

J.E.N.526

Sp ISSN 0081-3397

**TERMO - RADIOSENSIBILIDAD DEL PRECURSOR
HEMATOPOYETICO QUE ORIGINA LAS SERIES
GRANULOCITICA Y MACROFAGA DE RATON.**

**I. Desarrollo del cultivo "in vivo" y efectos
... producidos por la hipertermia.**

por

J. A. Bueren

M. Nieto

JUNTA DE ENERGIA NUCLEAR

MADRID, 1983

CLASIFICACION INIS Y DESCRIPTORES

C10
RADIOSENSITIVITY
MICE
PRECURSOR
IN VIVO
HYPERTERMIA
CELL FLOW SYSTEMS
LEUKOCYTES
MACROPHAGES
BONE MARROW

Toda correspondencia en relación con este trabajo debe dirigirse al Servicio de Documentación Biblioteca y Publicaciones, Junta de Energía Nuclear, Ciudad Universitaria, Madrid-3, ESPAÑA.

Las solicitudes de ejemplares deben dirigirse a este mismo Servicio.

Los descriptores se han seleccionado del Thesaurus del INIS para describir las materias que contiene este informe con vistas a su recuperación. Para más detalles consúltase el informe IAEA-INIS-12 (INIS: Manual de Indización) y IAEA-INIS-13 (INIS: Thesaurus) publicado por el Organismo Internacional de Energía Atómica.

Se autoriza la reproducción de los resúmenes analíticos que aparecen en esta publicación.

Este trabajo se ha recibido para su impresión en
Diciembre de 1982



I N D I C E

	<u>Página</u>
CAPITULO I	
INTRODUCCION	1
I.1. Objeto e interés del trabajo	2
I.2. Origen y evolución en el estudio de los efectos biológicos originados por la hipertermia	4
I.3. Muerte reproductiva celular	6
I.4. El sistema Mononuclear Fagocitario	7
I.5. El sistema de renovación granulocítica	9
I.6. Cultivo celular de precursores hematopoyéticos.	12
I.6.1. Introducción	12
I.6.2. El precursor granulocítico-macrófago ..	15
I.6.3. El sistema proliferativo de los precursores hematopoyéticos de ratón	17
I.6.4. La cámara de difusión como método de cultivo "in vivo"	23
I.7. El blanco celular para la hipertermia	26
CAPITULO II	
MATERIAL Y METODOS	27
II.1. Cámaras de difusión	28
II.2. Preparación del medio	29
II.3. Técnica de cultivo en cámara de difusión	31
II.3.1. Animales de experimentación	31
II.3.2. Preparación de la suspensión celular de médula ósea	31

II.3.3.	Llenado e implantación de las cámaras .	34
II.3.4.	Extracción y preparación de las cámaras para el contaje	35
II.3.5.	Estudios morfológicos	37
II.3.6.	Esquema general de la técnica	38
II.4.	Tratamientos térmicos. Corrección del tiempo de exposición	39
II.5.	Método de minimización numérica	42
II.6.	Representación gráfica de las curvas de supervivencia	44

CAPITULO III

RESULTADOS	45	
III.1.	Estudio morfológico	46
III.2.	Evolución de las colonias en el cultivo	50
III.3.	Estudio de la correlación entre el número de células sembradas por cámara de difusión y el número de colonias contadas a 5 días de cultivo .	52
III.4.	Efecto de la hipertermia sobre la integridad reproductiva del precursor G-M de CDA	54
III.4.1.	Modelo teórico	54
III.4.2.	Parámetros cinéticos deducidos de los valores de supervivencia celular. Ajuste previo	56
III.4.3.	Cálculo del tiempo efectivo de exposición hipertérmica	62
III.4.4.	Curvas de supervivencia celular obtenidas según los valores de tiempo = efectivo de tratamiento	75
III.4.5.	Representación de Arrhenius..Cálculo de la Energía de activación	82
III.4.6.	Curvas de supervivencia celular, considerando la existencia de un número de blancos común, en el intervalo = 42,5-44°C	82

III.4.7.	Cálculo de la Entalpía, Energía libre y Entropía de activación	88
III.4.8.	Reparación celular del daño subletal acumulado	90

CAPITULO IV

DISCUSION	95
IV.1. Método de cultivo y clasificación de las colonias	96
IV.2. El precursor G-M de CDA	99
IV.3. Evolución de las colonias en el tiempo	101
IV.4. Estudio de la correlación entre el número de células sembradas y las colonias contadas a 5 días de cultivo	104
IV.5. El modelo multiblancos de 1 impacto en el ajuste de las curvas de supervivencia	106
IV.6. Efecto de la hipertermia sobre la viabilidad proliferativa del precursor G-M de CDA	108
IV.7. Hipótesis de un número común de blancos	115
IV.8. Reparación del daño subletal acumulado	117
IV.9. Implicaciones termodinámicas deducidas de la cinética de muerte celular	119
IV.9.1. Consideraciones previas	119
IV.9.2. Estudio termodinámico en la teoría del blanco	120
IV.9.3. Estudio comparado de los parámetros termodinámicos obtenidos según la cinética celular con los que se deducen de la inactivación de las moléculas "in vitro".	121
IV.9.4. Implicaciones termodinámicas deducidas del estudio de los efectos de la hipertermia en distintas líneas celulares ..	125

CAPITULO V

CONCLUSIONES 129

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA 133

CAPITULO I. INTRODUCCION

I. 1. Objeto e interés del trabajo.

El presente trabajo ha tenido por objeto estudiar los efectos letales del calor en el precursor hematopoyético de las series granulocítica y macrófaga de ratón, mediante una técnica de cultivo que permite su proliferación "in vivo".

El interés por el estudio de los efectos biológicos originados por la hipertermia sólo o asociada a radiaciones ionizantes deriva de las razones por las cuales se considera a este agente de una gran importancia para la futura terapéutica de tumores y que, principalmente, son:

1. La fase de síntesis de ADN, que es relativamente radiorresistente, es a su vez muy termosensible, y puede ser selectivamente radiosensibilizada mediante la combinación de la hipertermia con la radiación X. Las células en ciclo de los tumores que se encuentran en la fase S, y que normalmente sobreviven a los rayos X, perderán su viabilidad al realizar el tratamiento hipertérmico (Westra y Dewey, 1971; Harisiadis y col., 1975; Kim y col., 1976; Bhuyan y col., 1977).

2. Las células radiorresistentes que se encuentren en estado de hipoxia en los tumores, desaparecerán como consecuencia del tratamiento hipertérmico, ya que estas células son selectivamente más termosensibles (Gerweck y col., 1974; Hahn, 1974).

3. Una disminución de pH origina un aumento de la termosensibilidad de las células, por lo que la acidificación metabólica, consecuencia del estado de hipoxia en los tumores, origina una sensibilización de las células ante la hipertermia (Ger -

weck y Rottinger, 1976; Freeman y col., 1980).

A pesar de que en la actualidad los estudios sobre los efectos biológicos inducidos por la hipertermia son numerosos, apenas existen trabajos que se refieran a la termosensibilidad de las células cepa y de otros precursores celulares.

Puesto que el compartimento de los precursores hematopoyéticos se caracteriza por ser uno de los más radiosensibles del organismo y dada la similitud que existe en la respuesta celular ante las radiaciones y la hipertermia, hemos escogido una célula de este compartimento para la realización del trabajo y concretamente el precursor granulocítico y macrófago, responsable de la producción de estas dos líneas.

Para estudiar el efecto que ejercen los tratamientos de hipertermia sobre la integridad reproductiva de este precursor, ha sido necesaria la utilización de una técnica adecuada que permita su proliferación y expresión mediante colonias.

De los variados métodos de cultivo existentes, hemos partido de una técnica que a diferencia de la mayoría, se realiza "in vivo". Para ello se utilizan cámaras de difusión de implantación intraperitoneal que permiten que la proliferación celular se realice en condiciones fisiológicas, no necesitándose de requerimientos externos de crecimiento.

I. 2. Origen y evolución en el estudio de los efectos biológicos originados por la hipertermia.

Recientemente se ha observado un aumento en el interés por el estudio de los efectos biológicos causados por la hipertermia, en muchos casos debido a las ventajas que puede representar en la terapéutica de tumores. Ya en 1866 aparecieron artículos clínicos que trataban sobre la desaparición o regresión de tumores, como consecuencia de situaciones de elevada temperatura, causada por infecciones estreptocócicas (Buch, 1866; Coley, 1893).

Por otra parte, en lo que respecta al estudio conjunto radiación-hipertermia, Warren (1935) mostró las ventajas de una terapia a base de fiebre artificial combinada con radiaciones ionizantes.

En 1903, Jensen muestra como un sarcoma transplantable tolera tratamientos de calor de 46°C por cinco minutos, pero que pierde su transplantabilidad cuando se calienta a 47°C, este mismo tiempo.

Experiencias similares han puesto de manifiesto que la mayoría de los tumores estudiados son sensibles al calor y que incluso a temperaturas no muy elevadas (41,5-42°C) se puede destruir la viabilidad del tejido tumoral si el tiempo de exposición es suficientemente largo: 15 ó 20 horas (Stephenson, 1919; Sugiura, 1941; Selawry y colaboradores, 1957).

La diferencia de termosensibilidad entre células normales y cancerosas ha sido puesta de manifiesto por numerosos autores (Chen y Heildelberger, 1969; Cavaliere y col., 1967; Gio-

vanella y col, 1973; Muckle y Dickson, 1978; Ovrergaard,1972), aunque con un nivel respuesta muy variado, en muchos casos debido a las dificultades técnicas encontradas.

Mediante exposiciones hipertérmicas, se reduce la síntesis de los ácidos nucleicos y proteínas en las células tumorales, mientras que la proliferación de las células normales = no se encuentra alterada (Mondovi y col., 1969).

El proceso de la inhibición del crecimiento por hipertermia está determinado, en gran manera, por la tasa de proliferación de las células tumorales (Giovanella y Heilderberger, 1968) y puede ser intensificado por la utilización de distintas drogas (Giovanella y col.,1969)

La aplicación local en el tumor y su periferia mediante calentamiento con baño de agua, microondas, ultrasonidas, = etc., inicialmente sólo se consideraba posible en tumores superficiales, debido al enfriamiento vascular producido en partes más profundas; sin embargo, recientemente ha sido desarrollada una nueva tecnología que permite el tratamiento local y uniforme de hipertermia a distintas profundidades, mediante la utilización de radiofrecuencia (Storm y col., 1979; Storm y = col., 1980).

Aunque un gran número de trabajos muestran el efecto del calor en la inhibición del crecimiento de algunos tumores, no existe todavía información suficiente para responder con = exactitud a algunas cuestiones que deberán quedar resueltas antes de que este tipo de tratamiento se utilice de manera generalizada en clínica.

I. 3. Muerte reproductiva celular.

Una curva de supervivencia celular describe la relación entre la "cantidad" de agresión recibida por las células = (dosis de radiación, tiempo de exposición hipertérmica) y la = proporción de éstas que "sobrevive".

La supervivencia celular o mejor su inverso, la muerte celular, se define de distintas maneras, de acuerdo al tipo de célula a estudiar. Para células diferenciadas que no proliferan la muerte puede ser definida como la pérdida de una función específica; sin embargo, para células que se dividen, como en el caso de las que crecen en un cultivo, una definición apropiada puede ser la "pérdida de la capacidad de mantener la proliferación", lo que suele ser llamado INTEGRIDAD REPRODUCTIVA.

Una célula clonogénica (que produce colonias o clones) puede estar físicamente presente, aparentemente intacta, pero = haber perdido su capacidad de mantener divisiones sucesivas por el período necesario para producir una determinada progenie. Si ello sucede, se considera que ha perdido su integridad reproductiva.

I. 4. El Sistema Mononuclear Fagocitario.

El término "Sistema Retículo Endotelial" (SRE), fué inicialmente introducido por Aschoff y Kiyona, en 1924, para designar un conjunto de células que, a su juicio, tenían un origen común y compartían una serie de propiedades, fundamentalmente la de fagocitar materiales extraños. El concepto de SRE ha ido evolucionando con el tiempo y en la actualidad puede decirse que ni la concepción del SRE ni la del Sistema Retículo-histiocitario (SRH) constituyen un marco adecuado para emplazar a una serie de células que, en base a los modernos conocimientos de biología y cinética celular, comparten una serie de características en común.

En 1969 (Van Fürth), surge la idea de agrupar todas las células mononucleadas altamente fagocíticas en un sistema celular, denominado Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF). Los histiocitos (macrófagos) y sus precursores, únicas células que integran este sistema, nada tienen que ver con las células endoteliales y con las reticulares, dado que su origen y características son totalmente distintas.

El SMF comprende un gradiente madurativo que parte de un precursor celular íntimamente relacionado con la serie granulocítica, pasa por un estadio de monoblasto y promonocito a nivel de médula ósea, transita por la sangre periférica en forma de monocito maduro y, por último, se afinsa en los tejidos, donde es capaz de diferenciarse morfológica y funcionalmente, transformándose en un macrófago. El aspecto morfológico de esta célula ofrece una gran variedad, dependiendo del tejido en don

de se asiente: Conectivo-histiocitos, hígado-células de Kupffer, pulmón-macrófagos alveolares, ganglios linfáticos-macrófagos libres y fijos, médula ósea-macrófagos, cavidades serosas-macrófagos pleurales y peritoneales, tejido óseo-osteoblastos, sistema nervioso-microglia, aunque la filiación al SMF de estos dos últimos es algo más dudosa que la de los anteriores.

Una vez alcanzado el alojamiento extravascular, se han observado vivos a los macrófagos hasta 59 días e incluso más en cultivos celulares "in vitro".

El aspecto con que se presentan estas células en los cultivos es muy variado, dependiendo de su estado de maduración, por lo que las colonias de este tipo de células han sido denominadas de distintas formas, según el criterio de los autores. La terminología más frecuentemente utilizada es la que se refiere a las colonias como mononucleares, macrófagas, o monocíticas. Sin embargo, todas ellas hacen mención a la misma serie celular, por lo que se consideran la expresión de una misma célula.

I. 5. El sistema de renovación granulocítico.

El sistema de renovación granulocítico-neutrófilo puede ser dividido en diferentes compartimentos que difieren en su función. (Fig. 1).

- Compartimento de células cepa y de precursores "determinados"

Su función puede ser considerada doble. Por una parte, mantienen el tamaño de este compartimento, mediante una adecuada actividad mitótica y, por otra, se encarga de producir el flujo celular necesario para la granulocitopoyesis. El mantenimiento de la línea granulocítica en la sangre depende enteramente de este flujo.

- Compartimento multiplicativo.

El compartimento multiplicativo es alimentado desde el de las células cepa y está formado por células que simultáneamente llevan a cabo diferenciación y multiplicación. Es considerado un compartimento de proliferación y tránsito.

El humano comprende mieloblastos, promielocitos y mielocitos, que se caracterizan por su capacidad de sintetizar ADN y llevar a cabo mitosis. El número de divisiones que parecen producirse en este compartimento es de unas 3-4, por lo que, en estado estacionario, se producirían de 8 a 16 células por cada precursor que entrara. El tiempo invertido desde la llegada de una célula hasta que se produce la transición de mielocito a metamielocito es aproximadamente igual a la suma de =

los tiempos de ciclo de las células en su paso de mieloblastos a metamielocitos y en el hombre está próximo a los 4-6 días.

- Compartimento de maduración y almacenamiento.

Aquí, las células han cesado de proliferar y gradualmente maduran desde metamielocitos hasta neutrófilos en banda y segmentados. Bajo condiciones normales, la emisión de células a la sangre comienza desde el estado de banda, aunque la mayoría de las células no son liberadas hasta que han alcanzado el estado de segmentados.

En el hombre, el tiempo de tránsito en este compartimento es de 3-5 días y sobre un día y medio en ratón. Sin embargo, se reduce considerablemente en procesos infecciosos, por lo que se refleja que, además de ser un compartimento de maduración, sirve también como reserva.

- Compartimento funcional.

Los granulocitos en la sangre son distribuidos en dos tipos de compartimentos: uno circulante y otro marginal. Ambos resultan semejantes en cuanto a su tamaño, son rápidamente intercambiables y cinéticamente pueden ser considerados como único compartimento. Los neutrófilos desaparecen de la sangre de una manera exponencial, siendo muy corto su tiempo de permanencia en este compartimento: $t_{1/2} \approx 7$ horas, en el hombre.

C. PRECURSORES... C. MULTIPLICATIVO

C. MADURACION

C. FUNC.

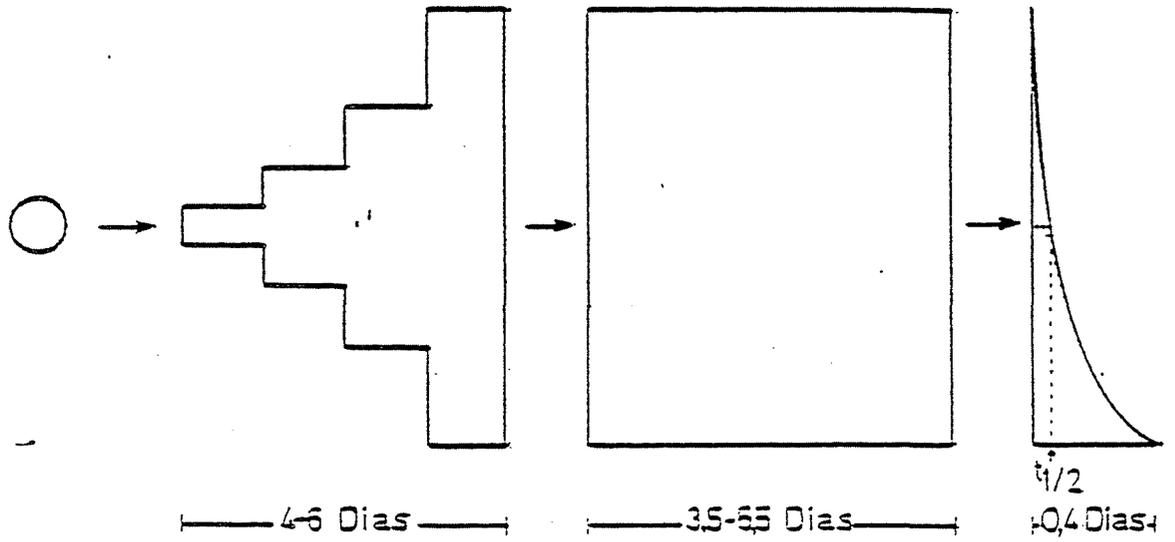


Figura 1. Esquema del sistema granulopoyético y sus parámetros de tiempo en el hombre.

I. 6. Cultivo celular de precursores hematopoyéticos.

I. 6. 1. Introducción.

Durante muchos años, ha sido tema de debate si las células cepa hematopoyéticas constituían un compartimento unipotente o multipotente, esto es, si una célula cepa podía ser la precursora de todas las células hematopoyéticas o, si, por el contrario, cada línea celular poseía su propia célula cepa. En ciertas especies, como en ratón, las experiencias realizadas indicaron la existencia de un precursor común para todas ellas. Ford (1956) y Barnes (1959) establecieron el hecho de la presencia de una población, que puede ser cromosómicamente marcada como población clonal y que puede originar todos los tipos de células hematopoyéticas (En humano, permanece sin esclarecer si los linfocitos proceden de un precursor linfopoyético independiente).

A pesar de que la existencia de una célula cepa multipotente quedó comprobada en ciertas especies, su número y el de los otros precursores más diferenciados que esta célula produce es tan escaso, que su reconocimiento se realiza a través de la progenie.

Till y Mc Culloch (1961) establecieron una técnica de cultivo "in vivo", que ha resultado crítica en el avance del conocimiento de los precursores hematopoyéticos. Dicha técnica consiste en la inyección intravenosa, en ratón esterilizado por irradiación letal, de una suspensión de células procedente de un órgano hematopoyético. Tras un determinado período de tiempo, se observan en el bazo de los ratones, pequeñas vesicu

las compuestas por multitud de células de las series eritroide, granulocítica, monocítica y megacariocítica, y fueron consideradas como la expresión de las CFU-s (Unidad Formadora de Colonias en Bazo).

Un nuevo avance surgió con la aparición de la técnica de cultivo "in vitro", realizada por Pluznik y Sachs (1965, 1966) y por otra parte por Bradley y Metcalf (1966). En los cultivos, se observaba la aparición de colonias de granulocitos y de macrófagos, en una matriz preparada a base de agar. Para que las colonias llegaran a desarrollarse resultaba necesaria la presencia de un factor especial, denominado CSF (Factor Estimulante de Colonias). El origen clonal de estas colonias se sostenía por los resultados obtenidos en los estudios de transferencia de células aisladas (Metcalf, 1970).

Tras los estudios realizados para analizar el contenido de estas colonias y de las que aparecían en bazo, se sugirió la idea de que la CFU-s y este precursor unipotente (CFC'S, en la denominación de Metcalf), fueran los mismos (Wu y col., 1968). Sin embargo, existen numerosas pruebas en contra, que han rechazado la hipótesis, entre ellas:

- La inyección de dosis letales de timidina tritiada en animales adultos normales, mata sólo una pequeña proporción de la CFU-s (Becker y col., 1965, y Lajtha y col., 1969), mientras que para los mismos animales, la muerte para CFC'S es mucho mayor (Lajtha, 1969).
- Mediante la centrifugación en gradiente, se observan diferentes regiones de distribución para ambos precursores (Haskill

y col., 1970; Worton y col., 1969).

- Cuando las células de médula ósea normal se pasan por columnas, bajo condiciones que favorezcan la adherencia celular y se realiza un ensayo para CFU-s y CFC'S (D. Metcalf, M.A.S. Moore, 1971) no se observa una correlación entre ellas.

Después de la técnica que permitió la expresión del = precursor granulocítico-macrófago mediante colonias, surgieron nuevas técnicas que permitieron una proliferación de otros precursores tales como los eritropoyéticos (McLeod y col., 1974; Ben-Ishay, 1975) y megacariopoyéticos (Nakeff y Daniels-Mc = Queen, 1976).

I. 6. 2. El precursor granulocítico-macrófago.

Desde la aparición de la técnica que permitió la expresión de un precursor granulocítico-macrófago (G-M), mediante sus colonias (Pluznik y Sachs, 1965; Bradley y Metcalf, 1966) y hasta la actualidad, han aparecido nuevos procedimientos de cultivo y de separación celular que han permitido conocer la existencia de distintos precursores G-M.

