

Los cultivos en medios líquidos como una herramienta para la evaluación rápida de la proliferación de precursores hematopoyéticos provenientes de pacientes con anemia aplásica.

Biol. Gloria Cabrera*
 Fis. Benny Weiss

Resumen

Con la finalidad de evaluar la proliferación de células de médula ósea humana en medios líquidos in vitro y su posible aplicación en anemia aplásica, se cultivaron tanto médulas provenientes de donadores normales, así como de pacientes con esta enfermedad. Nuestros resultados mostraron que se puede utilizar como activador de la proliferación celular a un medio condicionado por leucocitos de sangre periférica, estimulados con productos bacterianos, asimismo existe un aumento de la respuesta al inductor en presencia de plasma humano. Al comparar el tiempo necesario para la evaluación significativa de proliferación celular se encontró que, en medios líquidos, éste era mucho menor al normalmente utilizado en cultivos con medios semisólidos.

Por último al cultivar médulas de pacientes con anemia aplásica se encontraron 3 diferentes casos. En el primero, la respuesta fue muy similar a la de médula normal; en el segundo, no hubo activación a la proliferación celular, y en el tercero, la respuesta a la inducción se recuperaba al depletar la médula de linfocitos T. Finalmente, se discute la posible aplicación y mejora de este ensayo de cultivo de médula ósea in vitro en medios líquidos, para anemia aplásica y otros padecimientos hematológicos.

Introducción

Los cultivos *in vitro* de médula ósea han sido muy útiles para el estudio de la diferenciación de precursores sanguíneos,^{1,3} así como para la identificación de las propiedades tanto funcionales,⁴ bioquímicas,⁵ como inmunológicas de las diferentes líneas celulares⁶⁻⁷. El factor inductor a la diferenciación de macrófagos y granulocitos (MGI), o formador de colonias (CSF), fue identificado como el principal regulador de la proliferación y diferenciación de estas células.⁸⁻¹⁰ Este factor es producido por diferentes células, tanto sanguíneas como de tejido conectivo y conjuntivo.¹¹ Los leucocitos fabrican MGI,¹²⁻¹⁴ y dicha producción es fuertemente aumentada en presencia de productos bacterianos tales como los lipopolisacáridos.¹⁵⁻¹⁶ De igual forma se han detectado altos niveles de MGI en suero tanto de animales como de humanos.¹⁷⁻¹⁸

Se ha utilizado una técnica de formación de colonias en agar para la evaluación del

* Bióloga y físico del Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México.

Solicitud de sobretiros: Benny Weiss, ENEP Zaragoza, Apartado Postal 9-030 México 9 DF. CP 09230.

Este trabajo se realizó, en parte, por el apoyo económico recibido del Programa Universitario de Investigación Clínica (PUIC) de la UNAM y al Programa de Salud de CONACYT.

número de precursores hematopoiéticos inducidos por el MGI, asimismo se ha evaluado la proliferación celular en medios líquidos inducida por este mismo factor.¹⁹ La técnica en medios líquidos da una mejor evaluación de la proliferación celular (ya que el agar restringe la división celular), mientras que por otro lado tiene la desventaja de impedir la determinación del número de células formadoras de colonias.

El cultivo de médula ósea proveniente de pacientes con anemia aplásica se ha utilizado para determinar la posible falla medular.²⁰ Esta enfermedad consiste en una hipoproliferación de todas las líneas celulares mieloides.²¹ Se han publicado casos en los cuales una intervención inmunológica ha restaurado la función medular, lo cual ha dado lugar al estudio de la posible función inhibidora de los linfocitos T.²² Para ello, se realizan cultivos en agar tanto en ausencia como en presencia de estos linfocitos, encontrándose en algunos casos, una buena correlación entre el incremento de la formación de colonias en ausencia de linfocitos T y la respuesta del paciente a tratamiento inmunodepresivo.²³

Tomando en consideración que es necesario determinar el tipo de tratamiento que se aplicará a estos pacientes lo antes posible y que la técnica establecida en la actualidad requiere de más de 10 días para su evaluación, en este trabajo se utilizó la propiedad de proliferación facilitada en medios líquidos para establecer una técnica *in vitro* que proporcione resultados más rápidamente.

