina, tanto la procedente de oveja anémica como la

procedente de pacientes anémicos, es una proteína que contiene entre 20-30% de carbohidratos y cuyo peso molecular está entre 35 000-40 000. Esta hormona demuestra la heterogeneidad en métodos de fraccionamiento que utilizan la carga molecular. Así, en isoelectroenfoque, técnica que separa moléculas según el pH en el que su carga neta se hace 0, la eritropoietina demuestra varios picos de actividad entre pH 3,5 y 4. Si a la molécula se le separa parte del componente de carbohidrato, su isoelectroenfoque se produce ahora a pH 5-6,5 y con un grado similar de heterogeneidad. Las moléculas con isoelectroenfoque mayor de pH 4 no tienen actividad biológica *in vivo* y sólo pueden ser detectadas por méto-

Figura 3. Demostración del control hormonal de la eritropoiesis. Se comienza reduciendo el número de células rojas en la sangre (anemia) en un animal experimental, por ejemplo el conejo. Una extracción del 20% del total de la sangre suele ser suficiente para causar una buena anemia. Se practican dos extracciones separadas por varios días. La sangre de la primera extracción (1) se guarda como control, la sangre de la segunda extracción es sangre anémica (2). El plasma procedente de las sangres 1 y 2 se inyecta por separado en conejos normales en una o varias dosis. Al cabo de varios días se extrae un poco de sangre de cada uno de los conejos y se cuenta el número de glóbulos rojos por ml. El número de glóbulos rojos del conejo 2 que recibió la inyección de plasma de conejo anémico es mayor que el número de glóbulos rojos del conejo 1 que recibió el plasma del mismo conejo cuando estaba en condiciones normales. Por lo tanto un factor presente en la sangre del animal anémico es capaz de estimular la formación de células rojas en un animal normal. Este factor se ha denominado eritropoietina.



dos de ensayo *in vitro*. Estas relaciones entre estructura y función necesitan de una mayor investigación cuando se disponga de suficiente eritropoietina pura para hacer experimentación válida.

La eritropoietina es el regulador de la eritropoiesis, ahora bien, ¿dónde y cómo se produce esta hormona? En animales experimentales, la extirpación del riñón elimina casi completamente la producción de eritropoietina y cuando además se les extirpa el hígado su producción se elimina completamente. Este resultado ha sido confirmado por varios investigadores, sin embargo nadie ha sido capaz de extraer eritropoietina ni del riñón ni del hígado. La clave parece estar en el suero sanguíneo. Efectivamente, la perfusión del riñón con suero salino no produce eritropoietina, sin embargo la perfusión con suero sanguíneo sí. Todos estos resultados indican que factores en

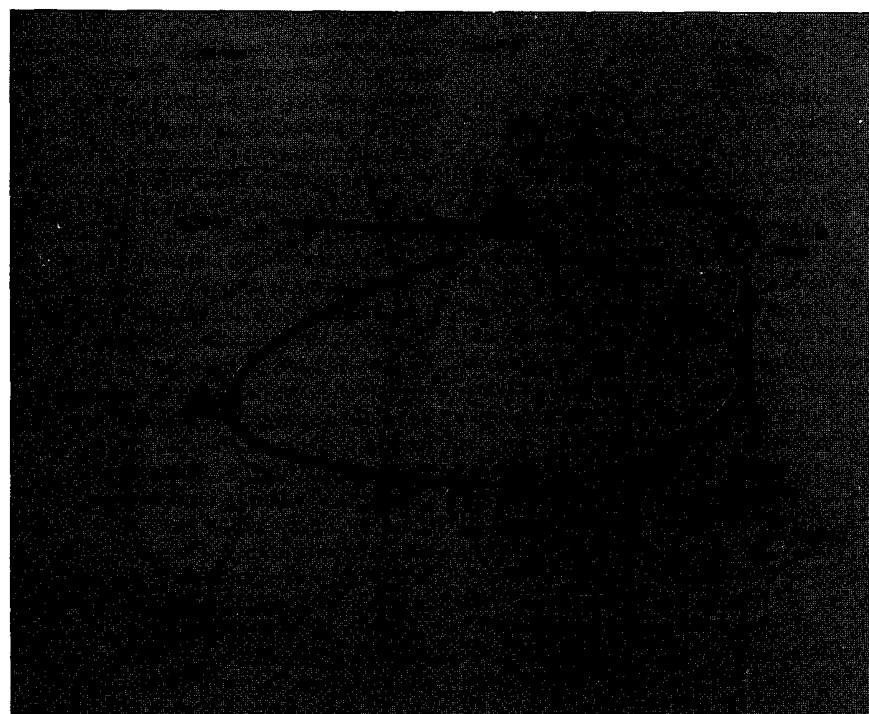
el riñón, plasma e hígado, si bien este último en menor medida, son necesarios para la biogénesis de la eritropoietina, dando lugar a numerosos modelos difíciles de comprobar, pero que se pueden generalizar en el que se muestra en la figura 4.