Sin embargo, y puesto que en muchos casos la denominación del precursor celular va ligado con el método de cultivo utilizado, aparecen en la bibliografía multitud de precursores G-M de distintos nombre, que en muchos casos pueden corresponder a la misma célula.

En una revisión sobre las publicaciones del tema podemos encontrar, entre otros, los siguientes nombres de precursores: CFC's in vitro (Bradley Metcalf, 1966); CFUa (Dickey y col., 1971), ADC colony precursor cell (Gordon, 1974), CFU-GM (Jonhson, 1977), CFU-d (Jacobsen, 1975), DCPC (Benestad, 1970; Boyum y col., 1970), CFU-C (nombre generalizado para precursores que originan colonias de granulocitos y macrófagos, en cultivos "in vitro").

Entre todos ellos, parece que la CFU-d es la que presenta mayores diferencias en cuanto a sus propiedades.

Jonhson (1977) señala que el precursor celular que origina colonias a los catorce días de cultivo es diferente del que origina colonias al séptimo. Otros, obtienen resultados análogos: Jacobsen (1978, 1979) muestra a la CFU-d como precursor

ra de la CFU-C, así como también indica la existencia de dos =
subpoblaciones dentro de éstas, de manera que considera a la =
CFU-C de catorce días como precursora de la de siete. Bol y =
Williams (1980) indican la existencia de tres subpoblaciones =
dentro de la CFU-C. Standem (1980) nuevamente muestra a la =
CFU-C como un compartimento no homogéneo.

Estos hechos indican la existencia de distintos tipos
de precursores G-M; sin embargo, todavía permanece sin enclare
cer si de entre ellos alguno, origina de una manera definida =
cada una de las series (granulocítica y macrófaga) independien
temente. Inicialmente, se consideró que todos los precursores
de este compartimento eran "comunes", aunque en la actualidad
se considera probable la existencia de precursores "determina
dos" que originen sólo una de estas dos series.

I. 6. 3. El sistema proliferativo de los precursores hematopoyéticos de ratón.

Debido al gran avance que ha ido suponiendo para la hematología la aparición de modernas técnicas que permiten la expresión de los precursores indiferenciados mediante su progenie, los esquemas planteados sobre el sistema hematopoyético, paralelamente, han ido evolucionando.

A continuación indicamos tres modelos esquemáticos sobre el sistema proliferativo de los precursores hematopoyéticos del ratón, en los que puede apreciarse un aumento progresivo de la complejidad, a medida que aparecen nuevos métodos de cultivo que permiten identificar más precursores.

1. Modelo histórico descrito según el concepto tradicional de líneas celulares basado en meticolosos estudios morfológicos (Brennan y col., 1980).

PSC: Pluripotent Stem Cell. Compartimento de stem cells capaz de originar eritrocitos, neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos, megacariocitos, linfocitos T y B.

HPC: Precursor celular hematopoyético común.

TSC: Célula sensible a trombopoyetina.

GSC: Célula sensible de granulopoyetina.

ESC: Célula sensible a eritropoyetina.

LPC: Precursor celular linfopoyético común.

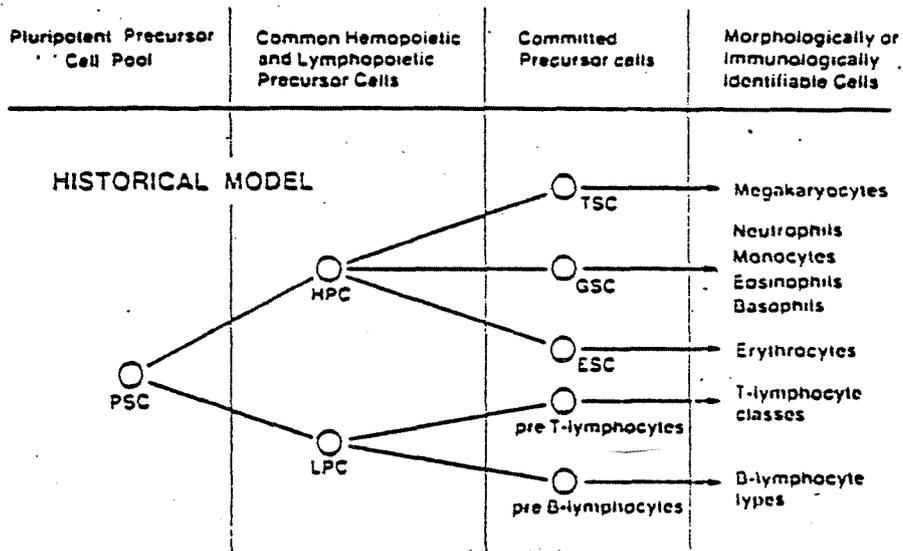
2. Esquema elaborado por Cline y Golde (1979):

a) Corresponde al desarrollo linfoide y mielóide desde un precursor celular multipotente.

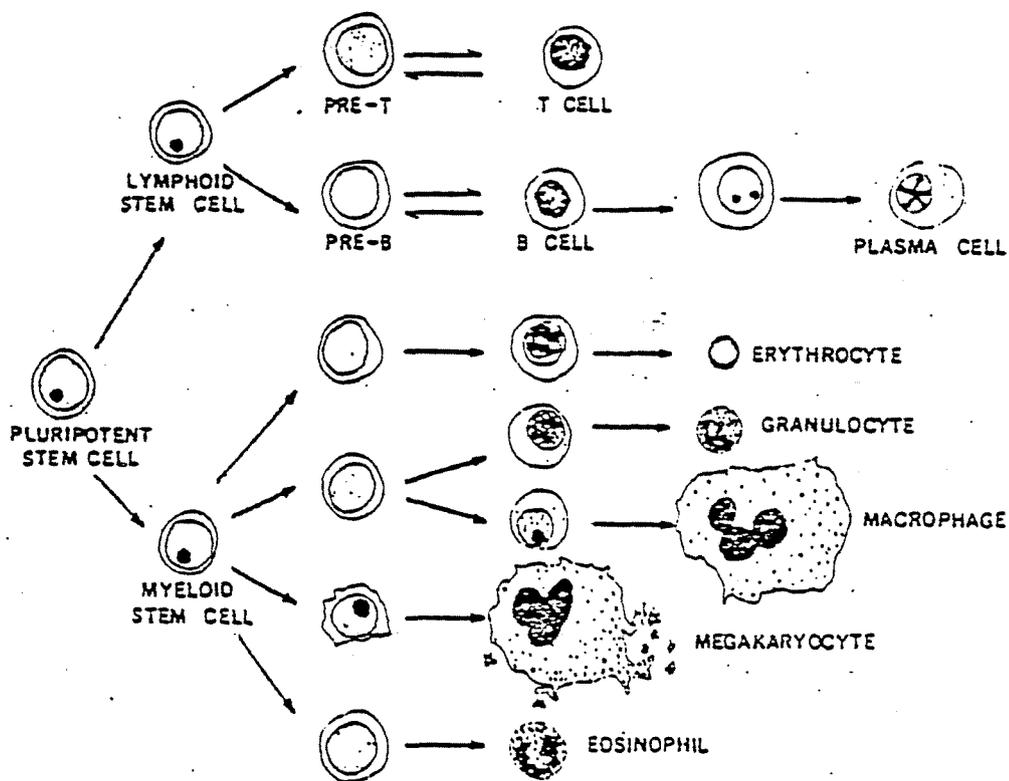
b) Análogo al apartado a), pero mostrando los precursores celulares definidos mediante ensayo clonogénico.

3. Modelo experimental indicando las distintas células identificadas mediante estudios genéticos y fisiológicos, correspondiente al año 1980 (Brennan y otros, 1980).

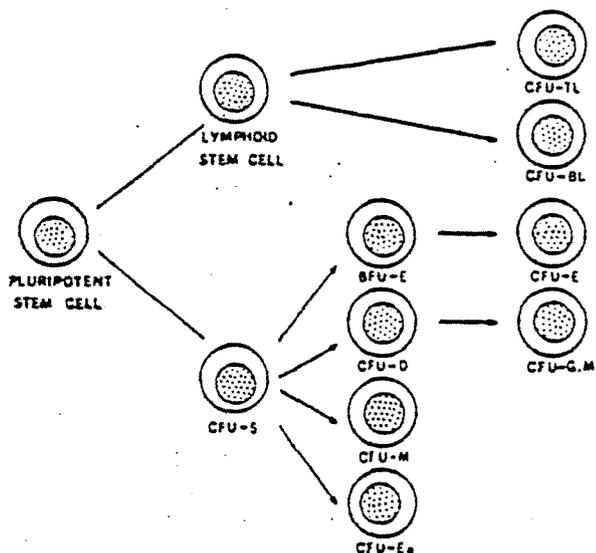
CFU-H: Precursor celular para todas las células mieloides. La CFU-s podría corresponder aproximadamente a esta célula en cuanto a su capacidad proliferativa.

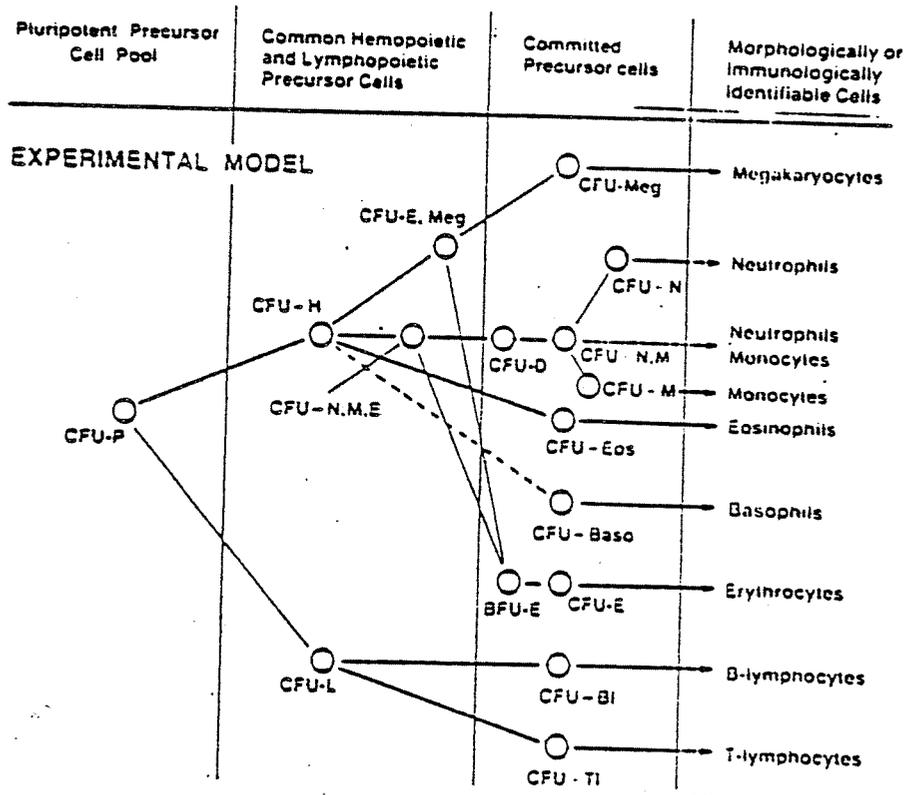


1.



2 b.





Esquema 1. Modelos proliferativos de los precursores hemato-poyéticos de ratón.

En lo concerniente a las series granulocítica y macrófaga, el modelo histórico consideraba la existencia de un precursor común para neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos.

En el siguiente modelo, elaborado por Cline, se aprecia la derivación del precursor eosinófilo a partir de la CFU-s y la presencia de 2 precursores (CFU-D y CFU-G,M), con distinto grado de diferenciación, pero ambos correspondientes a las series granulocítica-macrófaga. Es de destacar, también, que no aparecen precursores G-M "determinados", sino que, por el contrario, éstos son siempre comunes para las dos series.

En el último modelo que presentamos, se presupone la existencia de un precursor basófilo que deriva de una célula equivalente a la CFU-s. La CFU-G,M ahora se considera que por originar sólo los granulocitos neutrófilos y los monocitos, se debe denominar CFU-N,M, que a semejanza con el modelo anterior procede de una CFU-D. Por último, aparecen precursores N,M "determinados" (CFU-N y CFU-M), que junto con la CFU-N,M originan los neutrófilos y los monocitos. Sin embargo, en su trabajo, Brennan solamente señala como probable la existencia de tales precursores "determinados", basándose en la aparición de colonias puras en los cultivos.

Nosotros hemos seguido la terminología que utilizó Gordon (1974), dado que el trabajo lo hemos realizado partiendo de su técnica. Puesto que este autor no entra en consideraciones sobre la aparición de colonias eosinófilas o basófilas en los cultivos, simplemente indica que el precursor que prolifera es el precursor G-M de cámara de difusión de agar y señala que su com-

portamiento es de una gran semejanza con la clásica CFU-C. Creemos que hasta que no aparezcan estudios que demuestren la inexistencia de colonias eosinófilas o basófilas en estos cultivos de cámara de difusión, el hacer referencia a precursores N,M es = más arriesgado que el considerar la presencia de algún tipo de = precursor G-M, entendiendo por ello a una célula que origina macrófagos y granulocitos no exclusivamente neutrófilos.

I. 6. 4. La cámara de difusión como método de cultivo "in vivo".

Muy numerosas han sido las técnicas utilizadas para el cultivo de precursores G-M.

Desde un principio y hasta la actualidad, se utilizaron técnicas de cultivo "in vitro", en las cuales las células correspondientes a la suspensión de un órgano hematopoyético = eran sembradas en una matriz semisólida de agar o metilcelulosa, que contenía, además, medio adecuado de cultivo y una capa productora del factor CSF. (Pluznik y Sachs, 1965; Bradley y Metcalf, 1966; Dicke, 1971).

Después de esta técnica surgieron otros métodos de cultivo que pretendían la mejora de las condiciones necesarias para la proliferación celular. Aparecieron métodos de cultivo "in vitro" pero en medio líquido, que en algunos casos no necesitaban del factor estimulante del crecimiento (Golde y Cline, 1973). Desde 1958 (Algire y col.), e intentando que el desarrollo celular se realizara bajo condiciones más fisiológicas, se estudiaron técnicas de cultivo en cámara de difusión. Berman (1959) observó que, a diferencia de lo que ocurre en los cultivos "in vitro", cuando se cultivan células de médula ósea de ratón en una cámara que permite la difusión de los fluidos de éste, el aspecto morfológico original de las células sembradas se mantiene en los primeros días de cultivo y posteriormente se produce la proliferación y diferenciación durante largos períodos de tiempo (215 días).

La técnica de la cámara de difusión experimentó un =

gran auge y se estudiaron modificaciones de este método de cultivo, que consistían, principalmente, en variar la matriz de la cámara y en muchas ocasiones llenarla simplemente con la suspensión celular (Boyum y Borgstrom, 1970; Benestad, 1970). En 1974, Gordon empleó una matriz a base de agar que permitía también la formación de las colonias procedentes de donadores leucémicos. Steinberg (1976) añade al contenido de la cámara, plasma citratado de bovino, de manera que al recoger los cultivos, observa la aparición de colonias de las series blanca y roja.

A pesar de las múltiples técnicas que existen en cámara de difusión, el fundamento de todas es el mismo: crear un compartimento dentro de la cavidad intraperitoneal, generalmente de ratón, en el cual se impida el tránsito celular y que, por el contrario, permita el flujo de las sustancias químicas propias del ratón, necesarias para la proliferación de las células que se encuentran en su interior.

En nuestro caso, las cámaras estaban constituidas por un anillo acrílico que lleva adherido en sus caras un filtro Millipore y una lámina plástica, respectivamente.

A través de los finos poros del filtro no es posible que exista paso de células, pero sí de los nutrientes y de los factores necesarios para el crecimiento.

Cuando en su interior, además de la suspensión celular, se introduce agar u otro producto que gelifique, las células sembradas quedan inmobilizadas. Por tanto, transcurrido un determinado número de días de cultivo en el interior del ratón, se

observan las colonias características, que son la expresión de los precursores.

Este tipo de cultivo es, pues, "in vivo" y por ello, todos los requerimientos, imprescindibles para la formación de las colonias en técnicas "in vitro" (regulación del pH, humedad, necesidad de utilizar una plataforma capaz de producir la liberación del CSF, etc.) no son necesarios.

I.7. El blanco celular ante la hipertermia.

A pesar de los múltiples trabajos realizados tratando de identificar la molécula blanco, responsable primaria de la muerte por hipertermia, no existen todavía pruebas concluyentes que demuestren cuál es ésta.

Algunos autores mantienen la hipótesis de que los cambios estructurales que afectan al contenido lipídico de la membrana son los responsables de la muerte celular por hipertermia (Cress y col., 1978; Li y col., 1980). Otros, indican que el daño se produce en diferentes estructuras, como en los lisosomas, en los que aparece un aumento de la actividad enzimática lisosomal (Dvergaard, 1972; Barrat y Wills, 1980), o también a nivel de la síntesis de ARN (Reeves, 1971; Dickson y col., 1972; Strom y col., 1973) o de ADN (Reeves, 1971; Mondovi y col., 1969). Igualmente han sido citadas otras alteraciones celulares: desnaturaciones en algún tipo de proteína (Westra y Dewey, 1971), inhibición de la síntesis de proteínas (Mondovi y col., 1969), incremento de las proteínas cromáticas no histónicas asociadas al ADN (Tomasovic y col., 1978).

Por supuesto, de todas las lesiones producidas por la hipertermia en la célula, existirá una, primaria, que sea la responsable de su muerte, mientras que otras muchas, serán sólo alteraciones secundarias que no afectan directamente a la integridad reproductiva de las células.

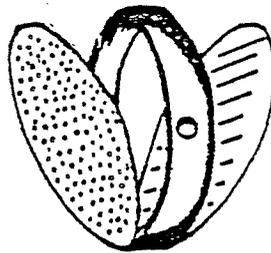
CAPITULO II. MATERIAL Y METODOS

II.1. Cámaras de difusión.

Las cámaras de difusión constan de un anillo de lucita de 14 mm. de diámetro (Millipore), al que se fija mediante pegamento (MI Cement Millipore) una lámina de acetato de celulosa por una cara y por la otra un filtro Millipore de 0,22 micras de tamaño de poro.

Cada anillo posee una perforación para permitir el llenado de la cámara una vez construida. Dicha perforación se selló con el mismo pegamento, con la finalidad de que al atravesarlo con la aguja en el momento del llenado, no existiera espacio por donde pudiera extravasarse la suspensión celular inyectada.

Una vez selladas las cámaras, se procedió a su esterilización aplicando una dosis de 30 KGy, (Co-60).



II.2 . Preparación del medio.

Puesto que el método de cultivo que hemos empleado es "in vivo", el medio presenta la ventaja de que no tiene la necesidad de poseer todos los elementos necesarios para que se desarrollen las colonias; sin embargo, hemos procurado ajustarnos a las condiciones de un medio de crecimiento, con la finalidad de garantizar la integridad reproductiva de las células, hasta que éstas pudieran recibir del ratón el aporte necesario para su proliferación.

La preparación del medio fué llevada a cabo mensualmente, conservándolo en nevera hasta el momento de su utilización. Durante el envasado se preparó el volumen de medio necesario para cada experiencia, en un solo frasco, para evitar problemas de contaminación. Como control se mantuvo cerrado y a temperatura ambiente un envase de cada lote, con la finalidad de comprobar posibles fallos durante el proceso de la esterilización.

De la totalidad del medio preparado, un 70 por 100 aproximadamente se ajustó al doble de su concentración final, pues posteriormente debería ser diluído al 50 por 100 con agar. El resto queda a la concentración normal y destinado a la formación de la suspensión celular.

Una vez constituido el medio, se ajustó el pH entre 7,30 - 7,35, procediéndose posteriormente a la filtración esterilizante.

A continuación aparece detallada la composición del = medio preparado a una concentración 2X.

- M.E.M. Eagle, 10 X (Flow lab.)	100 ml.
- HEPPEES. Solución 1 molar (Flow lab.)	20 ml.
- Suero esterilizado de caballo (Flow lab.)	200 ml.
- L-glutamina (Flow lab.)	292 mg.
- L-asparagina.H ₂ O (Sigma)	12,5 mg.
- Penicilina 5.000 U.I.		
- Estreptomina 5.000 mcg /ml	(Flow lab.) 25 ml.
- H ₂ O	(c.s.p.) 500 ml.

La composición del M.E.M. Eagle es la siguiente:

<u>AMINOACIDOS</u>		<u>VITAMINAS</u>		<u>SALES INORGANICAS Y OTROS COMPONENTES</u>	
(mg/l)		(mg/l)		(mg/l)	
L-Arginina:	126,4	Pantotenato cálcico	1,0	KCl	400
L-Cistina	24,0	Cloruro de colina	1,0	MgCl ₂ .6H ₂ O	200
L-Glutamina	292,0	Acido fólico	1,0	NaCl	6.800
L-Histidina	38,3	Inositol	2,0	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1.500
L-Isoleucina	52,5	Nicotinamida	1,0	Rojo fenol	17
L-Lisina	73,1	Priridoxal ClH	1,0	Glucosa	1.000
L-Metionina	14,9	Rivoflavina	0,1		
L-Fenilalanina	33,0	Tiamina HCl	1,0		
L-Treonina	47,6				
L-Triptófano	10,2				
L-Tirosina	36,2				
L-Valina	46,9				

II.3 . Técnica de cultivo en cámara de difusión.

II.3 . 1. Animales de experimentación.

Se han utilizado ratones ♀ , híbridos del cruce de = dos cepas consanguíneas (♀ C57BL X ♂ BALB/c) de 10 a 15 semanas de edad y con un peso comprendido entre 25 y 30 gramos.

Tanto las cepas consanguíneas como los F1, híbridos = de ambos, fueron producidos en el parque de animales del grupo de Termoeología y Radiobiología de la Junta de Energía Nuclear.

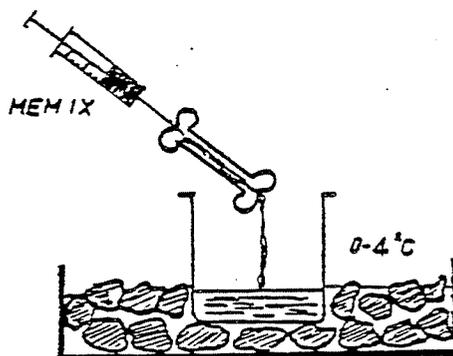
Los animales, desde su nacimiento, se mantuvieron a = las condiciones de 20°C y 50 por 100 de humedad, suministrando les agua y pienso (Sandermus S-10) "ad libitum".

II.3 . 2. Preparación de la suspensión celular de médula ósea.