Material y Métodos

Condiciones de Cultivo Celular. Todas las células fueron cultivadas durante 120 horas a 37°C, con un grado de humedad a punto de rocío y con 10 por ciento de CO₂ en la atmósfera. Se utilizaron cajas de cultivo de 60 X 15 mm, conteniendo 5 ml de medio cultivo, el cual se compone de 1 ml de suero de caballo (SC) (Gibco Laboratories, U.S.A.) previamente desactivado durante 60 min a 56°C y con 4 ml de medio esencial de Eagle (ME) (Microlab, México).

Técnica de Rosetado E, y Eliminación de Linfocitos T de la Médula Osea. Se obtuvieron eritrocitos de carnero (EC) en medio de Alsevers al 50 por ciento y se dejaron reposar durante 7 días a 4°C; para activar los EC, se les lavó 3 veces por centrifugación a 800 g durante 3 min con solución amortiguadora de fosfatos (SAF), se incubaron a 37°C durante 30 min con 1 ug/ml de neuraminidasa (Sigma Chemical, U.S.A.), por último se procedió a lavar con SAF otras 3 veces resuspendiendo en el mismo volumen. A las células blancas a ser ensayadas se les agregó 0.1 ml de estos EC activados, se centrifugaron a 800 g durante 5 min y se incubó el botón tanto a 37°C durante 30 min como a 4°C durante 15 min. Posteriormente, se resuspendió el botón lentamente con una pipeta Pasteur, se colocó toda la muestra en un gradiente de Ficoll-Hypaque, (Sigma Chemical, U.S.A.) con densidad de 1.07 g/ml y después de una centrifugación a 500 g durante 30 min, se recuperaron únicamente las células en la interfase desprovistas de rosetas.

Medios Activadores. Para activar a la proliferación celular se utilizó tanto 0.2 ml (por cultivo) de plasma humano fresco de donadores normales, como 1 ml del medio condicionado por leucocitos de sangre periférica en presencia de lipopolisacáridos (MCL-LPS). Para la preparación del MCL-LPS, se separaron leucocitos mononucleados por medio de un gradiente de Ficoll-Hypaque, conteniendo 10 ml de sangre periférica extraída con 100 U/ml de heparina (Riker, S.A. de C.V. México) y después de una centrifugación a 500 g durante 30 min se obtuvieron en forma separada el plasma humano fresco y la banda de células de la interfase. Estas células se lavan 3 veces con SAF, e incubadas a 37°C a una densidad de 1 X 10⁶ células por ml de ME, conteniendo 10 ug/ml de LPS de *Salmonella typhosa* (Sigma Chemical, U.S.A.) durante 48 horas. Por último, se centrifugaron las células, se eliminó el botón y se guardó el sobrenadante a -20°C hasta su uso.

Cultivo de médula ósea. La médula de

pacientes con anemia aplástica se extrajo mediante aspersión en la cresta iliaca y la médula ósea control, a partir del esternón de donadores voluntarios durante cirugía de tórax. La médula se colocó en tubos de ensayo estériles que contenían 100 U de heparina y 2.5 ml de ME. Se procedió posteriormente al cultivo tanto por el método directo (en el cual se toman células blancas de la médula tal y como fue extraída sin separación en gradiente de Ficoll-Hypaque), así como por el método de células mononucleadas (en el cual se toman las células de la banda cerca de la interfase), como por el método de células depletadas de linfocitos T (en el cual a las células mononucleadas se les eliminaron las células que forman rosetas E).

Las células obtenidas por los diferentes métodos son cultivadas por duplicado, ya sea en ausencia o presencia de 1 ml de MCL-LPS y con o sin 0.2 ml de plasma humano. El número de células al final de la incubación se evalúa mediante un hemocitómetro, contando un mínimo de 500 células por experimento.

Resultados

Inducción a la Proliferación en Medios Líquidos de Células Mieloides, por el Medio Condicionado por Leucocitos de Sangre Periférica en Presencia de Lipopolisacaridos (MCL-LPS)

Con la finalidad de valorar el efecto de la inducción a la proliferación del MCL-LPS sobre células mieloides humanas, se efectuaron 2 cultivos de médula ósea normal, tanto en presencia como en ausencia de 20 por ciento de este activador. Encontramos que por cada 10^5 células mononucleadas cultivadas durante 5 días con medio inductor, se obtenían más del doble de células que en los cultivos sin MCL-LPS (Cuadro 1). Es conveniente hacer notar que aun en los cultivos sin MCL-LPS, la población celular aumentaba casi al doble.