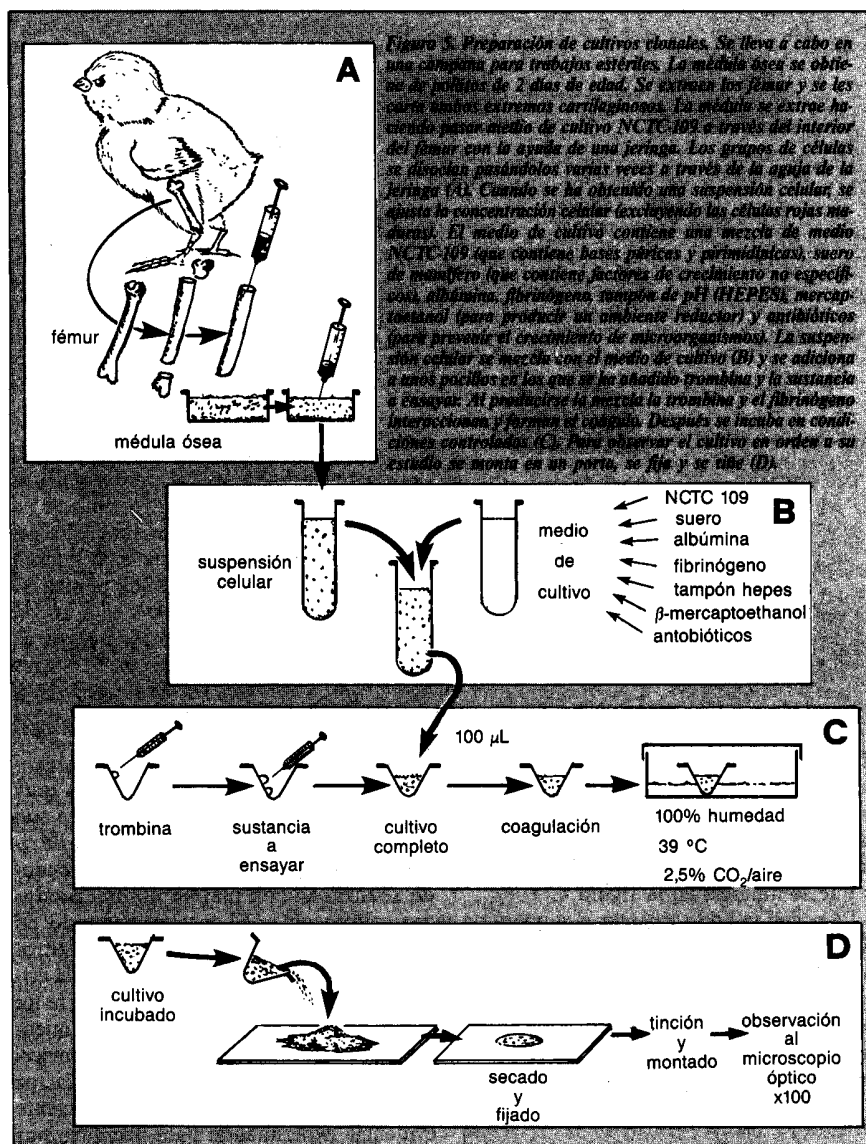
La necesidad de aumentar el número de glóbulos rojos en circulación se detecta primeramente en el cerebro, debido a la disminución de la oxigenación. El cerebro transmite esta señal al riñón, que elabora un factor capaz de generar eritropoietina mediante la interacción con otro factor con-

tenido en el plasma y fabricado en el hígado. Como puede verse, el modelo es muy general y muchos detalles permanecen aún oscuros. Se pueden obtener extractos de riñón de animales anémicos tales que cuando se incuban con plasma normal producen eritrogenina. El factor contenido en estos extractos ha sido denominado eritrogenina. Algunos autores opinan que la eritrogenina es una enzima que convierte un sustrato del plasma en eritropoietina, mientras que para otros la eritrogenina se convierte en eritropoietina por la acción del factor plasmático. Hasta ahora no hay suficiente evidencia experimental para decidirse por uno u otro modelo.