La técnica seguida para la formación de la suspensión fué la siguiente: Para cada experiencia se sacrifican de 3 a 5 animales mediante dislocación cervical. Inmediatamente, se = extraen los fémures y tibias de ambas patas traseras, en la cámara de flujo laminar.

Los huesos así obtenidos se perforan por sus extremos y mediante jeringa de 1 ml. de aguja 0,5 x 16 mm, conteniendo medio de cultivo 1X (pH: 7,30 - 7,35) se arrastra el tejido hematopoyético alojado en su interior.

Un volumen de medio no superior a 1 ml. por cada médula extraída, nos garantiza una concentración final de células no inferior a 10^7 células/ml.



A continuación, se reduce progresivamente el tamaño de las agrupaciones celulares existentes en la suspensión, lo que se consigue introduciendo la totalidad del volumen preparado = en una jeringa y expulsándolo reiteradamente a través de agujas de calibre progresivamente menor, hasta uno último de 0,5 x 16 mm. La correcta dispersión de las células se comprueba mediante observación de una parte alícuota de la suspensión en el microscopio.

Posteriormente, se realiza la cuantificación de las = células nucleadas, diluyendo con líquido de Türck y realizando el conteo con dos cámaras de Neubauer. Según los casos, la = concentración celular se ajusta a $5 \cdot 10^6$ ó a 10^7 células/ml y = de dicha suspensión se toman 2 ml para cada uno de los tubos en los que posteriormente se realizará el tratamiento térmico.

Exceptuando el tiempo durante el cual se realizan los tratamientos, la suspensión celular se mantiene en baño de hielo (0 - 4°C), permitiéndose que alcance la temperatura ambien-

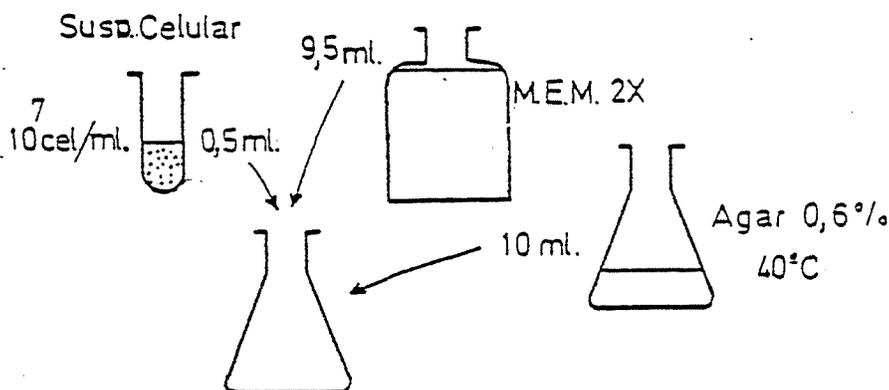
te al añadir el agar, para que no quede formado inmediatamente el gel y así disponer de tiempo suficiente para realizar el llenado de las cámaras de difusión.

La adición de agar se lleva a cabo después de realizados los tratamientos, atendiendo a la concentración celular que se desee que exista en las cámaras de difusión, y que ha variado entre 10.000 y 400.000 células/cámara, según el tipo de experiencia a realizar.

Para la preparación de una concentración de 50.000 células/cámara, el esquema a seguir será el siguiente:

Puesto que la capacidad de cada cámara es de 200 microlitros, cada 20 ml de la suspensión deberán contener $5 \cdot 10^6$ células y, por tanto, si partimos de una suspensión preparada a 10^7 cél./ml, como se indicaba anteriormente, por cada 0,5 ml. de esta suspensión ($5 \cdot 10^6$ células) añadiremos 9,5 ml de medio 2X y 10 ml de agar al 0,6 % (total 20 ml), que era mantenido a la temperatura de 40°C.

La suspensión así preparada queda ajustada a la concentración celular deseada, el medio 2X queda como 1X y la concentración final de agar al 0,3%.

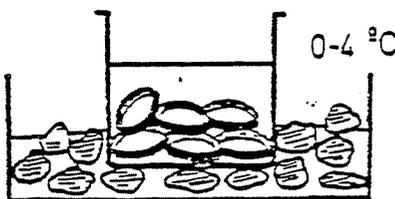


Es de gran importancia añadir los 0,5 ml de la suspensión celular sobre un matraz que contenga los 9,5 ml del medio 2X y que tras una enérgica agitación se añada a continuación el agar y se realice una nueva agitación. En otro caso, se dificulta notablemente la correcta dispersión de las células en el medio, debido a la alta viscosidad del agar.

II.3 . 3. Llenado e implantación de las cámaras.

Cada cámara, ya estéril, se llena con 200 microlitros de la suspensión preparada. Una vez llena, se funde el plástico de los alrededores del orificio, preparado para permitir el llenado, pasando rápidamente por su superficie una aguja calentada al fuego.

Las cámaras quedan dispuesta para ser introducidas intraperitonealmente a los respectivos ratones y mientras tanto se mantienen en M.E.M. 1 X, en baño de hielo.



Para la implantación intraperitoneal, se anestesia a los animales hospedadores mediante éter etílico. Tras realizar una pequeña incisión en su piel y peritoneo, a través de la línea alba, se introduce una cámara por cada ratón, así como una pequeña cantidad de M.E.M. 1X en los alrededores de la cámara

implantada, para impedir la formación de adherencias durante el período de cultivo.

Es importante evitar la pérdida de sangre durante la intervención, pues ello podría actuar como fenómeno estimulante del crecimiento, aumentando, por tanto, la heterogeneidad de los resultados en los contajes.

Finalmente, la herida se cierra aplicando tres puntos de sutura.

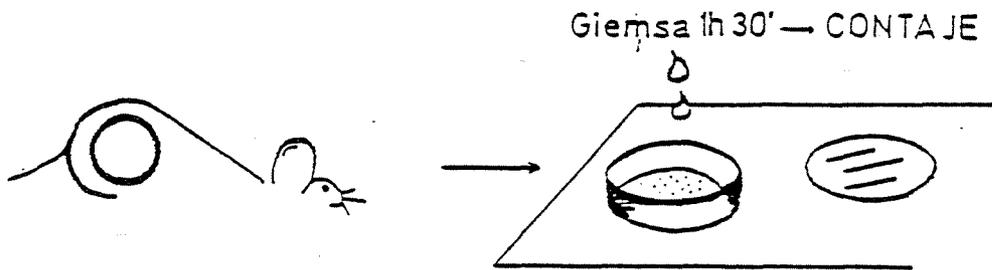
II.3.4. Extracción y preparación de las cámaras para el contaje.

Finalizado el período de cultivo, se procede a sacrificar a los animales mediante intoxicación con éter etílico. A continuación, se extraen las cámaras de la cavidad intraperitoneal y se limpian cuidadosamente. Posteriormente, con la ayuda de un bisturi se despega la lámina de acetato que cubre uno de sus costados.

En la técnica desarrollada por Gordon (1974), es el filtro Millipore el que es retirado de las cámaras, realizando así los contajes directamente. Mediante este procedimiento se observó que, debido a la porosidad de los filtros, un número considerable de colonias eran extraídas junto a éstos; sin embargo, el contenido de las cámaras quedaba prácticamente intacto cuando lo que se extraía era la lámina de acetato.

Las cámaras, abiertas ya por un costado, se adhieren por el otro a un portaobjetos mediante pegamento (MI Cement Millipore).

Debido a que bastantes colonias no eran visibles sin teñir, se procedió a buscar una técnica adecuada de coloración. De las tinciones utilizadas se han obtenido mejores resultados con Giemsa 10 % repetidamente filtrado. Unas gotas de esta solución se añaden a cada una de las cámaras a estudiar, evitando que se derrame. A partir de 1 h. 30 min., las colonias aparecen correctamente teñidas. Otros procedimientos de teñido han resultado inadecuados por colorear en exceso la matriz de agar, impidiendo la observación de las colonias.



II.3 . 5. Estudios morfológicos.

Los estudios de la composición y morfología de las células que componen las colonias se realizaron según el siguiente procedimiento:

Las cámaras de difusión teñidas como se explicó anteriormente, se sitúan bajo el binocular y a 40 aumentos se se leccionan las colonias que se van a estudiar. Una vez escogida la colonia, se clasifica a ésta de acuerdo con su grado de empaquetamiento, en compacta, semicompacta (mixta) o dispersa y, a su vez, según el tamaño de las células que la componen y que se presentan con un aspecto macroscópico de células grandes o células pequeñas.

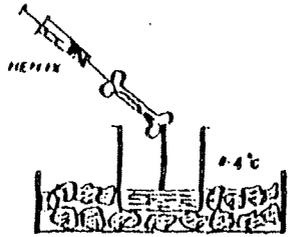
A continuación, mediante una aguja enmangada y un bisturí y controlando la operación en el binocular, se extrae la colonia, evitando tomar partes de otras próximas.

El portaobjetos que contenía la cámara es retirado = del binocular y sustituido por otro limpio. La colonia, que debe permanecer, bien adherida a la aguja o al bisturí, es depositada sobre el nuevo porta, vigilándola en todo momento a través del binocular, para, finalmente, disgregarla y retirar el exceso de agar que la pueda envolver.

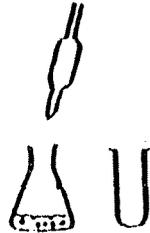
Sólo resta secar al calor, fijar en metanol por diez minutos y, nuevamente, teñir con Giemsa 5%, quince minutos.

Las preparaciones así obtenidas son estudiadas al microscopio para analizar las células que componen cada tipo de las colonias extraídas.

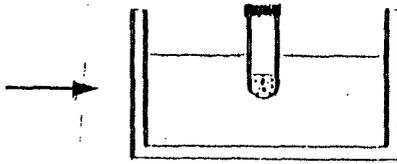
II.3.4. ESQUEMA GENERAL DE LA TECNICA



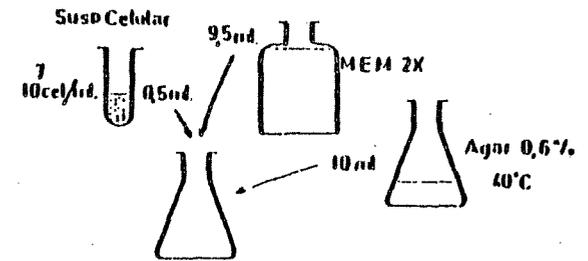
EXTRACCION Y DISPERSION DE LA MEDULA OSEA



DILUCION Y TOMA DE MUESTRAS



TRATAMIENTO TECNICO



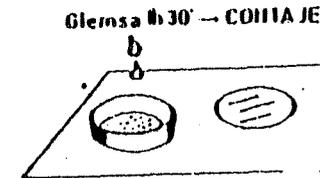
PREPARACION DE LA SUSPENSION PARA EL CULTIVO



LLENADO DE LAS CAMARAS DE DIFUSION



INPLANTACION INTRAPERITONEAL Y CULTIVO



EXTRACCION Y CONTAJE DE LAS COLONIAS

II. 4. Tratamientos térmicos. Corrección del tiempo de exposición.

Una vez preparada la suspensión celular, se introdujeron alícuotas de 2 ml en tubos de vidrio estériles, que posteriormente eran cerrados para evitar cualquier tipo de contaminación.

Excepto en el momento de realizar el tratamiento térmico y con la finalidad de evitar en lo posible la mortalidad celular y también para sistematizar la experimentación y la temperatura de la suspensión en el comienzo del tratamiento térmico, se mantuvieron todos los tubos a baja temperatura, en baño de hielo.

El tratamiento se realizó en un baño termostatzado y con agitación, controlado por un termostato modelo HETO (01 T 623) a $\pm 0,05^{\circ}\text{C}$. Las medidas de temperatura se realizaron mediante un termómetro calibrado (Proton modelo 92. Intervalo = $0-50^{\circ}\text{C}$ en 1/10).

Una vez sacados los tubos del baño de hielo y en el momento de introducir éstos en el nuevo baño, en el que serían sometidos a la acción del calor, se inició el control del tiempo del tratamiento. Este valor de tiempo cronometrado ha sido corregido en todos los casos (Henle y RotiRoti: 1980).

A tiempo $t = 0$, la temperatura en el interior de los tubos se mantiene entre $0 - 4^{\circ}\text{C}$. Hasta que la suspensión alcanza la temperatura del baño, transcurre un determinado período de tiempo, que varía fundamentalmente con el volumen introducido en los tubos; por tanto, este tiempo debe ser descontado pa

ra aproximarnos al tiempo real de tratamiento.

Para calcularlo, se dispuso de una serie de tubos con teniendo 2 ml. de M.E.M., que inicialmente permanecían en baño de hielo. En su interior se instaló una sonda conectada a un = registrador automático y calibrado de temperaturas, obteniéndose se los registros cada 5 segundos, una vez que los tubos se in- troducían en el baño caliente.

Los resultados fueron ajustados de acuerdo a la ley = de enfriamiento de Newton:

$$T - T_r = \Delta T_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad (1)$$

En la cual, T y T_r corresponden a los valores de tempe- ratura que poseen la suspensión celular a un tiempo t y el baño termostatzado, cuya temperatura es constante. ΔT_0 corresponde a la diferencia de las temperaturas del baño y la suspensión pa- ra un tiempo $t = 0$.

Otro factor que ha sido considerado para la corrección de los tiempos de tratamiento es el debido a la mortalidad producida durante el tránsito de la temperatura y a partir del momento en que ésta alcanza el valor de 42°C . Por debajo de este valor y a los tiempos de exposición a que están sometidas las = células, se considera que no existe pérdida de viabilidad.

Para numerosas líneas celulares ha sido definida una = relación entre tiempo y temperatura que producen el mismo efecto biológico. Esta relación obedece a una ecuación exponencial del tipo de $\Delta t = a \cdot e^{-b \cdot T}$, donde a y b son característicos de la línea celular.

Si el sistema es mantenido a la temperatura T_1 por un intervalo Δt_1 , es posible determinar el tiempo, Δt_2 , que a la temperatura T_2 produce un efecto biológico equivalente.

$$\frac{\Delta t_2}{\Delta t_1} = \frac{e^{-b \cdot T_2}}{e^{-b \cdot T_1}} \quad \rightarrow \quad \Delta t_2 = e^{b \cdot (T_1 - T_2)} \cdot \Delta t_1$$

Consideremos una temperatura T_r , temperatura a la que se encuentra el baño y a la cual serán sometidas las células que se encuentran en el interior de los tubos. La temperatura de las células, como hemos visto, varía desde 0-42°C hasta T_r , en función del tiempo, según la expresión (1). Por tanto:

$$t_r = \int_{t_0}^{t_p} e^{b \cdot (T_0 - T)} \cdot e^{-k \cdot t} dt \quad (2)$$

Según dicha expresión, se calcula el tiempo que a la temperatura de tratamiento produce la misma acción letal a la producida durante el tránsito de temperatura, desde 0-42°C hasta T_r y considerando la inexistencia de efecto letal por debajo de los 42°C, por lo que t_0 adquiere el valor del tiempo necesario para llegar a 42°C.

El sistema ha sido resuelto mediante integración numérica.

II. 5 . Método de minimización numérica.

El ajuste de los datos experimentales al modelo teórico-matemático de blancos se ha llevado a cabo a través de un programa en lenguaje FORTRAN V, utilizando el sistema de la UNIVAC 1100/81 del centro de cálculo de la Junta de Energía Nuclear, así como la librería de programas del grupo de Altas Energías.

En esencia, hemos utilizado un programa numérico de minimización, MINUIT, para insertar, como función a minimizar, un estimador χ^2 , que permite la determinación de los valores de los parámetros del modelo, que proporcionan una mayor compatibilidad entre las predicciones teóricas sobre el comportamiento del precursor G-M en CDA ante los diferentes tratamientos térmicos realizados y los resultados experimentales obtenidos.

La expresión general del estimador, cuyo mínimo nos ha proporcionado la mejor compatibilidad estadística teórico-experimental, es la siguiente:

$$\chi^2 = \sum \frac{(FS(teo) - FS(exp))^2}{ES(exp)^2}$$

en donde $FS(teo)$, es el valor de la fracción de supervivencia obtenida de acuerdo a la expresión; $FS(exp)$ es la fracción de supervivencia experimental y $ES(exp)$ es el error experimental.

El programa MINUIT trabaja de forma que en función de unos valores iniciales de los parámetros, proporcionados en

forma de datos típicos del programa, así como de las indetermi
naciones que el usuario estima tienen dichos valores respecto
del óptimo, los va variando en cantidades que corresponden a =
distancias razonables, estimadas del mínimo y estudiando al =
mismo tiempo el comportamiento de la función cuyo extremo se =
desea calcular. En cada uno de los pasos de la minimización, el
programa calcula el valor de la función X^2 utilizando los va=
lores de los parámetros propuestos por el programa. La minimi=
zación termina cuando la distancia al mínimo es inferior a una
• tolerancia, dato que fué de 0,1. Una descripción más detallada
de la metodología de cálculo desarrollada por el programa ==
MINUIT puede encontrarse en trabajos anteriores (Vidania, 1982;
James, 1976).

II. 6 . Representación gráfica de las curvas de supervivencia.

Con la finalidad de representar gráficamente las curvas de supervivencia teóricas deducidas del proceso de minimización que realiza el programa MINUIT, se recurrió a la utilización de la subrutina GRAFIC (Carretero, 1977). Dicha subrutina tiene por objeto facilitar la confección de gráficas en el "TRAZADOR CALCOMP" del centro de cálculo de la Junta de Energía Nuclear.

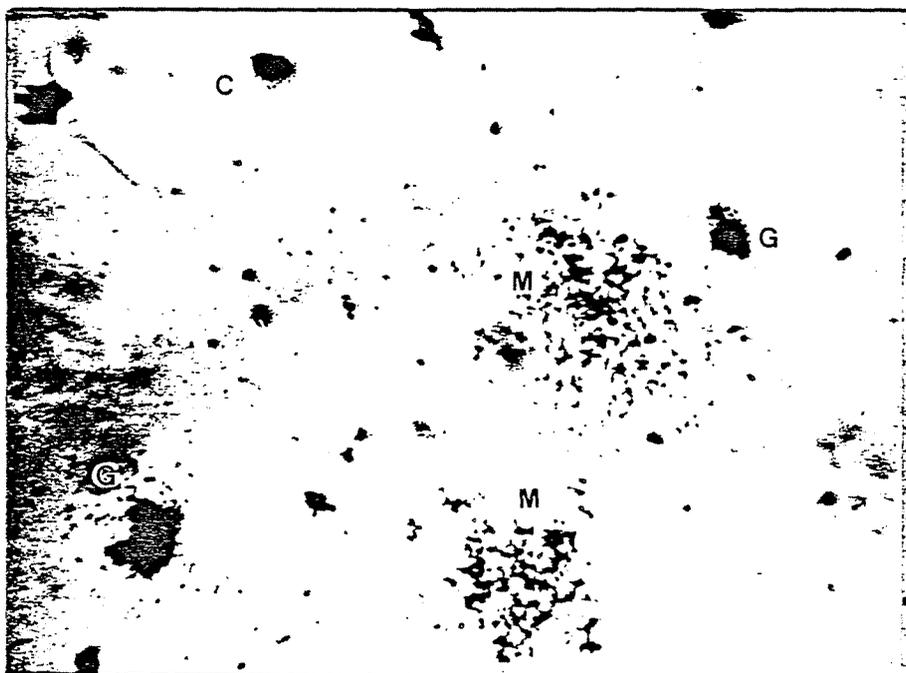
En esencia, el método consiste en comunicar al programa los valores de los parámetros calculados por MINUIT, correspondientes a la expresión que define el modelo teórico de blancos, para que mediante llamadas sucesivas a la subrutina GRAFIC, rotule los valores experimentales de F.S., E.S. y la curva teórica deducida del proceso de minimización.

CAPITULO III. RESULTADOS

III. 1. Estudio morfológico.

Una vez clasificadas las colonias en el binocular, según el grado de empaquetamiento (compactas, dispersas y mixtas), y el tamaño de sus células, se tomaron muestras de los distintos tipos y mediante su estudio a 1250 X, se comprobó que, independientemente del empaquetamiento, las colonias compuestas por células "grandes" correspondían a colonias de macrófagos y las compuestas por células "pequeñas" a colonias de granulocitos.

En la fotografía 1 puede observarse el aspecto que presentan las colonias a los cinco días de cultivo, en el momento de realizar los contajes. En ella se aprecian claramente las diferencias existentes entre las colonias granulocíticas (G) y la macrófagos (M). Igualmente se observa la presencia de algunos "clusters" (C).

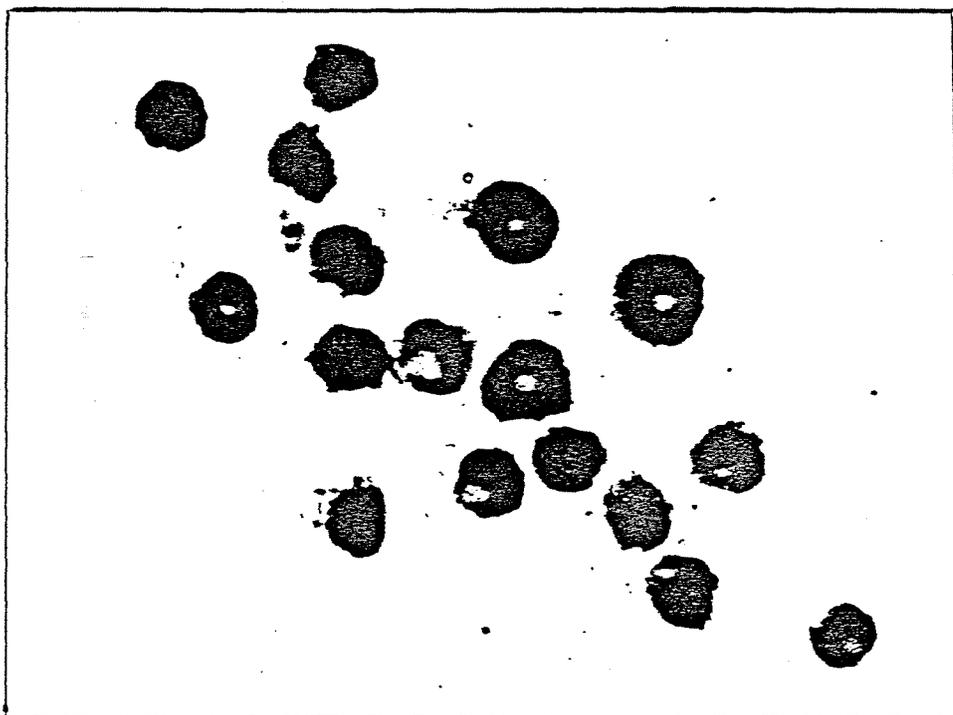


Fotografía 1. Aspecto de las colonias a 5 días de cultivo. 30 X.
Tinción de Giemsa.