Para determinar si la presencia de plasma

humano mejoraba la respuesta de inducción, se efectuaron los mismos experimentos enriquecidos con 4 por ciento de plasma. Nuestros resultados indicaron que tanto en ausencia como en presencia de MCL-LPS, el número de células aumentaba significativamente respecto a los cultivos sin plasma, al grado que encontramos una inducción semejante cuando se usaba exclusivamente plasma, que cuando se usaba únicamente el MCL-LPS (Cuadro 1). Además en presencia tanto de plasma como de inductor, la población celular aumentaba en más de 10 veces.

Inducción a la Proliferación en Medios Líquidos de Células Mieloides de Pacientes con anemia Aplástica, por MCL-LPS.

CUADRO 1
Efecto del Plasma Humano Sobre la Proliferación de Células de Médula Ósea.

Caso	Médula control		Médula de anemia aplástica					
	Sin P	Con P	Sin P	Con P	Sin P	Con P		
	-	+	-	+	-	+		
1	1.7	3.8	4.6	10.8	1.8	4.0	3.5	9.6
2	2.0	5.0	4.8	15.0	1.6	5.9	4.7	10.1

(-) Sin MCL-LPS
(+) Con 20% de MCL-LPS
(P) Plasma (4%)

La inducción se efectuó durante 5 días en células de médula ósea control (de tórax) y en células de Pacientes con anemia aplástica, los resultados se expresan por cada 10^5 células sembradas.

Para determinar si la proliferación de células mononucleadas de pacientes con anemia aplástica se podía evaluar en medios líquidos, y si este crecimiento era similar al encontrado con médula normal, se cultivaron las médulas de 2 pacientes con esta enfermedad, en las mismas condiciones descritas para la médula normal. Nuestros resultados indicaron que la inducción a la proliferación fue muy semejante a la obtenida con médula normal (Cuadro 1).

Con la finalidad de determinar si se podía trabajar con médula total (método directo), y evaluar el efecto que pudiese tener la eliminación de linfocitos T en médulas procedentes de pacientes con anemia aplástica, se cultivaron 10^5 células por el método directo, y usando células mononucleadas, o células mononucleadas desprovistas de células formadoras de rosetas E, durante 5 días en presencia de 4 por ciento de plasma humano y 20 por ciento de MCL-LPS.

Nuestros resultados indicaron que aunque se obtuvo un aumento celular por el método directo, éste no era muy fácil de evaluar debido a la gran cantidad de eritrocitos presentes. Asimismo, se encontró que hubo un aumento en el número celular en el cultivo desprovisto de linfocitos T, y que el efecto era más apreciable en los cultivos con plasma humano (Cuadro 2).

CUADRO 2

MODULACION DE LA PROLIFERACION DE PRECURSORES HEMATOPOYETICOS POR LINFOCITOS T.

Caso	Sexo	Edad	Directo											
			L				-L							
			Sin P	P	Sin P	P	Con P	P	Sin P	P	Con P	P		
			-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
I	M	10	1.3	2.6	1.2	4.0	3.9	9.8	1.5	10.1	4.2	15.9		
I	M	11	1.4	2.3	1.3	3.9	4.0	12.0	1.6	8.1	5.6	18.0		

(-) Sin MCL-LPS
 (+) Con 20% de MCL-LPS
 (P) Plasma (4%)
 (L) Células Mononucleadas
 (-L) Sin Linfocitos T

La inducción a la proliferación se efectuó durante 5 días, los resultados se expresan por cada 10^5 células sembradas.

Evaluación en Medios Líquidos del Efecto Regulador de Linfocitos T en Cultivos de Médula Osea de Pacientes con Anemia Aplástica.

Una vez determinado que el MCL-LPS presentaba una buena inducción a la proliferación de células mieloides de pacientes con anemia aplástica, se procedió a cultivar 3 médulas más usando tanto células mononucleadas completas, como aquellas desprovistas de células con receptores para E, en presencia de 4 por ciento de plasma

humano y de 20 por ciento MCL-LPS.