La eritropoietina purificada, de oveja o de hombre, puede estimular la eritropoiesis en ratón, ratas o conejos, confirmando la falta de especificidad de la eritropoietina entre los miembros de las especies de mamíferos. Los factores controladores de la producción de células rojas en aves y otros vertebrados responden a las anemias inducidas en una forma similar a los mamíferos. Ahora bien, la eritropoietina procedente de mamíferos no es capaz de estimular la producción de glóbulos rojos en las ranas ni en las aves, ni el plasma de aves ané-

Figura 4. Esquema de la biogénesis y actuación de la eritropoietina. La señal para aumentar el número de glóbulos rojos en la sangre viene dada por la falta continuada de oxigenación, probablemente detectada en el cerebro y transmitida al riñón. El plasma sanguíneo lleva un factor (●) fabricado probablemente en el hígado que interacciona con la eritrogenina presente en el riñón poco oxigenado (▲) para producir eritropoietina (■). La forma concreta en que esta interacción se produce no está clara todavía. La eritropoietina así generada a su paso por la médula ósea estimula el crecimiento y diferenciación de los eritroblastos y como consecuencia se libera un mayor número de células rojas en la sangre.





micas estimula la eritropoiesis de mamíferos. Existe, pues, una cierta heterogeneidad en cuanto a la eritropoietina de mamíferos y otros vertebrados.

Hasta aquí los resultados más claros que la experimentación, utilizando animales completos, ha conseguido hasta la fecha. Aproximadamente en 1970, Arthur Axelrad y su grupo en la Universidad de Toronto, en Canadá, ponen a punto una técnica eficiente para el análisis de la eritropoiesis *in vitro*. La técnica original utiliza coágulos formados por plasma bovino y extracto de embrión bovino que forman una matriz tridimensional que mantiene las células aisladas y fijas, pudiendo así analizar su progenie individual y los efectos de distintos factores tanto en el crecimiento: número de colonias y número de células en cada colonia, como en la diferenciación: clase de colonias inducidas. Unos años más tarde, el método desarrollado por el autor en el laboratorio de Vernon Ingram, en el Massachusetts Institute of Technology, utiliza coá-

gulos formados por fibrinógeno y trombina puros. Este último método permite una formación del coágulo más controlada, reproducible y rápida, el ensayo de sustancias que evitan la coagulación del plasma bovino y el evitar poner en el medio de cultivo mezclas complejas y desconocidas. Un esquema de la técnica y algunos de sus detalles pueden apreciarse en la figura 5. Norman Iscove y su grupo en Suiza utilizan metilcelulosa como medio semisólido para permitir este análisis, sin embargo la eficiencia y supervivencia de los eritroblastos parece ser menor en estos medios.

La proliferación en cultivos de las células de vertebrados, entre las que se incluyen los precursores de las células rojas de la sangre, requieren condiciones físico-químicas y nutricionales bien definidas, además de factores moleculares específicos para cada tipo celular que generalmente se encuentran en el suero sanguíneo, un componente obligado e indefinido del medio de cultivo. El control de la proliferación celu-

lar depende de interacciones complejas entre las condiciones físico-químicas nutricionales y dichos factores. Cuando se quiere estudiar su posible significado fisiológico, las células deben de estar en condiciones físico-químicas y nutricionales óptimas, de tal manera que su crecimiento sólo se encuentre limitado por la presencia de factores de crecimiento. Usando condiciones no limitantes y la formación de colonias o la síntesis de ADN como ensayos para sustancias estimuladoras de la división celular, numerosos factores de crecimiento específicos para diversas células se han conseguido extraer del suero y purificar numerosos factores de crecimiento específicos para diversas células. Entre éstos están las somatomedinas, los de células epidérmicas, de células de ovario, de fibroblastos, de células del mesenquima, de células nerviosas, de granulocitos, de células establecidas en líneas de cultivo como HeLa, 3T3, WI-38, etc. Los factores de crecimiento generalmente son proteínas producidas por tejidos específicos y vertidas en la circulación sanguínea en concentraciones muy bajas. Todas las células animales, incluidas las eritrocíticas, parecen necesitarlos para su crecimiento y multiplicación en cultivos *in vitro*. Existen muy pocas células capaces de crecer en su ausencia y las que así lo hacen los producen ellas mismas. Las interrelaciones entre ellos pueden llegar a ser muy complejas, por ejemplo varios factores distintos pueden necesitarse para producir una estimulación óptima del crecimiento, unos actúan directamente en la célula, otros actúan como transportadores en el suero, otros actúan sólo en presencia de otros, etc.

Una situación especialmente compleja ocurre con las células eritrocíticas, que son muy delicadas y sensibles a condiciones físico-químicas (variaciones de pH mayores de $\pm 0,2$, ambiente reductor, ausencia de sustancias tóxicas), nutricionales (presencia de bases púricas y pirimidínicas en el medio, concentraciones de aminoácidos óptimas, etc.) y por supuesto a factores de crecimiento y diferenciación tanto específicos (eritropoietina, transferrina y otros) como no específicos (sueros). En condiciones físico-químicas y nutricionales óptimas, Iscove y su grupo examinaron críticamente los requerimientos de las células eritrocíticas del ratón, encontrando que el suero, la albúmina, la transferrina y ciertos lípidos actuaban en la estimulación de la formación de colonias siempre que la eritropoietina estuviera presente en el medio. Seguidamente intentaron sustituir el componente más complejo, el suero, y aunque lograron reducir su concentración para obtener colonias eritrocíticas de 2 días no lograron suprimirlo por completo. Además, las colonias eritrocíticas de 10 días requerían mayores concentraciones tanto de suero como de eritropoietina. El factor del suero estimulante de las colonias gigantes de 10 días ha sido concentrado por estos autores