La fotografía 2^a corresponde a las células de una colonia granulocítica (tipo G en la fotografía anterior), una vez extraída ésta de la cámara de difusión y a P.250 X.

En ella aparece un grupo de granulocitos con formas = todavía inmaduras, del tipo de los mieloblastos, hasta mielocitos o metamielocitos y escasas células más diferenciadas.

El tamaño, aunque variable con el grado de diferenciación, resulta próximo a las 12 micras.



Fotografía 2. Colonia granulocítica a cinco días de cultivo (1250 X) . Tinción de Giemsa.

La fotografía número 3 pertenece a la extensión de una colonia de macrófagos (M, en la fotografía 1). Estas colonias se caracterizan por poseer células de muy elevado tamaño, del orden de 40 micras. Dichas células, a su vez, presentan un núcleo excéntrico pequeño, siendo la relación núcleo/citoplasma muy inferior a 1. El citoplasma, especialmente en las formas más maduras, es muy vacuolado.



Fotografía 3. Fragmento de una colonia de macrófagos (200 X.), a 5 días de cultivo. Tinción de Giemsa.

A diferencia de otros cultivos celulares, en donde una célula posee capacidad para proliferar indefinidamente, en los cultivos de precursores hematopoyéticos se realiza, sucesivamente, una replicación acompañada de diferenciación, hasta un momento a partir del cual las células pierden su capacidad de replicarse y únicamente maduran. Por esta razón, un determinado precursor en el cultivo originará un número definido de células, que será siempre superior al que pueda originar otra célula más diferenciada. La sucesión terminará con aquellas células que ya no se dividan.

Entre un precursor y una célula no replicable, existe una variedad de ellas que poseen capacidad para formar agrupaciones celulares más o menos grandes.

Como criterio para determinar el número de células mínimo que deberá contener una agrupación para considerarla como la expresión de un precursor G-M en CDA, nos hemos basado en el que viene siendo habitual entre la bibliografía y que establece un número mínimo de 50 células por agrupación, que en este caso se define como "colonia". Aquéllas cuyo número no alcance el valor de 50 se denominan "clusters" y se considera que proceden de otras células más diferenciadas o de precursores lesionados.

Resulta de gran interés indicar que, así como las colonias de granulocitos han sido generalmente de muy fácil identificación, las colonias de macrófagos originaron más problemas, por producirse, en ocasiones, confusiones entre "clusters" próximos de estas células y las auténticas colonias de aspecto disperso.

III. 2. Evolución de las colonias en el cultivo.

Durante un período de ocho días, mediante cuatro experiencias distintas, se siguió la evolución de las colonias que aparecían en las cámaras de difusión.

A 1 día de cultivo, únicamente se apreciaba en las cámaras un fondo de células dispersas por la matriz de agar, sin que aparecieran colonias ni "clusters" que fueran superiores a 10 ó 15 células.

En el segundo día, se observó ya la presencia de importantes "clusters", pero cuyo número de células no alcanzaba el valor de 50, necesario para que fueran considerados como colonias.

A partir del tercer día, aparecen colonias de los dos tipos descritos y cuya evolución viene representada en la figura 2.

Como puede apreciarse, después del quinto día, el número de las colonias de granulocitos desciende lentamente, mientras que las colonias de macrófagos prosiguen aumentando durante los ocho días estudiados.

Debido a que en el día 5, el número de los dos tipos de colonias resultó ser similar y por obtenerse aquí el máximo número de las colonias de granulocitos, consideramos adecuado utilizar este período de cultivo para todas las experiencias posteriores.

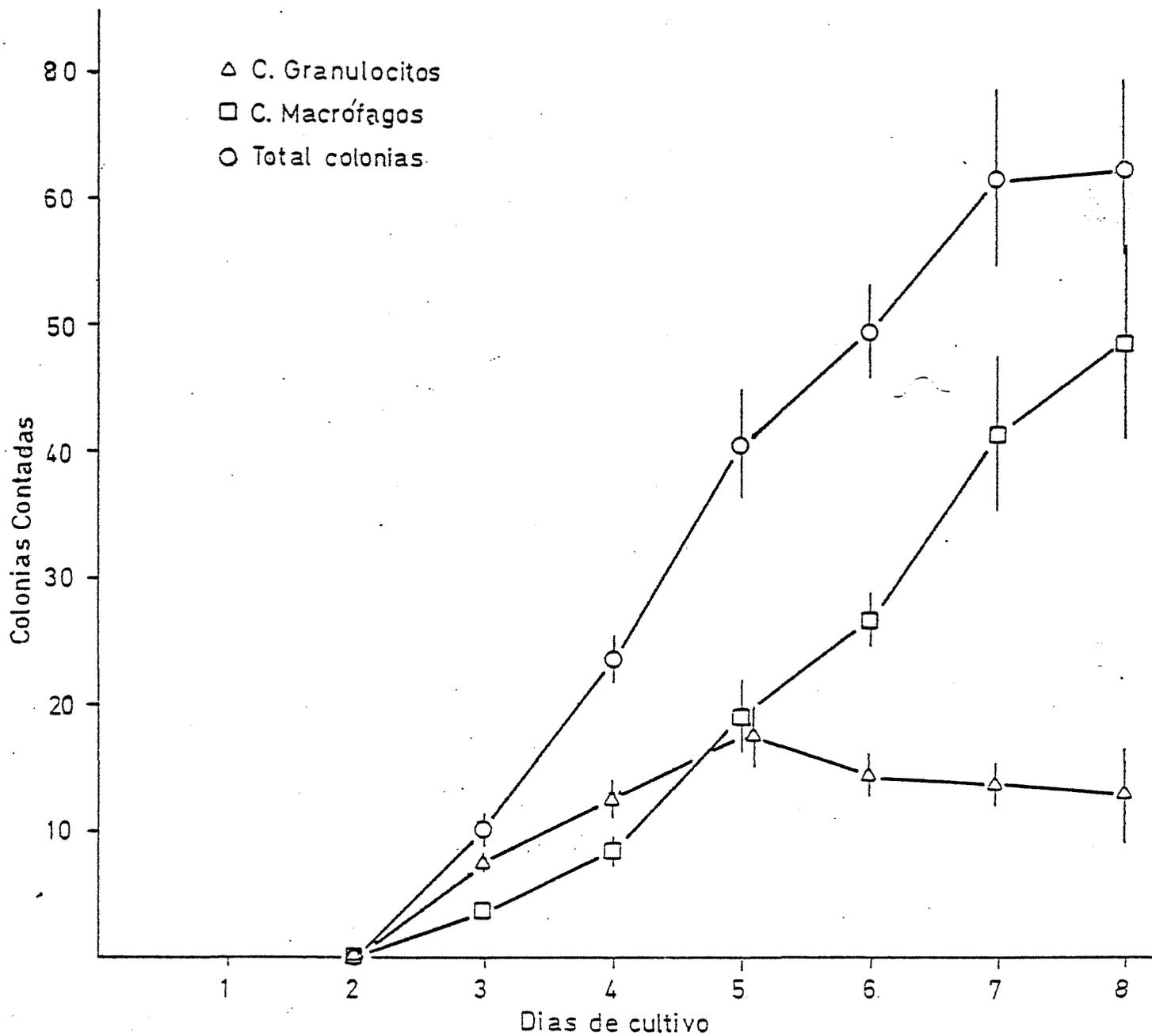


Figura 2. Representación del número de colonias que aparecen = a distintos días de cultivo, para una concentración de 50.000 células/cámara.

III. 3. Estudio de la correlación entre el número de células sembradas por cámara de difusión y el número de colonias contados a los cinco días de cultivo.

Con la finalidad de conocer si el número de colonias de granulocitos, de macrófagos y el total de ellas mantenía una relación lineal con el número de células sembradas en las cámaras de difusión, tras cinco días de cultivo, se introdujeron en éstas, concentraciones celulares comprendidas entre 10.000 y 65.000 células/cámara.

En la figura 3 se representan las rectas obtenidas mediante la minimización del X^2 .

Aunque la eficiencia de siembra varió parcialmente a lo largo de las distintas experiencias que se realizaron, se obtuvo aquí un valor total de 1 colonia (o un precursor G-M de CDA) por cada 2500 células de médula sembradas, estando las colonias de macrófagos y de granulocitos en razón de 1,3/1.

Puesto que a concentraciones superiores a las estudiadas es posible que se produzcan solapamientos entre las colonias, que modifiquen el resultado de los contajes, el número de células sembradas en las experiencias en donde se realizó algún tratamiento letal, se ajustó, según los casos, para obtener posteriormente un número de colonias comprendido en el intervalo que se muestra en la figura.

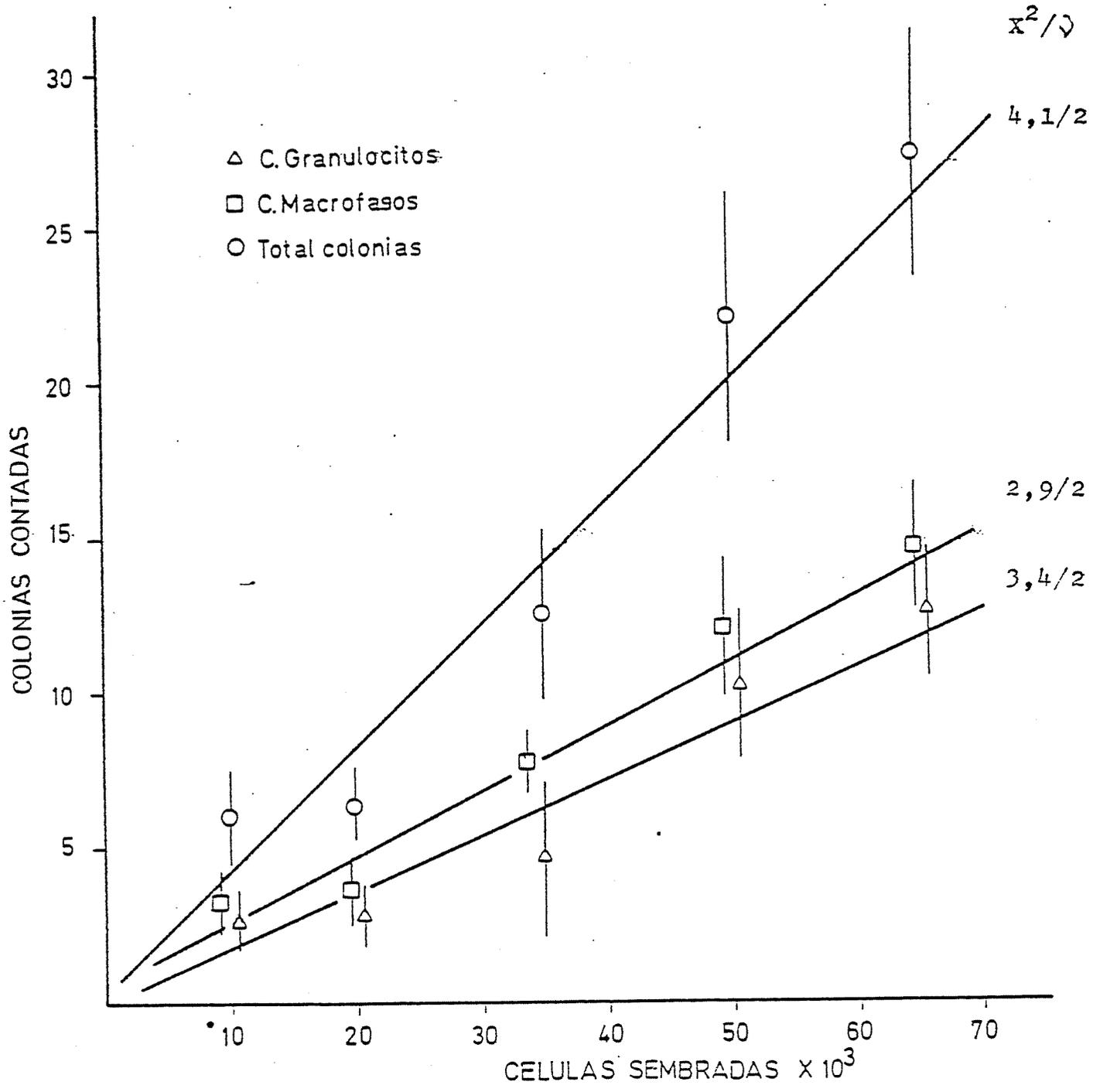


Figura 3. Representación del número de colonias contadas a los cinco días de cultivo, en función del número de células sembradas.

III. 4. Efecto de la hipertermia sobre la integridad reproductiva del precursor G-M de CDA.

III. 4. 1. Modelo teórico.

Para conocer el efecto de la hipertermia sobre la integridad reproductiva del precursor G-M, se determinaron los valores de las fracciones de supervivencia a las temperaturas de 42,5 , 43, 43,5 y 44°C, a distintos tiempos. Los cultivos se recogieron al quinto día de la implantación de las cámaras de difusión en los ratones.

En las figuras 6, 7 y 8, además de las curvas de supervivencia, se pueden observar los valores que toman las fracciones de supervivencia. Como puede apreciarse, mientras que a tiempos de tratamiento elevados la muerte es de tipo exponencial, a tiempos cortos la disminución de la supervivencia se muestra sensiblemente inferior y no exponencial.

Este hecho parecía indicar que la mortalidad celular producida por el tratamiento de hipertermia se ajustaba al modelo teórico multiblancos de un impacto y según el cual:

$$F.S. = 1 - (1 - e^{-K \cdot t})^n$$

donde

F.S. es la fracción de supervivencia

K es la pendiente de la región exponencial

t es el tiempo de tratamiento

n es el número de blancos.

Como podrá ir comprobándose más adelante, a través de los valores que ha tomado el X^2 en los distintos ajustes, puede decirse que la mortalidad de los precursores, descrita mediante

la reducción del número de colonias en función del tiempo de =
tratamiento hipertérmico, se realiza de acuerdo al modelo teórico
citado.

III. 4. 2. Parámetros cinéticos deducidos de los valores de supervivencia celular.- Ajuste previo.

Las fracciones de supervivencia del precursor G-M de CDA, se determinaron a través de la relación del número de colonias que aparecieron a cinco días de cultivo entre los lotes tratados y los lotes control, mantenidos en baño de hielo.

En este período, se considera que los precursores que hayan recibido algún tipo de daño subletal, pueden originar el mismo número de colonias que un precursor que no haya recibido daño. (Como más tarde se verá, la reparación del daño subletal se realiza en las primeras horas transcurridas después de la lesión). Por esta razón, y puesto que la diferencia entre el número de colonias de los lotes de control y los tratados sólo puede ser debida al daño letal producido en las células, se puede decir que las fracciones de supervivencia determinadas son una medida directa de la integridad reproductiva de las células.

Con la finalidad de calcular los parámetros de supervivencia correspondientes a los precursores "determinados", si llega a comprobarse que éstos quedan expresados en las colonias puras, los contajes se realizaron de acuerdo al total de las colonias formadas y también de las granulocíticas y las macrófagas. Posteriormente, tras calcular las fracciones de supervivencia, deducidas de estos contajes, se realizaron los ajustes de los valores experimentales al modelo teórico, mediante la minimización del X^2 .

Las fracciones de supervivencia que se deducen de los

contajes de las colonias figuran en la tabla 1.

La tabla 2 muestra los parámetros de supervivencia ca racterísticos del comportamiento ante la hipertermia del pre- cursor G-M de CDA, deducidos del ajuste de los datos experimentales, al modelo teórico.

De estos resultados se deduce ya la gran termosensibilidad de estas células, puesto que con 11 minutos a 42,5°C ó con 1,5 minutos a 44°C se reduce la supervivencia a un 37 %, en la región de muerte exponencial. Por otra parte, no se observan diferencias significativas entre los contajes de colonias de = granulocitos y macrófagos (hipotéticos precursores granulocíticos y macrófagos).

T ₂ (°C)	t (min)	t _F (min)	C. Granulocitos		C. Macrófagos		Total colonias	
			FS (%)	ES (%)	FS (%)	ES (%)	FS (%)	ES (%)
42,5	3	1	65,3	32,4	72,9	26,3	70,4	27,4
	9	7	91,0	27,3	81,6	25,8	84,7	24,5
	15	13	62,5	21,5	55,2	18,5	57,6	18,5
	21	19	29,1	9,8	14,8	4,8	19,6	5,6
	25	23	16,4	5,0	11,9	3,6	13,1	3,6
	29	27	15,6	4,5	11,0	3,1	13,4	3,6
	33	31	13,0	5,0	7,8	2,8	9,4	3,2
	37	35	7,3	3,5	4,6	2,3	5,4	2,5
43	3	1	74,5	25,2	80,9	20,2	77,0	21,7
	7	5	68,1	22,8	65,3	18,2	66,7	15,9
	11	9	57,2	18,0	41,1	12,2	51,5	13,4
	15	13	12,3	4,6	18,8	8,4	15,7	5,3
	17	15	15,3	4,2	27,4	6,5	21,0	4,3
	19	17	13,6	6,6	6,1	3,9	9,1	4,6
	21	19	8,6	2,9	16,4	3,8	12,2	3,0
	25	23	2,4	0,7	2,1	0,7	2,5	0,8
	29	27	1,6	0,8	3,4	2,1	2,4	1,4
43,5	6	4	61,8	22,3	71,1	18,3	66,9	16,9
	9	7	21,8	8,3	15,4	5,5	18,4	5,1
	12	10	10,9	2,8	6,7	1,7	8,1	1,4
	13	11	12,6	2,2	15,7	5,8	14,1	4,7
	15	13	6,5	2,7	4,3	1,8	5,5	1,9
	16	14	3,6	1,0	3,6	1,8	3,6	1,0

T° (°C)	t (min)	t _c (min)	C. Granulocitos		C. Macrófagos		Total colonias	
			FS (%)	ES (%)	FS (%)	ES (%)	FS (%)	ES (%)
44	4	2	84,8	23,9	59,0	23,4	65,6	25,0
	6	4	34,9	14,1	16,1	5,4	20,9	10,4
	7	5	17,0	8,7	5,9	2,2	11,5	4,8
	8	6	14,2	4,6	4,6	1,4	9,3	2,6
	9	7	5,6	2,0	1,0	0,5	2,7	0,9
	10	8	8,2	3,5	3,0	1,1	5,7	2,0

Tabla 1. Resultados experimentales de las fracciones de supervivencia para las temperaturas de 42,5 , 43, 43.5 y 44°C (F.S. = fracción de supervivencia; E.S. = error estandar); t = tiempo de tratamiento cronometrado; t_c = tiempo de tratamiento efectivo).

T _s (°C)	K (min ⁻¹)	T ₀ (min)	n (blancos)	x ² / _n
<u>C. Granulocitos</u>				
42,5	0,095	10,53	2,4	2,9 / 5
	+0,032	+3,99	+3,2	
	-0,028	-2,65	-1,3	
43	0,192	5,20	3,4	5,9 / 6
	+0,029	+0,82	+2,5	
	-0,026	-0,68	-1,4	
43,5	0,280	3,57	3,7	3,1 / 3
	+0,048	+0,75	+3,2	
	-0,049	-0,53	-1,8	
44	0,661	1,66	15,6	2,4 / 3
	+0,136	+0,42	+28,5	
	-0,124	-0,31	-13,4	

<u>C. Macrófagos</u>				
42,5	0,092	10,86	1,4	4,3 / 5
	+0,027	+3,64	+1,4	
	-0,023	-2,05	-0,6	
43	0,207	4,83	5,1	14,9 / 6
	+0,027	+0,69	+3,7	
	-0,026	-0,56	-2,2	
43,5	0,306	3,27	3,3	7,0 / 3
	+0,080	+1,16	+4,5	
	-0,078	-0,67	-2,0	
44	0,813	1,23	21,6	6,7 / 3
	+0,132	+0,24	+33,6	
	-0,126	-0,17	-17,1	

T _e (°C)	K (min ⁻¹)	T ₀ (min)	n (blancos)	χ ² /ν
<u>Total colonias</u>				
42,5	0,092	10,86	1,7	4,2 / 5
	+0,027 -0,023	+3,63 -2,40	+1,7 -0,8	
43	0,194	5,15	4,4	9,0 / 6
	+0,025 -0,023	+0,70 -0,58	+2,7 -1,6	
43,5	0,286	3,50	3,0	5,6 / 3
	+0,055 -0,054	+0,81 -0,57	+2,7 -1,4	
44	0,651	1,53	12,5	5,6 / 3
	+0,124 -0,126	+0,37 -0,27	+20,2 -10,1	

Tabla 2. Parámetros de supervivencia deducidos del ajuste de los datos experimentales al modelo multiblancos.

III. 4. 3. Cálculo del tiempo efectivo de exposición hipertérmica.

Debido a que la suspensión celular se mantiene en baño de hielo, tanto antes como después del tratamiento térmico, al introducirse los tubos que contienen la suspensión en el baño termostatzado (a la temperatura de tratamiento), se produce un aumento progresivo de su temperatura hasta que ésta se estabiliza.

La estimación del tiempo de subida de temperatura, como tiempo de tratamiento hipertérmico, puede ser la causa de errores en la determinación de la velocidad de muerte, K , y, principalmente, del número de blancos, n .

Con la finalidad de cuantificar el proceso, se realizaron determinaciones de las temperaturas que adquirirían los 2 ml. del medio contenido en los tubos, cada cinco segundos y desde que se introducían en el baño (Ver "Material y Métodos").

La tabla 3 muestra los valores de $T - T_r$ (diferencia de temperaturas entre el medio y el baño), a partir del tiempo en que se inicia el tratamiento y hasta que se estabiliza la temperatura.

La recta de calibración obtenida como ajuste de estos valores a la ecuación 1 : $T - T_r = \Delta T_o \cdot e^{-k \cdot t}$, aparece en la figura 4.

El valor obtenido para la velocidad de la subida de la temperatura es de $k = 2,3^\circ\text{C}/\text{min}$.

Según la ecuación anterior, y conocido k , es posible calcular el tiempo que deberá de transcurrir para que la

la suspensión que se encuentra en el interior de los tubos alcance la temperatura de 42°C, a las cuatro temperaturas de tratamiento. Recordamos que por debajo de esta temperatura se consideró inapreciable la mortalidad ocasionada para tiempos de exposición de pocos minutos.