Nuestros resultados presentaron 3 diferentes situaciones: en la primera el comportamiento fué semejante al obtenido con médula normal; la segunda mostró en ambos casos una muy baja proliferación celular, mientras que en la tercera encontramos que aunque en presencia de linfocitos T la inducción a la proliferación era baja, en el experimento con médula depletada obtuvimos una respuesta semejante a la normal (Cuadro 3).

CUADRO 3

COMPORTAMIENTOS DIFERENTES DE PROLIFERACION DE MEDULA OSEA DE PACIENTES CON ANEMIA APLASTICA

Caso	Sexo	L	-L
1	M	8.0	13.0
2	F	1.5	2.3
3	M	2.0	11.0

La inducción a la proliferación se efectuó durante 5 días en células de pacientes con anemia aplástica, con 20% de MCL-LPS y 0.4% de plasma humano, los resultados se expresan por cada 10^5 células sembradas.

Discusión

En este trabajo se han presentado datos que indican que los cultivos de médula ósea de pacientes con anemia aplástica se pueden evaluar en medios líquidos y que esta técnica tiene ciertas ventajas sobre la actualmente utilizada en sustratos semisólidos. En cultivos

líquidos bastan 5 días para la obtención de resultados significativos, en comparación de las dos semanas en promedio que requieren los cultivos en agar. Por otro lado, el empleo de medios condicionados activadores de la proliferación celular en lugar de células mononucleadas de sangre fresca, resulta en una mejora que disminuye el tiempo de sembrado, el cual es por lo general muy largo y evita la necesidad de disponer continuamente de donadores sanos.

Es evidente que el estudio de otras fuentes activadoras es necesario para poder prescindir completamente de sangre fresca. Entre las alternativas más recomendables estarían los medios condicionados por células de ratón y aquellos por placenta humana.

En este trabajo demostramos que el medio condicionado por leucocitos de sangre periférica humana activados con lipopolisacáridos (MCL-LPS) es un buen inductor y además se encontró que al agregar 4 por ciento de plasma humano la respuesta mejoraba importantemente. Esto último, se puede deber tanto al hecho que las células proliferan mejor en presencia de plasma de la misma especie, como a la existencia de factores activadores normalmente presentes en el plasma. Por otro lado, encontramos que la evaluación de la proliferación de células de médula ósea puede hacerse en médula ósea total; sin embargo, la gran contaminación por eritrocitos y el hecho de que, para estudiar el efecto de linfocitos T en pacientes con anemia aplástica es necesario un aislamiento de células mononucleadas, el método directo, aunque más rápido, no ofrece mucha oportunidad de aplicación.

En algunos de los cultivos que se efectuaron a partir de médulas óseas de pacientes con anemia aplástica, observamos un comportamiento muy semejante al encontrado en los cultivos control; creemos que en estos casos no existe una falla que se pueda asociar a defectos en las células precursoras, sino a la falta de elementos activadores, o existencia de inhibidores en el suero del paciente. El hecho de que en varios casos encontramos un aumento en la

proliferación celular al eliminar a linfocitos T, indica que probablemente este tipo celular tenga un papel importante en esta enfermedad.

En otro caso se obtuvo una médula que no podía ser activada para la proliferación, ni en presencia de activadores ni en ausencia de linfocitos T; creemos que en este caso la falla se encuentra en defectos de la misma célula precursora.

Por último, en un caso encontramos que aunque la inducción a la proliferación era baja al utilizar nuestro activador, ésta regresaba a la normal al depletar la médula de linfocitos T. La recuperación de actividad inductora obtenida al eliminar a células formadoras de rosetas E, puede indicar que son justamente los linfocitos T los que se encuentran inhibiendo la proliferación celular. Es evidente que si se llegara a encontrar una correlación clínica con los resultados aquí descritos, tendremos un ensayo de utilidad diagnóstica, que nos puede indicar los casos en los cuales la aplicación de inmunoglobina anti-T sea pertinente. Para esto, se tendrán que evaluar un mayor número de casos, y seguir muy de cerca el desarrollo clínico de los pacientes.

Cabe mencionar, por último, que esta técnica puede representar también un complemento en el estudio de cultivos de médula ósea en otro tipo de padecimientos de origen hematológico, y del efecto regulador que puedan tener las diferentes células que integran el sistema hematopoiético.