y parece ser una proteína de peso molecular 35 000. Otras investigaciones han confirmado la existencia de un factor similar originado en los leucocitos sin que hasta ahora se haya conseguido una mayor caracterización. Utilizando cultivos eritroides de ave hemos conseguido eliminar por completo el requerimiento de suero. Las células eritrocíticas del pollo pueden crecer solamente en presencia de las proteínas albúmina y transferrina. Aunque la presencia de un factor extraído del suero de unos 15 000 de peso molecular aumenta el número y tamaño de las colonias (observaciones personales).

Puesto que es posible que las actividades demostradas para la albúmina y la transferrina sean debidas a cantidades pequeñas de otros factores, se han repurificado estos componentes en un intento de eliminar esta posibilidad. Tanto Iscove en el ratón como nosotros en el pollo no hemos podido eliminar sus actividades estimulantes mediante una mayor purificación, por lo que parece que su actividad radica en sus moléculas respectivas. La albúmina se encuentra en el suero sanguíneo, en el que constituye hasta el 60% de la proteína total. La albúmina tiene un peso molecular aproximado de 68 000 y actúa como transportador de grasas, es responsable de la presión osmótica coloidal de la sangre, transportadora de calcio, triptófano, hormonas esteroídicas, glutatión, cisteína, bilirrubina, etc. Todas estas funciones, unido a la casi imposibilidad de aislarla totalmente libre, hacen que su función en los cultivos de células eritroides sea muy difícil de definir. La transferrina se encuentra también en el suero sanguíneo, en el que constituye un 2%



Figura 6. Morfología de las colonias eritrocíticas. Esta fotografía está escogida de un cultivo de 2 días de células procedentes de la médula ósea de pollo. La colonia A contiene células basófilas que se tiñen de azul, más tarde darán lugar a células acidófilas que se tiñen de rojo como las de la colonia B. Las células de la colonia A son inmaduras como lo demuestra el mayor tamaño de su núcleo, su carácter ameboso y sus propiedades a la tinción que demuestran no poseer hemo. Las células de la colonia B son más maduras como lo demuestra el menor tamaño del núcleo, poco carácter ameboso y su tinción roja que demuestra la presencia de hemo. Al lado de las colonias puede observarse un glóbulo rojo maduro aunque decolorado. Ambas colonias poseen unas 25 células, 2 de ellas en metafase, están por lo tanto en su 5.^a división celular. Todas las células de cada colonia están en el mismo grado de maduración. El número de colonias que se obtiene varía entre 800, 1 500 por 50 000 células de la médula ósea. Fotografía original a 800 aumentos. Tinción: benzidina-hematoxilina.

de la proteína total. La transferrina tiene un peso molecular aproximado de 77 000 y contiene carbohidratos y hierro. Alrededor del 15% de la proteína de la clara del huevo es una transferrina que sólo difiere de la del suero en su composición de carbohidratos. Su función primordial es el transporte de hierro: 2 átomos de hierro por molécula. La unión de los 2 átomos de hierro provoca un cambio conformacional hasta tal punto que la hace inaccesible a las enzimas degradativas, sin embargo la pérdida de 1 o 2 átomos de hierro convierte una parte o toda la molécula, respectivamente, en fácilmente degradable. Estas propiedades se han empleado para romper la molécula e investigar su composición y secuencias, aunque se sabe muy poco acerca de su posible significado fisiológico.

Con el empleo de los cultivos en medios semisólidos se ha podido profundizar en los pasos de la eritropoiesis y su regulación tanto en el ratón como en el hombre. Utilizando células de médula ósea de ratón adulto, el grupo de Toronto encontró que en ausencia de eritropoietina había una división celular limitada, formándose agregados de 2-5 células. La adición de eritropoietina, sin embargo, era absolutamente necesaria para observar colonias eritrocíticas, detectadas por su tinción anaranjada con benzidina, de hasta 32 células después de 2 días de cultivo. El número de colonias dependía directamente de la cantidad de eritropoietina adicionada al cultivo, hasta un *plateau*. Utilizando concentraciones de eritropoietina 10 veces más altas pueden observarse colonias y grupos de colonias eritrocíticas gigantes, de más de 1 000 células después de 7 a 10 días de cultivo. Estas colonias gigantes se han denominado *burst*, haciendo alusión a su aspecto explosivo, pues efectivamente aparecen en los coágulos como si hubiera habido varias explosiones de grupos de células. También estos *burst* son totalmente dependientes de la adición de suero y eritropoietina de mamífero. Estos resultados se han confirmado utilizando cultivos de médula ósea humana.