<u>T baño (°C)</u>	<u>t₄₂ (min)</u>
42,5	1,9
43	1,6
43,5	1,4
44	1,3

=====

t	T-T _r						
	(42,0)	(42,5)	(43,0)	(43,5)	(44,0)	(44,5)	(45,0)
0	38,7	40,0	38,8	41,5	40,4	41,3	42,1
5	36,7	39,3	35,1	41,0	36,9	38,1	44,4
10	32,2	36,3	29,1	39,4	31,6	31,1	38,8
15	27,0	30,5	23,0	33,2	26,2	24,7	34,8
20	22,1	25,4	17,6	27,9	21,3	19,2	29,7
25	18,1	20,8	13,3	22,6	17,3	14,9	24,5
30	14,9	17,3	10,3	17,4	14,0	11,3	19,7
35	12,2	14,1	8,1	13,5	11,3	8,6	15,9
40	10,2	11,6	6,3	10,7	9,0	6,6	12,7
45	8,5	9,6	5,0	8,3	7,3	5,0	10,5
50	7,0	7,9	3,8	6,6	5,9	3,9	8,6
55	5,9	6,5	2,9	5,2	4,9	2,9	2,9
1'	4,8	5,4	2,3	4,1	4,0	2,3	5,8
5	3,9	4,4	1,8	3,4	3,3	1,8	4,8
10	3,3	3,6	1,4	2,6	2,7	1,4	3,9
15	2,8	3,0	1,1	2,1	2,4	1,1	3,2
20	2,3	2,5	0,9	1,7	2,0	0,9	2,8
25	1,9	2,2	0,7	1,4	1,7	0,7	2,3
30	1,6	1,9	0,6	0,9	1,4	0,5	1,9
35	1,3	1,6	0,5	0,8	1,2	0,5	1,6
40	1,1	1,3	0,4	0,7	1,0	0,4	1,3
45	0,9	1,1	0,3	0,5	0,8	0,3	1,1
50	0,7	0,9	0,2	0,5	0,7	0,2	1,0
55	0,6	0,8	0,2	0,4	0,6	0,2	0,8
2'	0,5	0,7	0,2	0,3	0,5	0,2	0,7

t	T-T _r (42,0)	T-T _r (42,5)	T-T _r (43,0)	T-T _r (43,5)	T-T _r (44,0)	T-T _r (44,5)	T-T _r (45,0)
5	0,4	0,6	0,2	0,3	0,3	0,1	0,6
10	0,4	0,5	0,1	0,2	0,3	0,1	0,5
15	0,3	0,4	0,1	0,2	0,2	0,1	0,4
20	0,3	0,4	0,1	0,1	0,2	0,1	0,4
25	0,2	0,3	0,1	0,1	0,3	0,1	0,3
30	0,2	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1	0,3
35	0,2	0,2	0,1	0,0	0,2	0,1	0,2
40	0,1	0,2	0,1	-	0,2	0,0	0,2
45	0,1	0,2	0,1	-	0,2	-	0,2
50	0,1	0,1	0,0	-	0,1	-	0,1
55	0,1	0,0	-	-	0,1	-	0,1
3'	0,1	-	-	-	0,1	-	0,1
5	0,0	-	-	-	0,0	-	0,1
10	-	-	-	-	-	-	0,1
15	-	-	-	-	-	-	0,1
20	-	-	-	-	-	-	0,0

Tabla 3. Evolución de la temperatura de los 2 ml de M.E.M. que se encuentran siendo sometidos a calentamiento. (T - T_r : diferencia de temperaturas entre el baño y el^r M.E.M.)

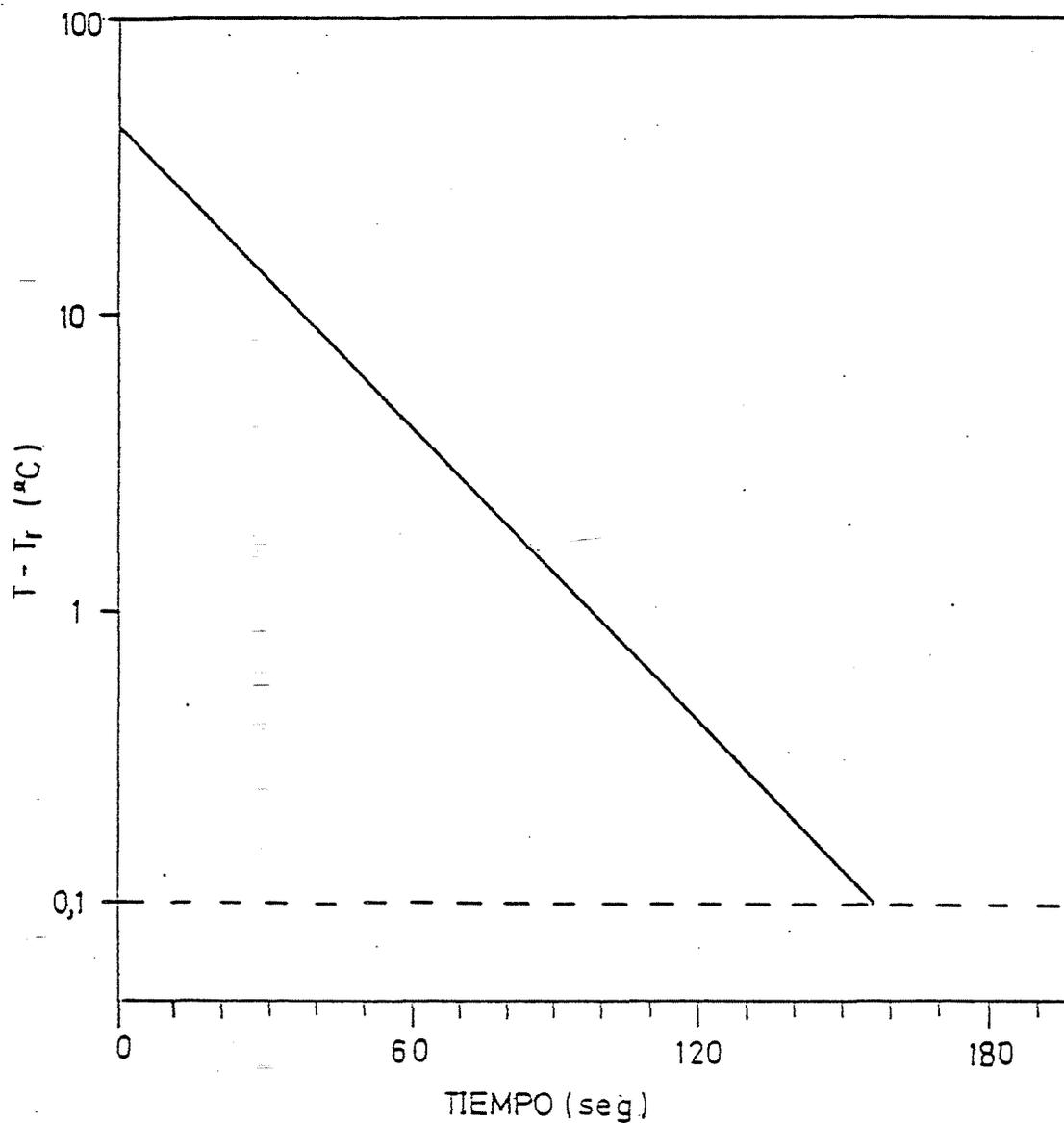


Figura 4. Representación de la variación de la temperatura del M.E.M. (2 ml), que se encuentra siendo sometido a una exposición hipertérmica.

Como efecto biológico producido por la hipertermia, = necesario para el cálculo de la relación entre la temperatura y el tiempo de tratamiento, se ha escogido la reducción de la supervivencia celular a un 10 %.

Para estimar el tiempo que, a las distintas temperaturas, reduce la supervivencia a este 10 %, nos servimos de las curvas de supervivencia ajustadas a la expresión $FS=1-(1-e^{-K.t})^n$ ya determinadas.

$$\text{Por tanto, en este caso } t = \frac{\ln(1-\sqrt[n]{1-0,1})}{K}.$$

En la tabla 4 figuran los valores de t_{10} , según el = contaje independiente de las colonias y de su total, así como el valor de la constante b.

<u>C. Granulocitos</u>			<u>C. Macrófagos</u>			<u>Total colonias</u>		
T ₀ C	t_{10} (min)	b	t_{10} (min)	b	t_{10} (min)	b		
42,5	32,88		28,43		30,28			
43	18,21	-0,8	18,81	±1,0	18,29	-0,9		
43,5	12,83		11,33		11,40			
44	8,32		6,50		7,36			

Tabla 4. Valores de tiempo necesarios para reducir la superviencia a un 10 % y de la constante "b" característica de la línea celular.

La figura 5 muestra la representación del efecto iso-biológico mencionado para las cuatro temperaturas estudiadas.

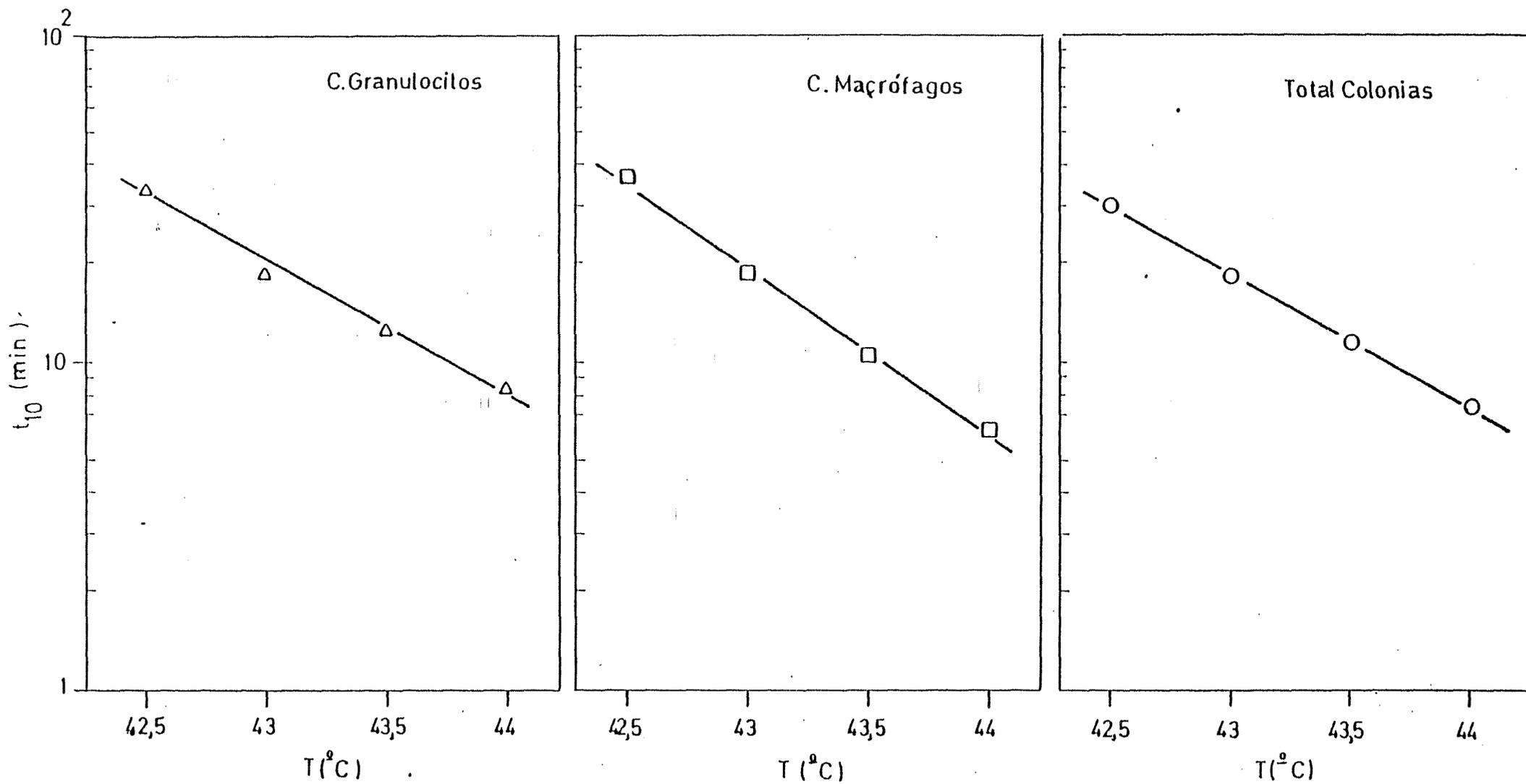


Figura 5 . Representación del efecto isobiológico, obtenido de acuerdo a los ajustes de las curvas de supervivencia.

Conocidos los valores de k y b , se calcularon los valores del tiempo efectivo mediante la expresión 2

$$t_r = \int_{t_o}^{t_f} e^{b \cdot \Delta T_c} \cdot e^{-k \cdot t} dt$$

En todos los casos, se tomó como tiempo control 10 minutos, tiempo para el cual se sabe que la temperatura se encuentra estabilizada.

La diferencia entre el tiempo control cronometrado (t_f) y el tiempo efectivo, de mortalidad equivalente a la producida a la temperatura T_r (t_r), indica el retardo que se produce al considerar el efecto de la subida de la temperatura.

En la tabla 5 se muestran los valores que toman todos los parámetros que intervienen en la corrección, así como los resultados obtenidos por ésta.

Puesto que al considerar el efecto que produce la subida de temperatura, se obtiene, en todos los casos, un retardo en el tiempo efectivo sobre el tiempo cronometrado, próximo a 2 minutos, descontamos este período de todas las medidas realizadas. Por tanto, las fracciones de supervivencia que inicialmente correspondían a un tiempo t de exposición, se corresponderán ahora con el tiempo: $t-2$ minutos (tabla 1).

ΔT_0 (°C)	t_0 (min)	t_f (min)	b (min/°C)	k (°C/min)	t_r (min)	$t_f - t_r$ (min)
<u>C. Granulocitos</u>						
38,5 (4-42,5)	1,9	10	0,85	2,28	7,91	2,09
39,0 (4-43,0)	1,6	"	"	"	8,08	1,92
39,5 (4-43,5)	1,4	"	"	"	8,14	1,86
40,0 (4-44,0)	1,3	"	"	"	8,17	1,83
<u>C. Macrófagos</u>						
38,5 (4-42,5)	1,9	"	1,03	"	7,88	2,12
39,0 (4-43,0)	1,6	"	"	"	8,03	1,97
39,5 (4-43,5)	1,4	"	"	"	8,08	1,92
40,0 (4-44,0)	1,3	"	"	"	8,10	1,90
<u>Total colonias</u>						
38,5 (4-42,5)	1,9	"	0,94	"	7,90	2,10
39,0 (4-43,0)	1,6	"	"	"	8,05	1,95
39,5 (4-43,5)	1,4	"	"	"	8,11	1,89
40,0 (4-44,0)	1,3	"	"	"	8,13	1,87

Tabla 5. Resultados obtenidos en la corrección de los tiempos de tratamiento por efecto de la subida de la temperatura.

ΔT_0 : diferencia de temperaturas a tiempo 0 entre la =

suspensión celular y el baño termostatzado; t_0 : tiempo a partir del cual se considera que la temperatura alcanzada por la suspensión puede producir algún efecto letal en el precursor; t_f : tiempo de referencia, en el cual se considera asegurada la estabilización de la temperatura; b : constante isobiológica; k : velocidad de subida de la temperatura de la suspensión celular; t_r : tiempo efectivo, resultante de considerar la subida de la temperatura; $t_f - t_r$: tiempo de retraso sobre el tiempo cronometrado.

III. 4. 4. Curvas de supervivencia celular obtenidas según los valores de tiempo efectivo de tratamiento.

Una vez corregidos los tiempos de tratamiento cronometrados y obtenidos los valores de tiempo de tratamiento efectivo, se realizó nuevamente el ajuste de los datos experimentales al modelo teórico.

En la tabla 6 y en las figuras 6, 7 y 8 aparecen los parámetros y curvas de supervivencia.

Tal como puede verse en la tabla, el número de blancos que resulta necesario inactivar, para que se produzca la pérdida de la integridad reproductiva de las células, es inferior, en todos los casos, a los que se indicaron anteriormente (tabla 2). Mientras que sin realizar la corrección, se obtenían valores comprendidos entre 1,4 y 21,6, ahora la máxima diferencia entre los blancos que se deben inactivar a cada una de las temperaturas es próxima a 2. Dada la similitud entre el número de los blancos determinados a las distintas temperaturas y puesto que el error de éstos es, en muchos casos, de su mismo orden = podemos considerar que existe un número de blancos en los precursores que resulta común a temperaturas comprendidas dentro del rango: 42,5-44°C.

Tal como puede apreciarse por los valores obtenidos = en la relación X^2/λ , la reducción de las colonias en función = del tiempo de tratamiento hipertérmico, se realiza según lo = describe el modelo y solamente en las colonias de macrófagos, a 43°C se obtiene un ajuste deficiente, que indica una subestimación en los errores correspondientes a las fracciones de super

vivencia obtenidos a esta temperatura. En el resto, y muy espe
cialmente para el caso de las colonias de granulocitos, los =
ajustes se consideran muy buenos.

T _a (°C)	K (min ⁻¹)	T _o (min)	n (blancos)	x ² /v
------------------------	---------------------------	-------------------------	----------------	-------------------

C. Granulocitos

42,5	0,097	10,31	2,1	3,0/5
	+0,031	+4,40	+2,3	
	-0,029	-2,50	-0,3	
43	0,192	5,21	2,3	6,1/6
	+0,029	+0,89	+1,5	
	-0,028	-0,68	-1,0	
43,5	0,274	3,65	2,0	3,1/3
	+0,049	+0,81	+1,4	
	-0,050	-0,55	-0,9	
44	0,580	1,72	4,1	2,4/3
	+0,144	+0,50	+5,3	
	-0,129	-0,34	-0,8	

C. Macrófagos

42,5	0,090	11,11	1,1	4,5/5
	+0,029	+4,27	+1,1	
	-0,025	-2,71	-0,5	
43	0,206	4,85	3,3	15,0/6
	+0,027	+0,70	+2,1	
	-0,026	-0,56	-1,3	
43,5	0,297	3,37	1,6	6,7/3
	+0,080	+1,19	+1,7	
	-0,078	-0,72	-0,9	
44	0,801	1,25	3,9	6,7/3
	+0,134	+0,24	+4,0	
	-0,129	-0,18	-2,0	

T° (°C)	K (min^{-1})	T_0 (min)	n (blancos)	χ^2/ν
<u>Total Colonias</u>				
42,5	0,092	10,87	1,4	4,3/5
	+0,028	+4,24	+1,3	
	-0,026	-2,54	-0,7	
43	0,193	5,18	2,9	9,3/6
	+0,025	+0,73	+1,6	
	-0,024	-0,59	-1,0	
43,5	0,279	3,58	1,5	5,4/3
	+0,055	+0,87	+1,1	
	-0,054	-0,59	-0,7	
44	0,633	1,58	3,0	5,5/3
	+0,129	+0,40	+3,4	
	-0,130	-0,27	-1,7	

Tabla 6. Parámetros de supervivencia deducidos del ajuste de los datos experimentales al modelo multiblancos, aplicando la corrección del tiempo efectivo de tratamiento.

Figura 6. Curvas de supervivencia obtenidas mediante el conteo de colonias granulocíticas.

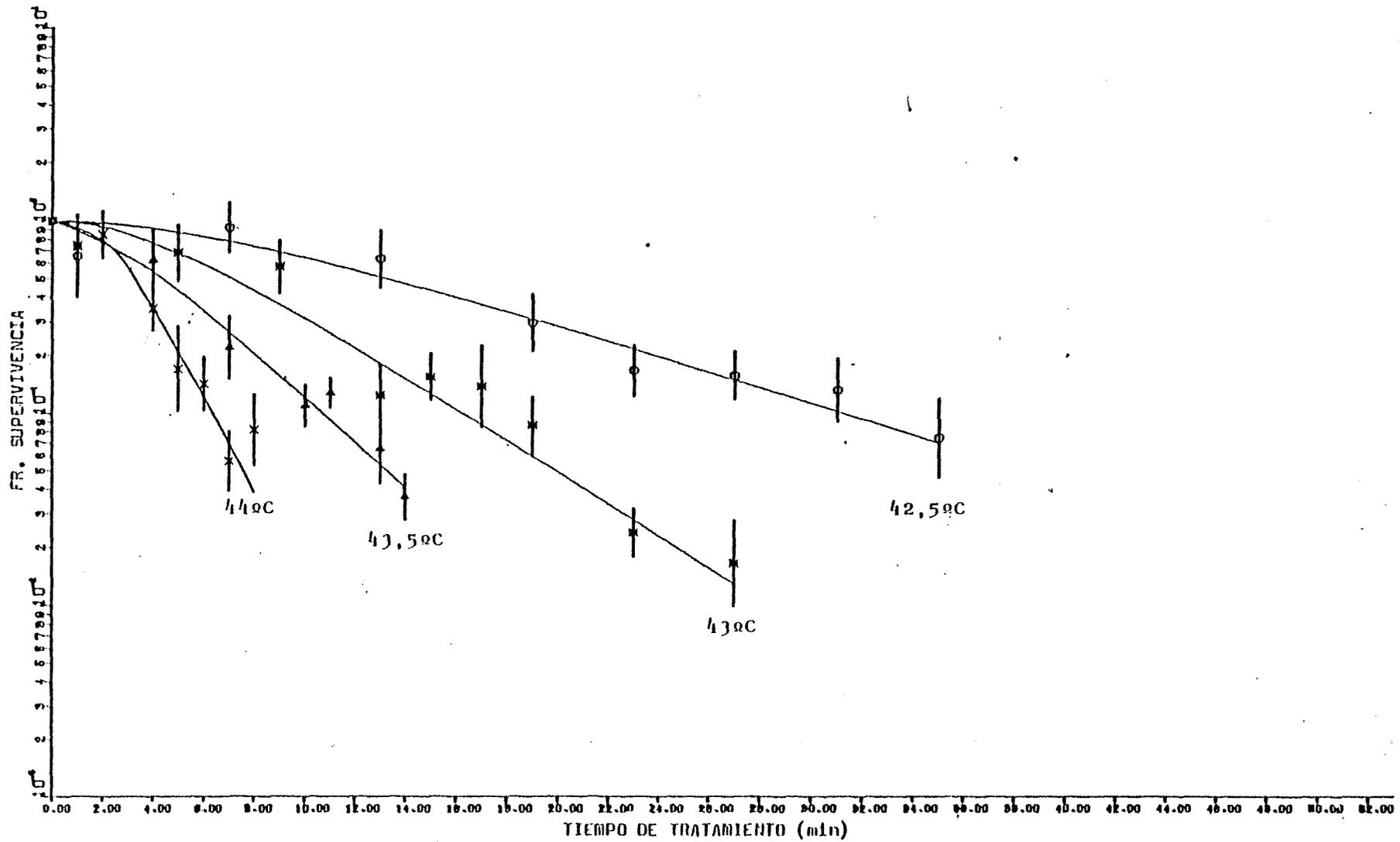


Figura 7. Curvas de supervivencia obtenidas mediante el conteo de colonias macrófagas.