Agradecimientos

Se agradece al doctor Javier Pizzuto, jefe del Departamento de Hematología del Hospital General del IMSS y al biólogo Daniel Ríos por la obtención de las médulas de pacientes con anemia aplástica. Los autores desean asimismo agradecer la excelente labor técnica de los señores Ranulfo Pedraza y José G. Chavarría.

Referencias

1. Pluznik D., Sachs L. "The cloning of normal mast cells in tissue culture" *J Cell Comp*, 1965;66:319-324
2. Bradley T. R. y Metcalf D. "The growth of mouse bone marrow cells in vitro", *J Exp Biol Med Sci*, 1966;44:287-299.
3. Salmon E.S. y Buick N. R. "Preparation of permanent slides of intact Soft-Agar colony cultures of hematopoietic and tumor stem cells". *Cancer Res*, 1979;39:1133-1136.
4. López A.F. "Activation of granulocyte cytotoxic function by purified mouse colony-stimulating factors", *J Immunol* 1983;131:2983-2988.
5. Kristosek A. y Sachs L. "Control of lysozyme induction in the differentiation of myeloid leukemic cells", *Cell* 1976;9:675-684.
6. Calcagno M. "Evidence of the existence of a factor that induces C₃ receptors on bone marrow cells", *Blood* 1983;61:403-407.
7. Calcagno M. "Evidence of the existence of a factor that induces Fc receptors on bone marrow cells", *Blood*, 1982;59:756-760.
8. Metcalf D., Johnson G. R. y Burgess A. W. "Direct stimulation by purified GM-CSF of the proliferation of multipotential and erythroid precursors cells", *Blood* 1980;55:138-146.
9. Burgess W. A. y Metcalf D. "The nature and action of Granulocyte-macrophage colony stimulating factors", *Blood* 1980;56:947-958.
10. Lotem J., Lipton JH y Sachs L. "Separation of different molecular forms of macrophage and granulocyte-inducing proteins from normal leukemic myeloid cells", *Int J Cancer* 1980;25:763-771.
11. Nicola M A, Burgess A W y Metcalf D. "Similar molecular properties of granulocyte-macrophage colony stimulating factors produced by different mouse organs in vitro and in vivo", *J Biol Chem*, 1979;254:5290-5299.
12. Waheed A, Shadduck R.K. "Purification and properties of L cell-derived colony-stimulating factor", *Clin Res*, 1978;94:180-194.
13. Di Persio, J. F. "Human cell lines that elaborate colony stimulating activity for the marrow cells of man and other species" *Blood* 1977;51:507-519.
14. Eaves A. y Bruce W. "In vitro production of colony stimulating activity: I. Exposure of mouse peritoneal cells to endotoxin"; *Cell Tissue Kinet* 1973;7:19-27.
15. Cline M. J., Rotham B. y Golde D. W. "Effect of endotoxin on the production of colony stimulating factor by human monocytes and macrophages", *J Cell Physiol* 1974;84:193-203.
16. Andersson J. "The mitogenic effect of lipopolysaccharides on bone marrow-derived mouse lymphocytes", *J Exp Med* 1973;137:943-953.
17. Fibach E. y Sachs L. "Control of normal differentiation of myeloid leukemic cells. IV. Induction of differentiation by serum endotoxin" *J. Cell Physiol* 1974;83:177-186.
18. Marbry J., Carbone P. P y Bull J. M. "Amplification of colony stimulating activity in human serum by interaction with CSA from other sources", *Exp Hematol* (Denmark) 1975;6:354-361.
19. Rabelino M. W. "Membrane receptors of mouse leukocytes. II. Sequential expression of membrane receptors and phagocytic capacity during leukocyte differentiation". *J Exp Med* 1978;147:434-445.
20. Abdou N. D. "Heterogeneity of pathogenetic mechanisms in aplastic anemia", *Annals of International Medicine*, 1981;85:43-50.
21. Wintrobe M. M. *Clinical Hematology*, Lea & Febiger Philadelphia. 1965;pp. 1741-1776.
22. Bacigalupo A. "Severe aplastic anaemia: correlation of in vitro tests with clinical response to immunosuppression in 20 patients", *J Haematol* 1980;47:223-233.
23. Bacigalupo A. "Immune suppression of hematopoiesis in aplastic anemia activity of T-Y lymphocytes", *J Immunol* 1980;1254:1449-1453.