La mayoría de estos cultivos se habían hecho con células, suero y eritropoietina procedentes de mamíferos. ¿Qué pasaría al utilizar un sistema con células de ave pero suero de mamíferos? Este sistema nos permitiría separar efectos no específicos de los específicos, si como se deducía de las ex-

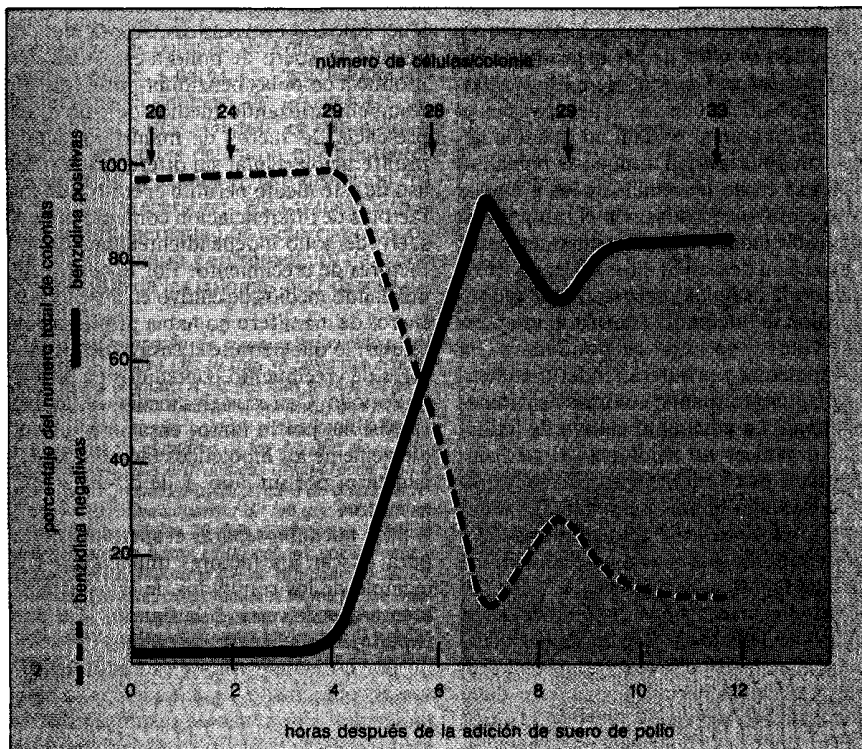
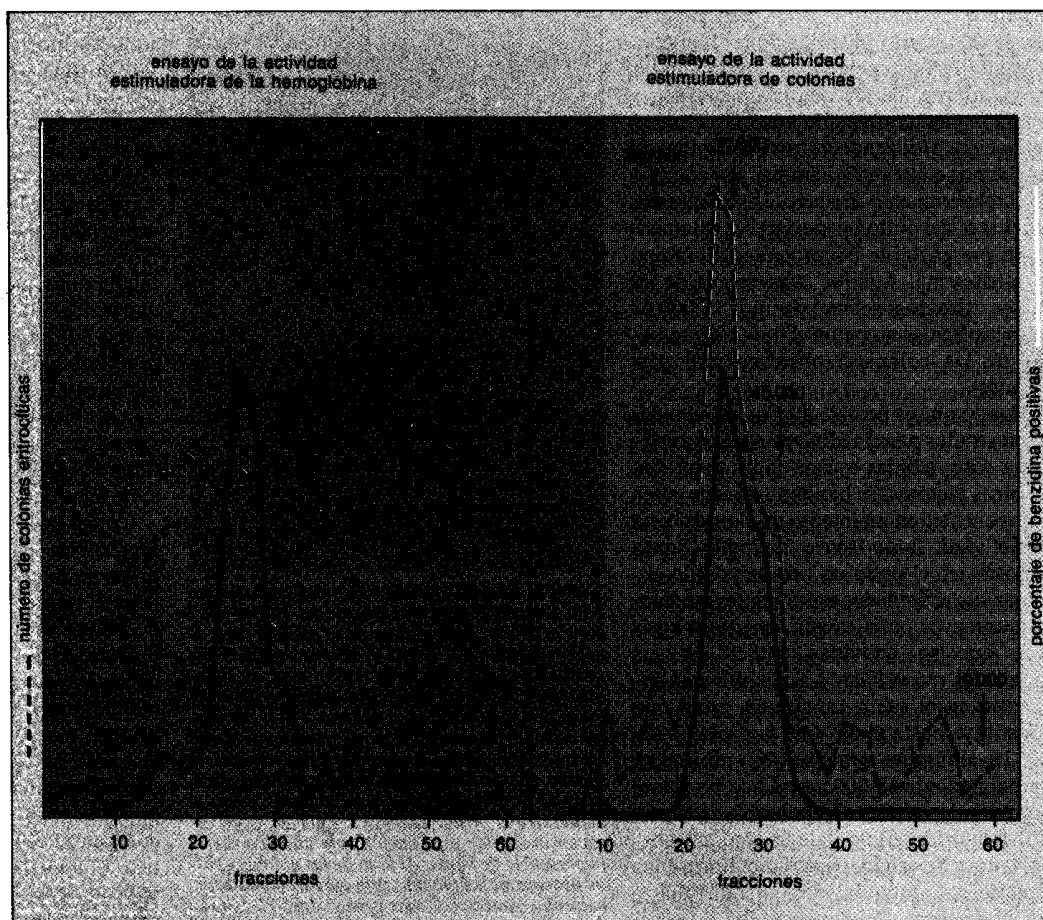