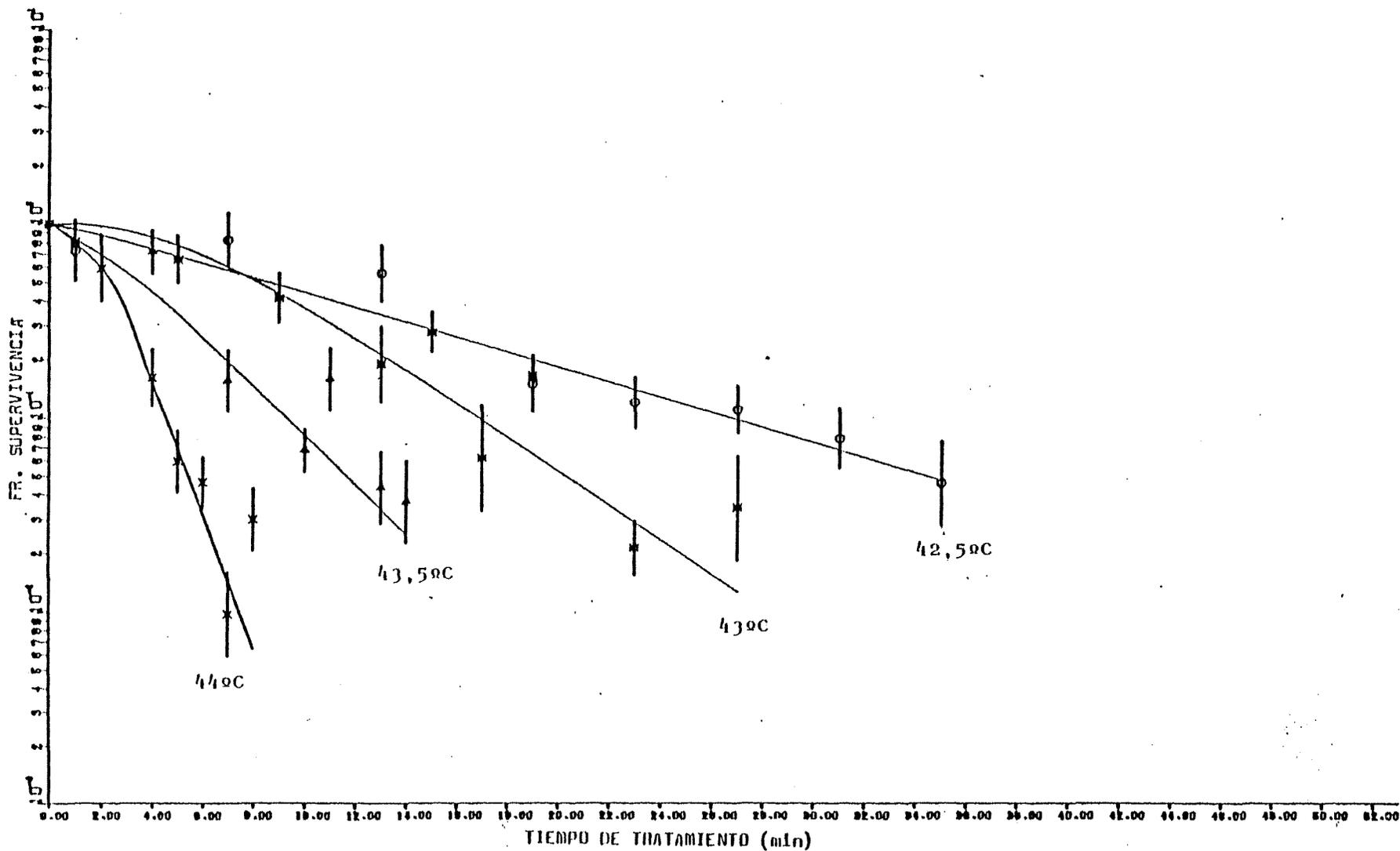
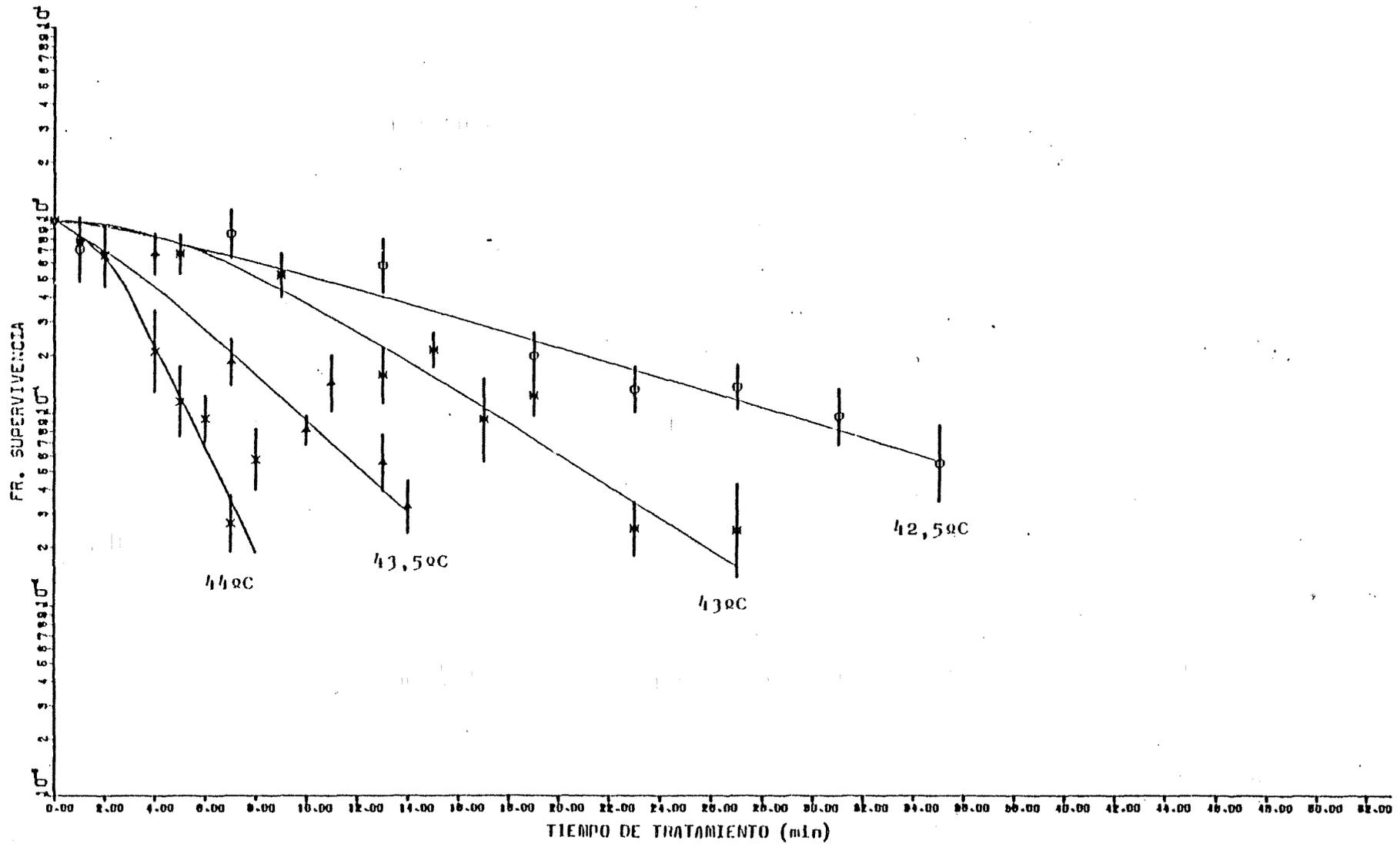


Figura B. Curvas de supervivencia obtenidas mediante el contaje del total de las colonias.



III. 4. 5. Representación de Arrhenius. Cálculo de la Energía de activación.

La relación entre las velocidades de muerte celular = (K) y la temperatura, se muestra en la figura 9, en la cual = el logaritmo de la velocidad se representa en función de la inversa de la temperatura absoluta.

La Energía de activación del proceso, μ , se calculó a partir de las velocidades obtenidas y mediante la expresión de Arrhenius para los efectos de la temperatura en procesos = biológicos:

$$K = K_0 \cdot e^{\mu/2 \cdot (1/T_0 - 1/T)}$$

Donde:

K = velocidad de reacción a la temperatura T (ab-soluta)

K_0 = velocidad a T_0

μ = Energía de activación

Puesto que en el tramo exponencial de las curvas de = supervivencia tan sólo queda un blanco sin inactivar, la velo-cidad de muerte celular se corresponderá con la de inactivación de este blanco y análogamente la Energía de activación calcula-da, con la de la reacción que conduce a la inactivación.

Como puede observarse, en lugar de representar las = constantes de velocidad, hacemos referencia a las velocidades de la reacción que conducen a la pérdida de la integridad reproduc-tiva de la célula, debido a que el factor que juegan las concen-traciones de los reactantes responsables de que ocurra el proce-so de inactivación de los blancos es desconocida. Al considerar a este factor como constante, bajo nuestras condiciones, la re-

lación entre la constante de velocidad y la velocidad (K), calculada según la cinética de muerte celular, dependerá únicamente de otras dos constantes: Constante de Boltzman y constante de Plank. Por ello, aunque en la expresión anterior la ordenada en el origen resulte indeterminada, la Energía de activación resultará independiente de que determinemos el valor de la velocidad o el de la constante de velocidad.

Los valores de la Energía de activación, deducidos de las velocidades de muerte térmica son:

			x^2/v
C. Granulocitos:	216	+ 46 Kcal/mol	0,9/1
	-		
C. Macrófagos	274	+ 38 "	1,6/1
	-		
Total colonias	234	+ 41 "	1,2/1
	-		

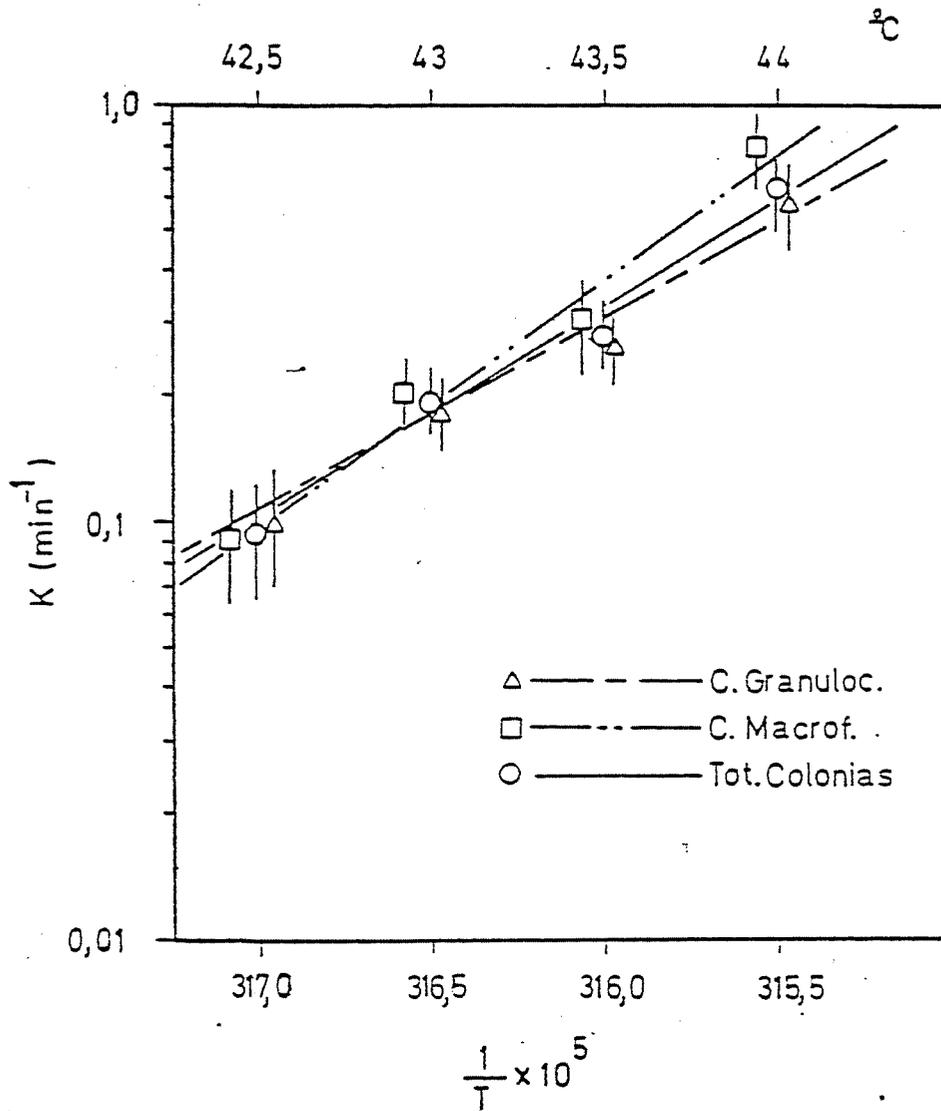


Figura 9. Representación de Arrhenius para la velocidad de muerte celular (K). (Cada trío de puntos, aunque desplazados respecto al eje de abscisas corresponden a la misma temperatura).

III. 4. 6. Curvas de supervivencia celular considerando la existencia de un número de blancos = común, en el intervalo 42,5 - 44°C

Con los resultados obtenidos hasta este apartado, se formularon dos hipótesis:

1. El número de blancos dañados en la célula (n) es el mismo para las cuatro temperaturas estudiadas.
2. Los valores de las velocidades de muerte térmica (K) cumplen una relación exponencial frente a las temperaturas absolutas a las que se realizaron los tratamientos (Arrhenius).

Supuestas ciertas las anteriores hipótesis, se sustituyó:

$$\left. \begin{aligned} FS &= 1 - (1 - e^{-K \cdot t})^n \\ K &= K_0 \cdot e^{\mu/2 \cdot (1/T_0 - 1/T)} \end{aligned} \right\} FS = 1 - \left[1 - e^{-K_0 \cdot e^{\mu/2 \cdot (1/T_0 - 1/T)}} \right]^n$$

Según esta expresión, todos los datos experimentales han de ajustarse conjuntamente, obteniendo, por tanto, el número de blancos que es necesario inactivar para que, a cualquiera de las temperaturas estudiadas, se pierda la integridad reproductiva de los precursores.

La tabla 7 muestra los parámetros obtenidos del nuevo ajuste.

Las figuras 10, 11 y 12 representan las curvas de supervivencia ajustadas según el nuevo modelo.

En el caso de las colonias de macrófagos, el ajuste parece verse afectado por la subestimación en los errores de las fracciones de supervivencia correspondientes a la temperatura =

de 43°C. Para granulocitos y el total de las colonias, el ajuste a este nuevo modelo se considera muy bueno.

T° ($^{\circ}\text{C}$)	K (min^{-1})	T_0 (min)	n (blancos)	μ (Kcal/mol)	χ^2/ν
<u>C. Granulocitos</u>					
42,5	0,117	8,55			
43,0	0,191	5,23	2,8	+0,9	197
43,5	0,314	3,19		-0,7	197
44,0	0,513	1,95			
<u>C. Macrófagos</u>					
42,5	0,104	9,57			
43,0	0,192	5,20	1,9	+0,7	243
43,5	0,353	2,83		-0,5	243
44,0	0,647	1,54			
<u>Total colonias</u>					
42,5	0,101	9,86			
43,0	0,178	5,62	1,9	+0,2	224
43,5	0,311	3,21		-0,5	224
44,0	0,543	1,84			

Tabla 7. Parámetros de supervivencia deducidos del ajuste conjunto de los resultados experimentales obtenidos entre 42,5-44,0°C

Figura 10. Curvas de supervivencia resultantes del ajuste conjunto de las fracciones de supervivencia obtenidas a las cuatro temperaturas. Colonias de granulocitos.

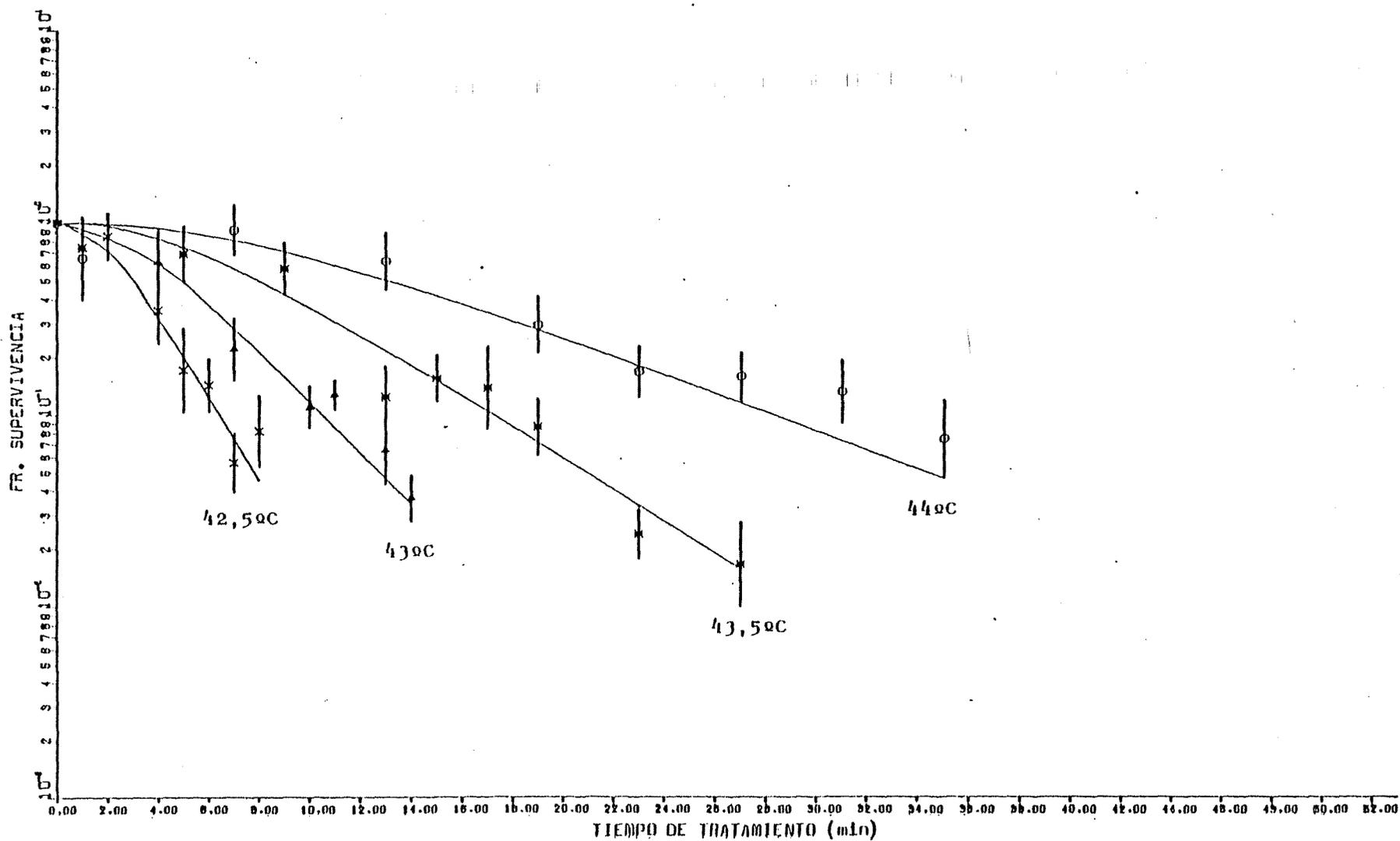


Figura 11. Curvas de supervivencia resultantes del ajuste conjunto de las fracciones de supervivencia obtenidas a las cuatro temperaturas. Colonias de macrófagos.