Figura 7. Conversión de colonias eritrocíticas. En ausencia de suero de pollo, las colonias que crecían en los cultivos celulares de médula ósea de pollo, después de 2 días de incubación, eran benzidina-negativa (color azul). Se dispusieron varios cultivos en ausencia de suero de pollo y a los 2 días se añadió el suero y se volvieron a reincubar. A los tiempos indicados en la figura, los cultivos se fijaron y después se tiñeron simultáneamente. El 90% de las colonias benzidina-negativa se convertían en benzidina-positivas a las 5-8 horas después de añadir el suero de pollo al cultivo. El número de células por colonia aumentaba por igual en los cultivos control en los que las colonias seguían siendo benzidina-negativas.

Figura 8. Peso molecular de los factores estimulantes de la hemoglobina y colonias. En condiciones de cultivo A, aparecían colonias benzidina-negativas sin suero de pollo (condiciones de ensayo del factor estimulante de la hemoglobina). En condiciones de cultivo B no aparecían colonias sin suero de pollo. Las proteínas del suero de pollo se separaron en varias fracciones según su peso molecular por cromatografía de exclusión, en Sephadex. Después cada fracción proteica se ensayó por separado en condiciones A y en condiciones B. En ambos casos se determinó el número de colonias y el porcentaje de ellas que resultaron ser benzidina-positiva. La figura nos demuestra que el factor estimulante de la hemoglobina y el factor estimulante de las colonias contenidos en el suero de pollo tienen el mismo peso molecular, alrededor de 80 000.



periencias *in vitro*, la eritropoietina de mamífero y la de ave no eran intercambiables. El animal escogido para estos experimentos fue el pollo, dada la facilidad de obtenerlo y la cantidad de estudios que se han hecho de la eritropoiesis de embriones de este animal. Utilizando cultivos celulares de médula ósea de pollo recién nacido pudimos demostrar que en presencia solamente de suero de mamífero unas colonias, morfológicamente eritroides pero benzidina-negativas, se desarrollaban en los cultivos (figura 6A). En presencia de suero de mamífero y suero de pollo unas colonias eritrocíticas según la tinción con benzidina (benzidina-positivas) aparecían en el cultivo (figura 6B) y sólo un pequeño número de colonias benzidina-negativas permanecía. La adición de eritropoietina de mamífero a estos cultivos no tenía efecto aparente alguno. Si estos cultivos se incubaban durante 7 a 10 días aparecían colonias gigantes o *burst* semejantes a los obtenidos utilizando cultivos de células de mamíferos. El carácter eritroide de las colonias benzidina-negativas en nuestro sistema quedó claro cuando se pudo demostrar que estas colonias se podían convertir en benzidina-positivas unas 6-8 horas después de añadir al medio de cultivo suero de pollo (figura 7).

Las colonias benzidina-negativa sintetizaban poca globina mientras que las colonias benzidina-positiva sintetizaban mucha

más según se pudo comprobar utilizando isótopos radiactivos y separación de proteínas por electroforesis. Igualmente, las colonias benzidina-negativa acumulaban menos cantidad de RNA-mensajero para la globina que las benzidina-positiva, según se pudo demostrar mediante aislamiento y traducción *in vitro* de los mensajeros correspondientes. La identificación de colonias eritrocíticas benzidina-negativas en el caso de un animal normal no se había hecho con anterioridad aunque se había encontrado en las leucemias de los glóbulos rojos o eritroleucemias. En el ratón ha sido posible inducir eritroleucemias mediante la inyección de ciertos virus (Friend-virus). Cuando las células precursoras de glóbulos rojos se infectan y transforman en estos virus, ya no responden a la eritropoietina y proliferan indefinidamente en cultivo formando colonias benzidina-negativas. La adición al cultivo de inductores orgánicos no fisiológicos (dimetilsulfóxido, por ejemplo) provoca la diferenciación celular y las colonias proliferan unas pocas generaciones para terminar siendo colonias benzidina-positivas. En este caso la infección vírica provoca una parada de los mecanismos de diferenciación mientras que la proliferación sigue su curso. En el caso del pollo la no adición de suero específico de pollo a los cultivos tiene un efecto análogo: no se produce diferenciación aunque sí proliferación. Ambos fe-