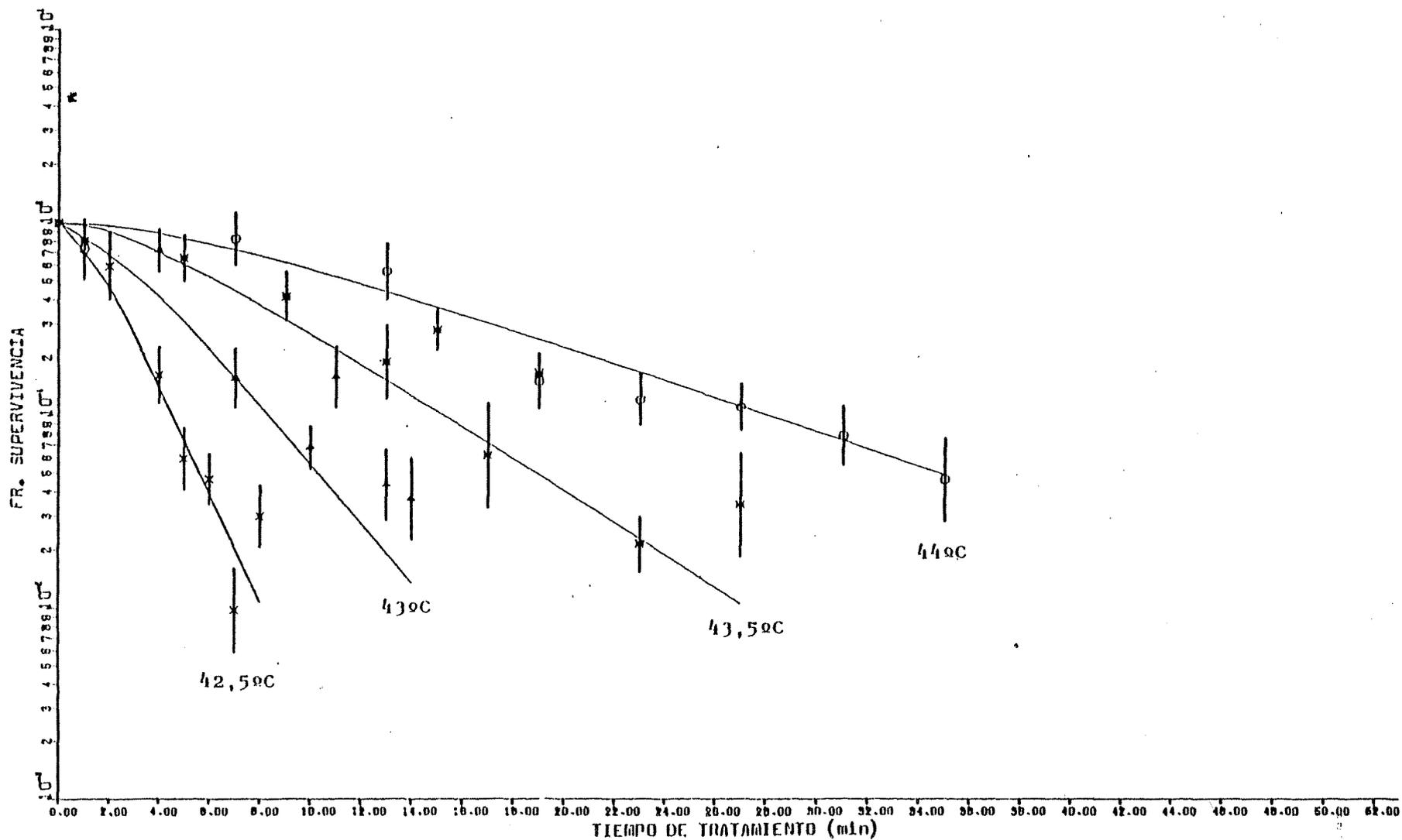
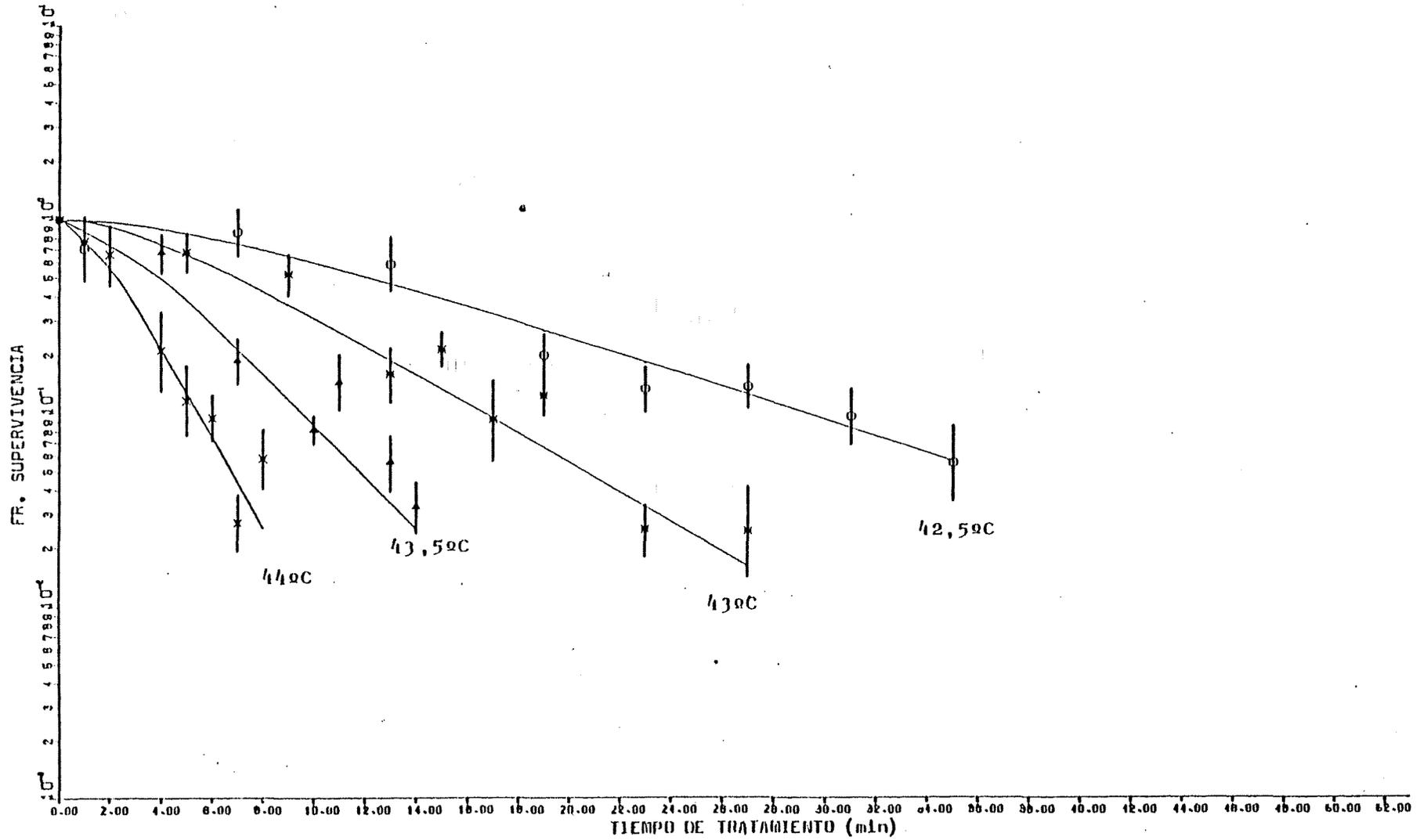


Figura 12. Curvas de supervivencia resultantes del ajuste conjunto de las fracciones de supervivencia obtenidas a las cuatro temperaturas. Total de colonias.



III. 4. 7. Cálculo de la Entalpía, Energía libre y Entropía de activación.

Obtenidos los valores de la Energía de activación del proceso que conduce a la pérdida de la integridad reproductiva de la célula, es posible determinar otros parámetros termodinámicos:

- Entalpía de activación:

Los valores de la Entalpía, obtenidos según la expresión $\Delta H^\ddagger = E_a - R.T$, son

Colonias Granulocitos	196,7 Kcal/mol
Colonias Macrófagos	242,5 "
Total Colonias	223,5 "

- Energía libre de activación:

Dados los valores de las velocidades de muerte, se calcularon los valores de ΔG^\ddagger según la expresión de Eyring:

$$K = (k.T/h).e^{-\Delta G^\ddagger/R.T}, \text{ donde}$$

K es la velocidad de muerte a la temperatura T

k es la constante de Boltzman

h es la constante de Plank

<u>Ta (°C)</u>	<u>ΔG^\ddagger(Kcal/mol)</u> <u>C.Granulocitos</u>	<u>ΔG^\ddagger(Kcal/mol)</u> <u>C.Macrófagos</u>	<u>ΔG^\ddagger(Kcal/mol)</u> <u>Total colonias</u>
42,5	17,3	17,5	17,4
43,0	17,1	17,2	17,1
43,5	16,8	18,7	16,8
44,0	16,5	16,4	16,5

- Entropía de activación:

Según la expresión $\Delta S^{\ddagger} = (\Delta H^{\ddagger} - \Delta G^{\ddagger})/T$, se obtiene el valor de la Entropía de activación, que resulta:

Colonias Granulocitos	568,3	U.e.
Colonias Macrófagos	713,3	U.e.
Total Colonias	652,2	U.e.

(A semejanza de lo que ocurre con el ΔH^{\ddagger} no se expresan los resultados en función de las cuatro temperaturas por resultar redundantes)

III. 4. 8. Reparación celular del daño subletal acumulado.

Con la finalidad de comprobar la capacidad de reparación del daño subletal termoinducido en el precursor G-M de CDA, hemos fraccionado en dos un tratamiento hipertérmico cuya mortalidad = se había determinado previamente.

Si efectivamente es posible la reparación del daño, la mortalidad producida por el tratamiento fraccionado será inferior a la que corresponde a una exposición única.

En el contexto de la teoría del blanco, se considera que las células pierden su integridad reproductiva cuando todos sus = blancos resultan inactivados. Si como consecuencia de la primera mitad de un tratamiento de hipertermia, la fracción de supervivencia celular corresponde a la región exponencial de la curva = de supervivencia ($n-1$ blanco dañado por célula "viva"), la inactivación de cada blanco en la segunda mitad, originará la pérdida de la viabilidad de una célula. Sin embargo, si entre ambas = fracciones se mantiene a las células en condiciones que permitan su reparación, cuando se inicie la segunda exposición, los blancos inactivados de las células "vivas" quedarán reparados y, por tanto, al existir ahora células con más de un blanco activo, será posible que parte del daño que reciban en la segunda mitad del = tratamiento sea de nuevo acumulado. Por esta razón, una forma de determinar experimentalmente la capacidad de reparación celular es aquella en la que se mide la supervivencia en función del = tiempo de reparación entre un tratamiento fraccionado.

El tratamiento hipertérmico que ha sido fraccionado co-

rresponde a una exposición de 17 minutos a la temperatura de 43°C. Como condiciones de reparación se ha mantenido a las células a = 24°C por un período comprendido entre 0 y 6 horas 30 minutos.

PROTOCOLO

17' (43°C) → 8'30" (43°C) + Reparación (24°C) + 8'30" (43°C)

18' (43°C) → 9'30" (43°C) + Reparación (24°C) + 9'30" (43°C)

En las figuras 13, 14 y 15 se pone de manifiesto el aumento de la supervivencia celular como consecuencia de la reparación del daño acumulado en el primer tratamiento (puntos negros). A partir de un período próximo a tres horas de reparación, la supervivencia parece estabilizarse, lo que indicaría que ya todos los blancos lesionados de las células viables se encuentran de nuevo activos.

Los puntos claros, considerados como control, muestran la supervivencia de los precursores tratados con exposición única y mantenidos posteriormente a 24°C.

Estos resultados ponen de manifiesto la capacidad de reparación del precursor común o de los posibles "determinados", lo que, por otra parte, también es prueba de la multiplicidad de sus blancos ante la hipertermia.

Tiempos que fueron cronometrados, como consecuencia del retardo de 1 minuto en el tiempo de tratamiento efectivo, debido a la subida de la temperatura de la suspensión desde 24 a 43°C.

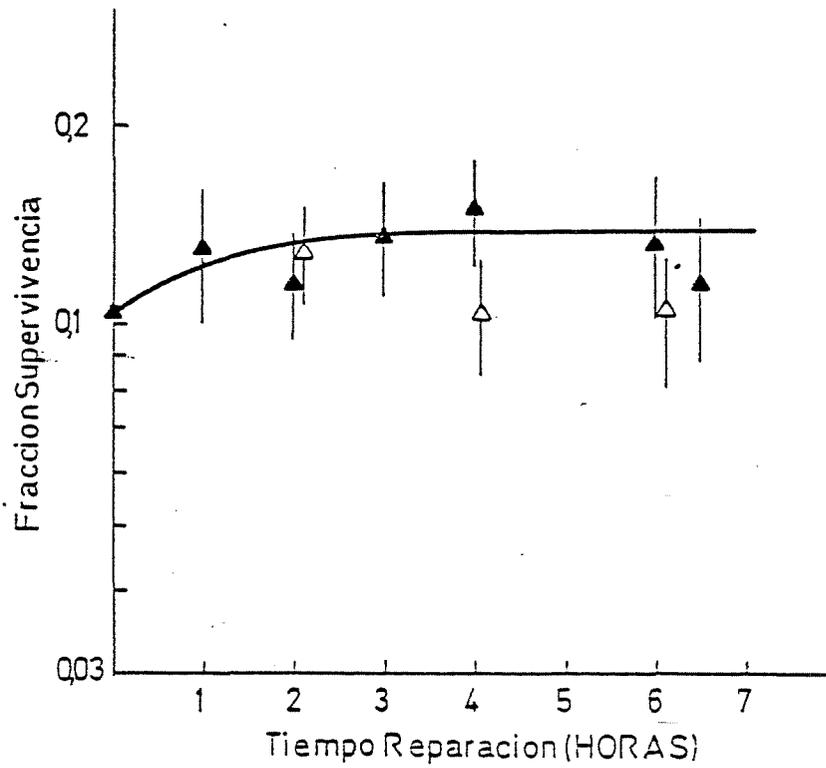


Figura 13. Representación de la reparación celular al fraccionar en dos un tratamiento de 17 minutos a 43°C. En abcisas, tiempo de reparación a 24°C entre los tratamientos fraccionados. Colonias granulocíticas.

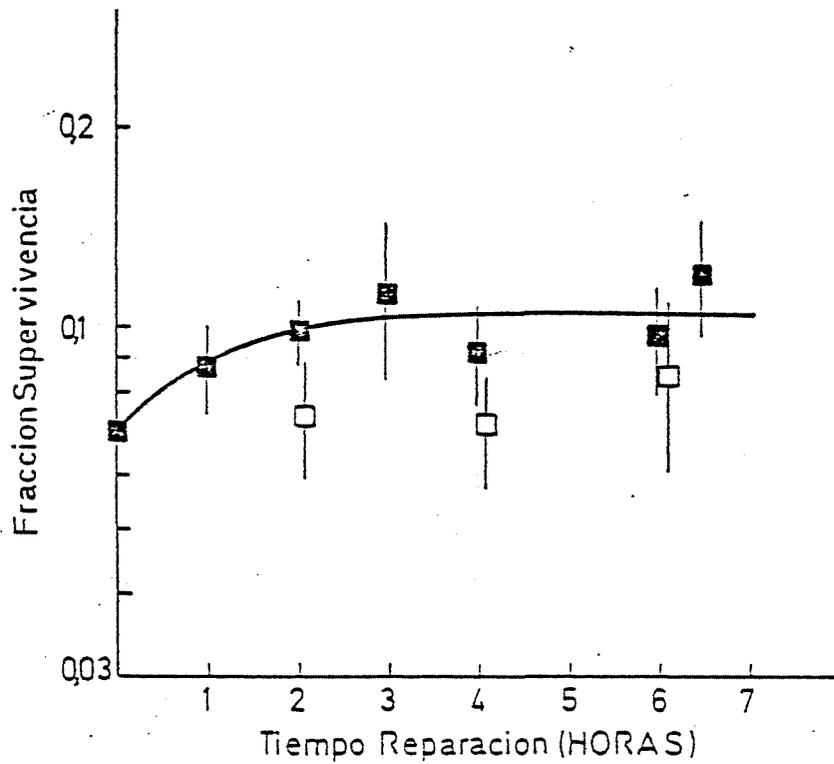


Figura 14. Representación de la reparación celular al fraccionar en dos, un tratamiento de 17 minutos a 43°C. = En abscisas, tiempo de reparación a 24°C entre los tratamientos fraccionados. Colonias de macrófagos.

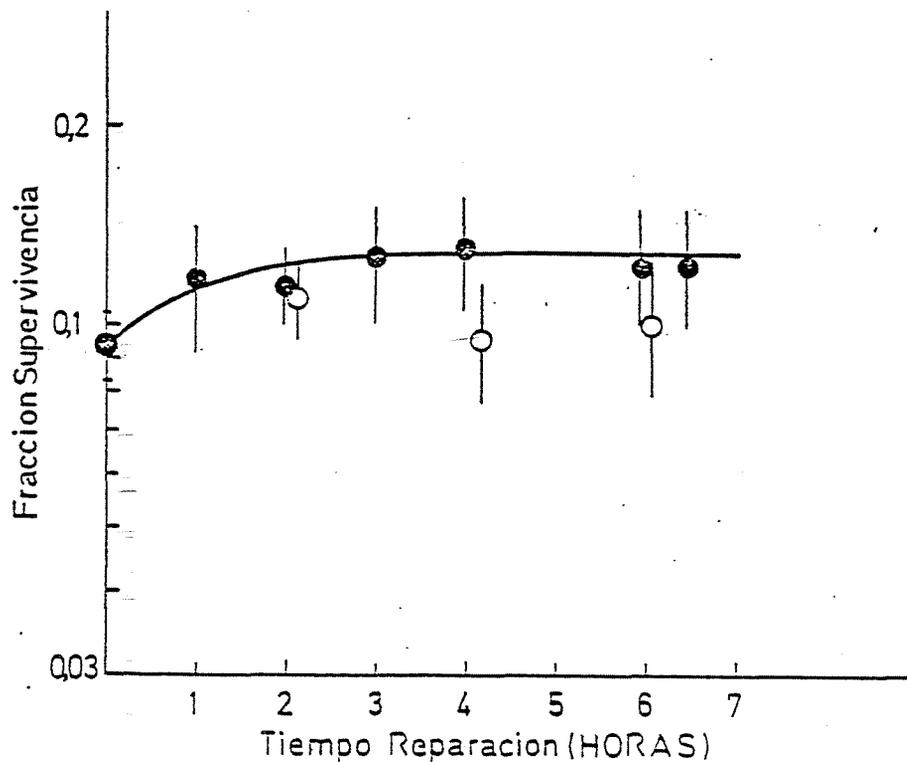


Figura 15. Representación de la reparación celular al fraccionar en dos un tratamiento de 17 minutos a 43°C. En abscisas, tiempo de reparación a 24°C entre los tratamientos fraccionados. Total de colonias.

CAPITULO IV. DISCUSION

IV. 1. Método de cultivo y clasificación de las colonias.

El método de cultivo que hemos elegido para el trabajo es una modificación del descrito por Gordon (1974).

Esencialmente, consiste en inyectar en el interior de unas cámaras que permiten el flujo de líquidos pero no de células, una suspensión preparada a partir de médula ósea de ratón, que incluye también una solución de agar.

La implantación intraperitoneal de las cámaras en los ratones hospedadores permite la multiplicación celular, y debido a la gelificación del agar aparecen, tras los distintos días de cultivo agrupaciones que contendrán un número mayor o menor de células dependiendo del estado de maduración de la que proliferare.

De los resultados extraídos de la bibliografía, deducimos que para considerar a una agrupación celular como la expresión de un precursor, deberá de contener, al menos, un número próximo a 50 células (y es denominada colonia; si no llega a este número, se llaman "clusters").

Por tanto, a través de la cuantificación de las colonias, es posible determinar los precursores con actividad proliferativa, que existen en las cámaras.

Una vez finalizado el período de cultivo, Gordon extrae las cámaras de los ratones hospedadores y retira el filtro Millipore que cubre uno de sus costados, para realizar en estas condiciones el conteo de las colonias. Nosotros, en lugar de retirar el filtro, despegamos la lámina de acetato que cubre el

otro costado, con lo que el gel de agar se mantiene intacto.

Por otra parte, en lugar de realizar los contajes directamente, teñimos las colonias, añadiendo unas gotas de Giemsa, adecuadamente filtrado, sobre las cámaras ya abiertas. Con ello, se consigue cuantificar e identificar más fácilmente las colonias formadas.

La clasificación de éstas, según el grado de empaquetamiento de sus células, tal como señala Metcalf (1971) ha sido sustituida. Este autor clasifica a las colonias en tres tipos: compactas, dispersas y mixtas. Las células componentes de las colonias compactas, indica, resultan en su mayoría granulocitos, las de las dispersas, macrófagos, y las células de las colonias mixtas (compactas en el centro y dispersas en la periferia) son una mezcla de ambas células.

En nuestros cultivos, una vez realizadas las tinciones, observamos dos tipos de colonias fácilmente distinguibles. En unas, las células presentaban un tamaño muy elevado (≈ 40 micras) y en las otras, a los 40 X con que se realizaron los contajes, las células parecían mucho más pequeñas (≈ 10 micras). Posteriormente, mediante el estudio de cada uno de los tipos de las colonias, a 1250 X, se observó que, independientemente del empaquetamiento que presentaran, las colonias compuestas por células pequeñas eran de tipo granulocítico, mientras que las que contenían células de tamaño superior eran de macrófagos.

A pesar de que nuestro criterio de clasificación no es el seguido por Metcalf, hemos de considerar que la mayoría de las colonias dispersas que observamos, estaban constituidas por

células grandes e igualmente las colonias compactas por células pequeñas, por lo que, en principio, el número de colonias granulocíticas y macrófagas contadas resultaría el mismo, independientemente del criterio de contaje.

Sin embargo, y puesto que han sido descritas variaciones en el empaquetamiento de las colonias (consecuencia de la = utilización de los distintos sueros constituyentes del medio de cultivo y de la naturaleza del sistema alimentador, en cultivo "in vitro"; Metcalf, 1967), pensamos que de no estudiar todo el contenido de la cámara en el microscopio con alta resolución, = mediante una técnica que permita la desecación del agar sin alterar las colonias, nuestro criterio de clasificación resulta = más seguro.

IV. 2. El precursor G-M de CDA.

Desde los primeros días de cultivo y a lo largo de las numerosas experiencias que hemos realizado, la mayoría de las colonias que aparecieron fueron puras; es decir, sólo de granulocitos o sólo de macrófagos, con una proporción aproximada de colonias mixtas de ambas células de tan sólo un 5 %. Ello puede indicar, a diferencia de lo que ocurre en otros cultivos, en donde el porcentaje de colonias mixtas es superior (Metcalf y Moore, 1971), que el precursor que prolifera en la cámara de difusión de agar ya está determinado, bien a originar la serie granulocítica o bien la macrófaga, pero no ambas a la vez. Aunque no dudamos del correcto procedimiento de dispersión de la médula ósea utilizado por otros autores, nos parece interesante destacar la importancia de este factor, puesto que en el caso de dispersiones insuficientes, la probabilidad de que un precursor "granulocítico" se encuentre junto a otro "macrófago" aumenta y por ello, tras el cultivo, aparecerán colonias puras mezcladas que se considerarán como mixtas y procedentes de un precursor común. En nuestro caso, la dispersión de las células fué siempre comprobada por observación directa de alícuotas de la suspensión en el microscopio, antes de procederse a la siembra.

A pesar de que, efectivamente, en nuestras cámaras, cada colonia pura puede ser la expresión de un precursor "determinado" (granulocito o macrófago), hemos de tener en cuenta también, la posibilidad de que el precursor granulocito-macrófago común se exprese en ocasiones mediante la línea granulocítica y en otras mediante la macrófaga, dependiendo de las necesidades

del organismo o de las condiciones particulares del cultivo.

En conclusión, podemos decir que el número tan reducido de colonias mixtas que aparecieron a lo largo de las experiencias, nos sugiere que sea cierta la hipótesis de que, tanto la línea granulocítica como la macrófaga, posean sus precursores = "determinados", aunque este hecho no puede ser considerado tampoco como prueba definitiva de que así suceda.