nómenos aparentemente similares sugieren una interferencia con los mecanismos reguladores de la diferenciación en puntos próximos. Cuando se intentaron cultivos de células procedentes de médula ósea de pollo en ausencia de sueros, no fue posible obtener colonias eritrocíticas. Ahora bien, la adición de suero de pollo a estos cultivos producía colonias benzidina-positivas. En resumen, utilizando medios de cultivo en presencia de sueros de mamífero, había proliferación celular sin diferenciación. El uso de este medio permite el ensayo de los factores de diferenciación contenidos en el suero de pollo independientemente de los factores de crecimiento. Por el contrario, utilizando medios de cultivo en ausencia de sueros de mamífero no había proliferación celular; lo que permite el ensayo de los factores de crecimiento contenidos en el suero de pollo. Con estos dos medios de cultivo es posible, por lo tanto, ensayar independientemente los hipotéticos factores de crecimiento, por un lado, y de diferenciación, por otro.

Sólo quedaba separar el suero del pollo para buscar los factores implicados. Un ejemplo de los resultados de estos experimentos puede verse en la figura 8. En este experimento, el suero de pollo se fraccionó por cromatografía de exclusión en diversos componentes de acuerdo con su peso molecular. Por medio de sustancias de peso molecular conocido puede saberse que

pesos moleculares aproximados corresponden a las fracciones excluidas. Utilizando esta técnica el suero de pollo pudo separarse en 60 fracciones, después de cada fracción se ensayó por actividad estimuladora de hemoglobina y por actividad estimuladora de colonias, independientemente. Por el primer método, el número de colonias permanecía más o menos constante mientras que la estimulación de hemoglobina sólo aparecía en unas 10 fracciones correspondientes a un peso molecular aproximado de 80 000. Por el segundo método, sólo aparecían colonias en las mismas 10 fracciones y todas estas colonias eran benzidina-positivas, es decir que no se podía separar por esta técnica el factor responsable de la estimulación de hemoglobina del de las colonias. Una vez realizadas un gran número de pruebas llegamos a la conclusión de que en ambos casos el factor que estimulaba tanto el crecimiento como la diferenciación de los eritroblastos del pollo en los cultivos era transferrina del suero de pollo. Observación que se confirmó utilizando transferrina comercial pura obtenida a partir de clara de huevo de gallina. Las técnicas de cultivo en medios semisólidos han permitido identificar dos clases de precursores de las células rojas, sensibles a reguladores proteicos tanto en mamíferos como en aves. Los precursores de las colonias gigantes de 10 días tienen varias propiedades que sugieren el que sean precursores de las colonias de 2 días. Primero, el precursor de las colonias gigantes tiene una mayor progenie (1 000 células/colonia) que el otro precursor (30-60 células/colonia). Segundo, cada colonia gigante se compone de numerosos grupos de colonias morfológicamente similares a las colonias de 2 días. Tercero, en la médula ósea hay 100 veces más precursores de colonias de 2 días que de colonias gigantes. Cuarto, las transfusiones sólo reducen el número de precursores de colonias de 2 días. Quinto, se han aislado algunos mutantes del ratón que aparentemente están afectados en la transmisión entre los dos precursores. Esta transición parece estar gobernada por factores proteicos (factor linfocitario y eritropoietina). Para que el precursor de las colonias de 2 días se di-

vida, la eritropoietina tiene que darle la señal. Aún así falta otro factor proteico, la transferrina, para que los eritroblastos no sólo se dividan sino que se diferencien y produzcan células rojas hemoglobinizadas y por lo tanto capaces de llevar oxígeno al resto de los tejidos. De todos estos estudios se ha ido definiendo un modelo general de eritropoiesis (figura 9). Según este modelo, en la médula roja existen células madres capaces de dar lugar a las diferentes líneas celulares que se encuentran en la sangre. Después de «comprometerse» a crecer y diferenciarse en la línea eritrocítica, debido a procesos de inducción locales aún no conocidos, las células madres proliferan unas cuantas generaciones para producir precursores de colonias gigantes que estimulados a su vez por factores linfocíticos y altas dosis de eritropoietina proliferan para producir precursores de colonias; éstos, estimulados por bajas dosis de eritropoietina, se dividen 5 a 6 veces para dar lugar a células que se diferencian en glóbulos rojos en presencia de transferrina. Este modelo parece tener aplicación para las series eritrocíticas en los adultos de mamíferos desde el ratón al hombre y con algunas modificaciones en las aves, en donde no está aún clara la participación de la eritropoietina en el proceso regulador. En mamíferos y aves la eritropoiesis y su regulación están controladas por factores aparentemente diferentes según se desprende de la evidencia experimental, tanto *in vivo* como en cultivos. Las técnicas de cultivo de eritroblastos en medios semisólidos ofrecen un buen sistema para el análisis de la eritropoiesis. Tanto en mamíferos como en aves ya

se han identificado algunas de las moléculas de proteína que interaccionan con las células precursoras de los glóbulos rojos controlando su crecimiento y diferenciación, tales como la eritropoietina y la transferrina. En estos temas, una de las cuestiones que queda por resolver es el esclarecimiento del origen y formación de la eritropoietina, la principal proteína reguladora de la eritropoiesis. Utilizando cultivos mixtos de componentes procedentes de mamíferos y aves se espera poder profundizar en los problemas planteados acerca de la formación de los glóbulos rojos. Estos estudios, además de contribuir al esclarecimiento de los fenómenos básicos de diferenciación celular, ofrecen posibles aplicaciones clínicas en el futuro. ■

Para más información

- J., Coll, V.M., Ingram. Stimulation of heme accumulation and erythroid colony formation in cultures of chick bone marrow cells by chicken plasma. *J. Cell Biol.* 76, 184-190, 1978.
- L.J., Guilbert, N.N., Iscove. Partial replacement of serum by selenite, transferrin, albumin and lecithin in haemopoietic cell cultures. *Nature*, 263, 594-595, 1976.
- P.R., Harrison. Analysis of erythropoiesis at the molecular level. *Nature*, 262, 353-356, 1976.
- V.M., Ingram, Embryonic red blood cell formation. *Nature*, 235, 93-98, 1972.
- T., Miyake, E., Goldwasser, Purification of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 252, 5 558-5 564, 1977.

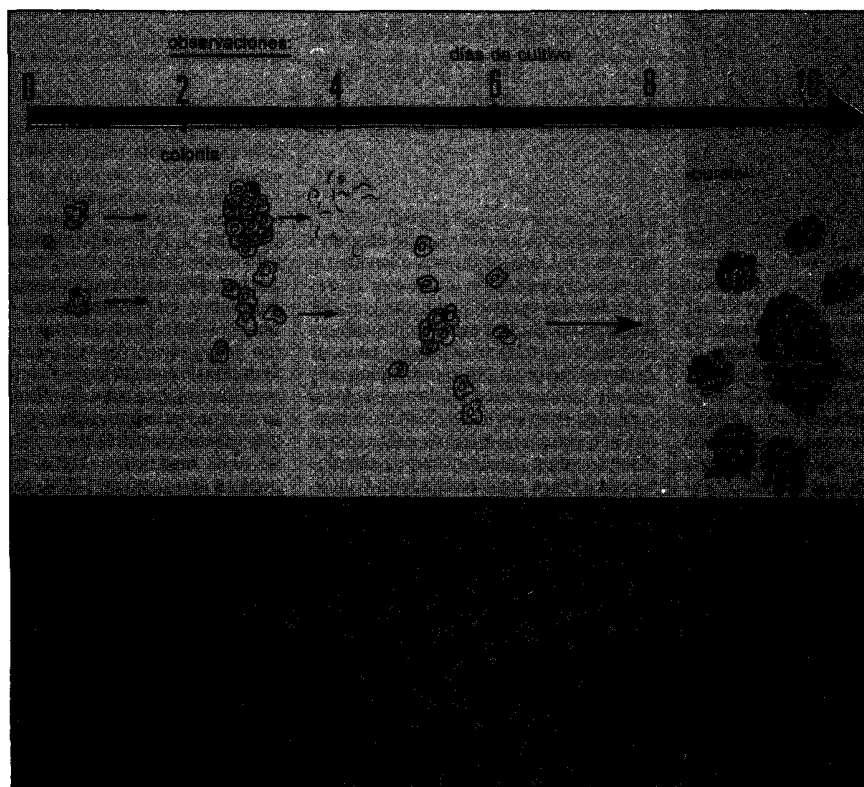


Figura 9. Desarrollo de colonias eritrocíticas. Al empezar el cultivo (día 0) sólo se observan células individuales aisladas. A los dos días se observan colonias eritrocíticas (benzidina-positivas) que pueden tener 30 células por colonia y distribuidas homogéneamente en el cultivo. A los 4-6 días de cultivo todas las colonias eritrocíticas desaparecen y sólo se observan pequeños aglomerados de células ameboides (benzidina-negativa) de los que escapan algunas células. A los 10 días se observan colonias eritrocíticas de hasta 1 000 células por colonia y agrupadas en conjuntos que se han dado en llamar «burst». De estas observaciones ha nacido la hipótesis de la existencia de 2 clases de precursores: el formador de colonias gigantes (precursor 1) y el formador de colonias pequeñas (precursor 2). El precursor 1 tiene la capacidad de generar precursores 2 mientras que éste tiene la capacidad de generar glóbulos rojos. La capacidad de generación y las necesidades de eritropoietina del precursor 1 son mayores que las del precursor 2.