Por la importancia que representaría llegar a conocer el comportamiento de cada uno de los precursores "determinados", si llega a demostrarse que éstos quedan expresados en las colonias puras, el trabajo ha sido realizado en su totalidad, como se ha podido ver, atendiendo a las colonias de granulocitos y de macrófagos independientemente y, por otra parte, al total de = ellas.

Aunque no ponemos en duda la existencia de un precursor granulocítico-macrófago común, si con el tiempo queda probado que éste se expresa únicamente en forma de colonias mixtas, todos los datos que se presentan en el trabajo referentes a las colonias granulocíticas corresponderán al precursor granulocítico y de manera análoga con las colonias de macrófagos.

IV. 3. Evolución de las colonias en el tiempo.

La evolución del número de las colonias que se forman a los distintos días de cultivo aparece representada en la figura 2. Tal como puede apreciarse, mientras que las colonias = granulocíticas alcanzan su número máximo a los cinco días de cultivo, el número de las colonias de macrófagos a los ocho = días, todavía continúa aumentando.

Suponiendo que cada uno de estos tipos de colonias represente a su precursor "determinado", granulocítico o macrófago, todos los precursores granulocíticos que proliferen aparece rán expresados como colonias granulocíticas, mientras que proba blemente algunos precursores de macrófagos no lo hagan en un pe ríodo de ocho días. Así, pues, podemos hacer una estimación de los posibles "precursores granulocíticos" que existen en las células de médula sembradas y también del número mínimo de "precursores de macrófagos".

El hecho de que una colonia granulocítica pueda formar se y posteriormente se desintegre antes del quinto día de cultivo, o una de macrófagos antes del octavo, es considerado como muy improbable.

Según estos criterios, hemos obtenido en las experien cias realizadas, un promedio de 1 "precursor granulocítico" por cada 4.400 células de médula, mientras que para el "precursor de macrófagos", al menos 1 por cada 1000 células. Sin embargo, como la existencia de tales precursores no está demostrada y = puesto que muchas opiniones están en favor de considerar sólo la existencia de precursores G-M comunes, hemos realizado una

estimación de éstos, mediante el número máximo de todas las colonias que se forman. Así obtenemos que deberá existir un mínimo de 1 precursor G-M común por cada 800 células de médula = ósea.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por distintos autores, que utilizan diferentes técnicas de cultivo y animales de experimentación:

Steinberg (1976): El número máximo de colonias granulocíticas aparece al cuarto día de cultivo, obteniendo un rendimiento de 1 colonia (1 precursor granulocítico) por cada = 4.000 células de médula. Utiliza un sistema de cultivo en cámara de difusión con coágulo de fibrina.

Niskanen y Cline (1979) obtienen 1 CFU-C y 1 CFU-D-G por cada 1000 y 700 células de médula, respectivamente, siendo más rápida la proliferación en la cámara de difusión, donde se obtiene un máximo de colonias a los cuatro días.

Gordon (1974): Su técnica, utilizando cámara de difusión de agar, fué la utilizada para este trabajo. Obtiene 1 = precursor granulocítico-macrófago por cada 1000 células de médula, a los nueve días de cultivo.

Verma (1979): Cultivo "in vitro" de médula humana. = Cuantifica 1 CFU-C por cada 1.300 células a los siete días.

Bradley (1966): Obtiene para CFC a diez días de cultivo 1 colonia por cada 500 células de médula.

Goud (1975): Mediante cultivo en tubo Leighton obtiene 1 "precursor de macrófagos" por cada 900 células de médula.

Estos hechos parecen indicar que, independientemente =
de la técnica utilizada, las colonias de granulocitos aparecen =
como una primera onda que alcanza su número máximo entre los =
cuatro y siete días de cultivo, mientras que las colonias de ma =
crófagos evolucionan mucho más lentamente.

La estimación del número de precursores G-M comunes en =
médula, a través del número total de colonias granulocíticas, =
macrófagos y mixtas que se forman, es muy similar entre los tra =
bajos revisados y próximo en la mayoría de ellos al valor míni =
mo determinado por nosotros. Igualmente, hemos encontrado valo =
res semejantes en el número de los posibles precursores granulo =
cíticos y macrófagos "determinados", según las colonias puras =
que aparecen.

Pese a que la evolución de las colonias en el tiempo =
ha sido descrita por numerosos autores y en la mayoría de los =
casos el comportamiento ha resultado muy similar al que nosotros =
exponemos, todavía existe cierto confucionismo sobre la cinética =
del proceso. El motivo de ello deriva de los trabajos de Met =
calf, al observar la formación de pequeños "clusters" de macró =
fagos a partir de granulocitos inmaduros extraídos de las colo =
nias granulocíticas que se forman a los dos días de cultivo =
(Metcalf, 1971).

IV. 4. Estudio de la correlación entre el número de células sembradas y las colonias contadas a los cinco días de cultivo.

La representación de las células que fueron sembradas y las colonias contadas a cinco días de cultivo (Figura 3) indica la existencia de una correlación lineal entre ambas, dentro de los márgenes estudiados.

Un aumento en el número de colonias por cámara llega a originar solapamientos entre ellas, por lo que de realizarse el conteo en estas condiciones, los resultados quedarían subestimados.

Sin embargo, en las experiencias en que se sometió a las células a un tratamiento letal muy elevado, el número inicial de éstas se incrementó considerablemente y, a pesar de la pérdida de viabilidad, aquellas células más diferenciadas, por poseer una menor tasa y radiosensibilidad, se encontrarán en mayor número.

Algunos autores han estudiado el efecto que pueden ejercer los productos diferenciados sobre el desarrollo del cultivo en este tipo de poblaciones, encontrando en ellos cierta acción inhibitoria (Willemze, 1978; Sheldon, 1978). Aún siendo así, dicho efecto no alteraría los valores de nuestras velocidades de muerte celular, puesto que en todas estas experiencias se utilizó un lote control que contenía la misma concentración que el resto de los lotes y cuya supervivencia se había determinado previamente.

La existencia de una relación lineal entre las células

de médula sembradas en las cámaras de difusión y las colonias = que se forman, permite, en lo sucesivo, evaluar el efecto de la hipertermia sobre la viabilidad de los precursores, mediante la cuantificación de las colonias.

IV. 5. El modelo multiblanco de 1 impacto en el ajuste de las curvas de supervivencia.

Muy numerosos son los modelos publicados sobre la cinética de muerte o inactivación celular producida por distintos agentes. Gran parte de ellos, utilizan expresiones matemáticas, según las cuales el aspecto de las curvas de supervivencia resulta muy similar al deducido de la teoría de blancos, pero con alguna pequeña modificación que conlleva implicaciones teóricas muy distintas.

Dentro de la teoría del blanco, las principales diferencias surgen de considerar que la muerte de un organismo se produce como consecuencia de inactivar 1 solo blanco o varios de ellos, mediante 1 solo impacto o por varios impactos por blanco (Pizzarello, 1967; Okada, 1970). Sin embargo, otros muchos modelos han ido apareciendo (Payne y Garret, 1975; Elkind, 1977; Watson, 1978; Michaels y Hunt, 1978; Garret y Payne, 1978, Tommasino y col., 1979; Roti y Henle, 1980; Domon, 1980).

Tres, han sido los criterios por los cuales hemos escogido el modelo teórico-matemático de blancos: multiblanco de 1 impacto, para explicar el comportamiento de las células ante los tratamientos de hipertermia :

1. Los parámetros obtenidos directamente del ajuste de los datos experimentales al modelo teórico (T_0 , K y n) son de un considerable significado biológico.

2. Este modelo es el más ampliamente utilizado por distintos autores, por lo que nuestros datos van a resultar fácilmente comparables con los parámetros de supervivencia obteni

dos en distintas líneas celulares.

3. El intento por escoger entre uno y otro modelo, =
atendiendo a la calidad del ajuste de nuestros datos de supervi-
vencia a cada uno de ellos, no tendría objeto. Mientras que con
cinco-diez puntos para cada curva se obtienen unos valores de =
significación aceptados, este número de puntos se consideraría
ínfimo para tratar de dilucidar por este procedimiento el mode-
lo a elegir. Recordamos que las diferencias entre las formas de
las curvas de supervivencia que definen los distintos modelos =
son escasas y que tan solo se presentan en alguna parte de la =
curva.

En resumen, podemos decir que por su gran difusión, que
nos permite comparar nuestros resultados con los de otros auto-
res, y por su considerable significado biológico, el modelo mul-
tibilanco de l impacto resulta muy adecuado para este tipo de =
estudios.

IV. 6. Efecto de la hipertermia sobre la viabilidad = proliferativa del precursor G-M de CDA.

Antes de realizar la corrección de los tiempos de tratamiento, ya se pone de manifiesto la calidad de los ajustes de las fracciones de supervivencia experimentales, al modelo teórico de multiblancos (Tabla 2). En el caso de las colonias de macrófagos, y fundamentalmente a 43°C, el ajuste, sin embargo, = fué más deficiente, quizás debido a su aspecto disperso que los hace fácilmente confundibles con los "clusters", tal como indicábamos anteriormente. Pese a ello, considerando las curvas en su conjunto, los ajustes se pueden considerar muy buenos.

Como consecuencia de la subida gradual de la temperatura de la suspensión celular, al iniciarse la exposición hipertérmica, se observa en todos los casos un retraso en el tiempo efectivo de tratamiento, que resulta próximo a dos minutos. Este período fué descontado de los distintos tiempos cronometrados, lo que originó un descenso de los números de extrapolación de las curvas de supervivencia calculados (blancos), sin que se modificaran significativamente los valores de las velocidades = de muerte celular (Tablas 2 y 6).

Corregidos los tiempos de exposición hipertérmica, se obtienen así los parámetros característicos del precursor G-M o incluso de los posibles "determinados" para cada línea, si es = que realmente éstos son expresados en las colonias puras de granulocitos y de macrófagos.

Los valores del T_0 (Tiempo que reduce la supervivencia de la población a un 37 % en el tramo exponencial) obtenidos a

las cuatro temperaturas ponen de manifiesto la elevada termo - sensibilidad de las células. Tabla 6.

A pesar de que las fracciones de supervivencia correspondientes a las colonias de macrófagos fueron en la mayor parte de los casos inferiores a las obtenidas para las colonias de granulocitos, no puede decirse que en el conjunto de las cuatro temperaturas existan diferencias significativas en cuanto a los valores de T_0 o n entre ellas.

Este hecho nos impide formular una hipótesis sobre la existencia de los precursores "determinados", en base a su comportamiento frente a la hipertermia, puesto que si bien es cierto que de haberse encontrado diferencias significativas en su respuesta, se obtendría una prueba clara de que existe un precursor granulocítico y otro macrófago, no lo es menos esperar = que por su similitud en el estado proliferativo, el comporta - miento ante la hipertermia sea el mismo.

Cuando se consideran los parámetros que se deducen del conteo del total de las colonias, se les puede dar a éstos un doble significado. Por una parte, en el caso de que, efectiva - mente, cada tipo de colonias exprese a su precursor "determinado", se obtendría el valor medio de los que corresponden al pre cursor granulocítico y macrófago. De no ser así, los parámetros calculados, corresponderán al precursor G-M común.

Cuando nos referimos a nuestros resultados, al compa - rarlos con los obtenidos por otros autores, en distintas líneas celulares, lo hacemos siempre sobre los que se deducen del con - teo del total de colonias, por parecernos éstos los más repre -

sentativos, dado que el precursor G-M común tiene mayor reconocimiento que los "determinados", entre los autores.

La Tabla 8 muestra los valores del T_0 correspondientes a diversas líneas celulares a distintas temperaturas. En ella, podemos observar la gran termosensibilidad del precursor G-M de CDA, que resulta del orden de treinta y cinco veces más sensible que las células de riñón de cerdo, PK (Harris, 1967); veinte veces más que las células Hela (Roti Roti y col. , 1979; Gerner y Schneider, 1975); trece veces más que las células de pulmón de hamster chino, CHL (Johnson y Pavelec, 1972, Robinson y Wizemberg, 1974); cinco veces más que las células 9L (Ross-Riveros y Leith, 1979) y de tres a cinco veces más que las células de ovario de hamster chino, CHO (Westra y Dewey, 1971; Bauer y Henle, 1979).

Son de destacar las diferencias entre la termosensibilidad de una determinada línea, en estudios realizados por distintos autores, especialmente en el caso de CHL y CHO, en donde resultan del orden de un 100 %. En algunas ocasiones estas variaciones en el comportamiento celular han sido achacadas a posibles diferencias en el medio de cultivo y más probablemente en el suero utilizado (Raaphorst y col. , 1979).

En la Tabla también aparece una célula:CFU-CD, que si bien puede ser distinta al precursor G-M de CDA, es también precursor de granulocitos y demacrófagos y, por tanto, íntimamente relacionado con éste. Como puede apreciarse en la Tabla, los valores de termosensibilidad calculados por Elkon son muy inferiores a los que nosotros hemos determinado.

Entre las células cepa en las que se han realizado estudios de termosensibilidad, se encuentra la CFU-s de tipo pluripotente y que origina, por tanto los precursores GM de CDA.

Los estudios de su termosensibilidad, realizados en nuestro laboratorio, se han llevado a cabo mediante una técnica muy diferente a la nuestra, que consiste en la administración por vía endovenosa de una suspensión de médula, en ratón esterilizado mediante irradiación letal. Las CFU-s quedan expresadas por la formación de grandes colonias en el bazo de ratones. Tal como puede verse en la tabla, aunque algo menos termosensible, presenta un comportamiento semejante al del precursor G-M de CDA.

De manera análoga, la célula cepa de intestino es también muy termosensible, por lo que parece que en el contexto de los resultados correspondientes a los precursores celulares de tejidos, los obtenidos por Elkon resultan en cierto modo contradictorios.

Elkon (1981) utiliza en su trabajo el método de Benestad (1970), según el cual se irradia a los ratones hospedadores con 5 Gy para estimular la proliferación celular, recogiendo las cámaras de difusión a los siete días de cultivo. Este autor considera la proliferación relativa, semejante a la fracción de supervivencia determinada por nosotros, como la relación entre la proliferación celular en lotes tratados y la proliferación de las células mantenidas a 25°C consideradas como control. A nuestro juicio, la estimación de los efectos producidos en los precursores es siempre mejor en aquellas técnicas que cuantifican las colonias que se forman; puesto que se realiza una medi-

da más directa de la integridad reproductiva de éstos. Sin embargo, y a pesar de que efectivamente sus resultados no encajan con los obtenidos por otros autores, no podemos tampoco aclarar a qué pueden deberse tales diferencias.

Resulta de gran interés destacar que las únicas células más termosensibles que el precursor G-M de CDA, que hemos encontrado en la bibliografía, son las células L1210 procedentes de ratón leucémico. La posibilidad de que las células leucémicas presenten una termosensibilidad selectiva podría justificar el estudio de los efectos de la hipertermia en el precursor G-M de CDA en donadores a los que se les induzca una leucemia mielóide.

De todos los resultados expuestos, puede concluirse que, independientemente de que en nuestros cultivos proliferen precursores G-M comunes o "determinados", éstos poseen una gran termosensibilidad, que resulta incluso superior a la obtenida para CFU-s ($\approx 1,5$ veces) y la célula cepa intestinal ($\approx 2,5$ veces).

(°C) 41 41,5 42 42,5 43 43,5 44 44,5 45 45,5 46 46,5 47 47,5 48

PK

Harris, 67 - - - - - 54,6 - 20,4 - 10,3 - 6,7 - 4,2

HeLa

Roti-Roti, 79 - - - - - 33 - 13,8 - 6,7 - - 1,5

Gerner, 75 - - - - - 30 - - - - - - -

CHL

Robinson, 74 - - 163 98 30,4 - 14,5 - - - - -

Johnson, 72 526 - 310,6 - 75,4 - 28,8 - 12,3 - 6,8 - - -

CFU-CD

Elkon, 81 - 172 - 55 - 21 - 12 - 10 - - - - -

2L

Ross-Riveros, 79 - 323 48,8 16,8 - 9,3 - 5,6 - - - - -

CHO

Dauer, 79 - 199 86 - 19,6 - 8,1 - 4,6 - - 1,8 - 0,6

Westra, 71 - - - - - 6,9 4,9 3,7 2,3 1,8 1,2 0,8 - - -

(°C)	41	41,5	42	42,5	43	43,5	44	44,5	45	45,5	46	46,5	47	47,5	48
<u>C3Hf</u>															
Urano, 80	-	-	-	-	-	12,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>C. Ceba Intest.</u>															
Hume, 79	-	-	103	15,5	-	7	5,5	3,5	-	-	-	-	-	-	-
<u>CFU-g</u>															
Maganto, 80	-	-	32,3	-	8,9	-	2,8	-	1,6	-	-	-	-	-	-
<u>CFU-GM. CDA</u>															
Bueren, 82	-	-	-	10,8	5,2	3,6	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Y1210</u>															
Bowden, 81	-	-	-	-	3,5	-	-	-	-	1,5	-	-	-	-	-

Tabla 8. Valores del T_0 correspondientes a diversas líneas celulares a distintas temperaturas.

IV. 7. Hipótesis de un número común de blancos.

Una vez ajustadas las fracciones de supervivencia correspondientes a las temperaturas de 42,5 , 43, 43,5 y 44°C al modelo multiblancos, se obtuvieron los valores del número de blancos que deberían ser inactivados para producir la muerte celular a cada temperatura.

Según el conteo de las colonias granulocíticas, este número varía entre 2 y 4,1. El conteo de las colonias de macrófagos indica un valor entre 1,1 y 3,9, y resulta entre 1,4 y 3 blancos para conteos del total de colonias.

Puesto que en muchos casos, el error de cada uno de estos valores es de su mismo orden, las diferencias entre el número de blancos a las distintas temperaturas no se pueden considerar en ningún caso significativas, sino que, por el contrario, más bien parece que se encuentran tan próximos que expresan la existencia de un número de blancos a la hipertermia que es común dentro del intervalo: 42,5 a 44°C.

Supuesto esto, se realizó un ajuste de todos los datos experimentales de supervivencia obtenidos a las cuatro temperaturas. El ajuste nos permite conocer el número de blancos celulares responsables de la muerte por hipertermia en el intervalo estudiado, así como también el valor de la Energía de activación, suponiendo la existencia de un número de blancos común.

Los ajustes al nuevo modelo resultan muy buenos y puesto que el número de datos que intervienen en ellos es muy superior a los casos en los que se ajustaban las fracciones de su-

pervivencia de cada temperatura independientemente, aumenta = considerablemente la confianza de los parámetros. Únicamente, = en el caso de las colonias de macrófagos, los ajustes parecen = verse afectados por la subestimación de los errores de las frac = ciones de supervivencia observadas previamente a 43^o C.

El valor que toman los parámetros que definen el com = portamiento del precursor G-M de CDA ante la hipertermia median = te este método (Tabla 7) son en la mayor parte de los casos muy similares a los determinados mediante el ajuste independiente a cada temperatura (Tabla 6) y en el caso del número de blancos = (2,8 ;1,9 y 1,9 para colonias de granulocitos, de macrófagos y el total de las colonias, respectivamente) resulta ser, ade = más, próximo al valor medio de los anteriormente calculados.

De los resultados expuestos, puede deducirse que las = hipótesis propuestas, entre ellas la existencia de un número co = mún de blancos, entre 42,5 y 44^o C, tienen el suficiente apoyo como para que sean consideradas válidas.

IV. 8. Reparación del daño subletal acumulado.

La existencia del hombro inicial que poseen las curvas de supervivencia (Figuras 6-8 y 10-12) pone de manifiesto la capacidad celular para acumular cierta "cantidad" de daño suble - tal.

Mediante el fraccionamiento de un tratamiento hipertérmico, hemos comprobado que, a su vez, las células pueden reparar este daño. Ello se pone de manifiesto en las figuras 13, 14 y = 15, en donde se observa la disminución en el efecto letal oca - sionado por la hipertermia como consecuencia del fraccionamien - to en dos de una exposición hipertérmica, manteniendo entre am - bos, a las células a 24º C.

A medida que el número de blancos en las células es mayor, su capacidad de acumulación aumenta y, por tanto, la repa - ración del daño subletal también. En nuestro caso, resulta evi - dente el fenómeno, que parece ser máximo a partir de la segunda o tercera hora a 24º C.

También se expresa la existencia de una multiplicidad de blancos en el precursor, en correspondencia con los resultados obtenidos en el apartado anterior, puesto que si las células tu - vieran tan sólo 1 blanco, no sería posible su reparación.

El fenómeno descrito a 24º C es de suponer que se pro - ducirá en mejores condiciones a 37º C y, por tanto, en condiciones fisiológicas es posible que se produzca la reparación en menos tiempo. Por esta razón, pensamos que a cinco días de culti - vo, el número de células que puede originar un precursor suble -

talmente dañado o uno sin dañar es el mismo, tal como se indica
ba anteriormente.

IV. 9. Implicaciones termodinámicas deducidas de la cinética de muerte celular.

IV. 9. 1. Consideraciones previas.

Con la finalidad de interpretar el efecto de la temperatura en los procesos biológicos, Crozier y colaboradores, entre 1924 y 1926, llevaron a cabo una serie de estudios y presentaron una teoría que, entre otros, comprende los siguientes puntos: 1) Una serie catenaria de reacciones, cada una con un valor de energía de activación definido, característico de la temperatura, tiene lugar en todos los procesos biológicos; 2) El proceso global está determinado, dentro de un determinado rango de temperaturas, por la reacción limitante; 3) A partir de una temperatura crítica, el control puede ser llevado a cabo por una reacción limitante distinta, apareciendo un codo en las pendientes de las rectas de la representación de Arrhenius; y 4) Las correspondientes reacciones limitantes en los diferentes procesos biológicos (respiración, locomoción, ...) podrán ser determinados por la correspondencia de los valores de la Energía de activación (Johnson y col., 1964).

El examen de diversos procesos revela que, independientemente de su complejidad, prácticamente siempre existe un rango de temperaturas en el cual la relación entre la temperatura y la actividad obedecen a la ecuación de Arrhenius.

Al igual que ocurría con la velocidad de los latidos del corazón, otras funciones muy diversas, tales como la velocidad de deslizamiento de los insectos o incluso otras tan complejas como el funcionamiento de cerebro humano han encontrado una

relación con la temperatura en las coordenadas de Arrhenius.

La disminución de la supervivencia celular como consecuencia de una exposición hipertérmica, se observó en distintas líneas celulares que también mantenía una relación exponencial frente al inverso de la temperatura absoluta de tratamiento y = han sido muy numerosos los trabajos que se han efectuado sobre estudios termodinámicos de este tipo, en muchos casos dirigidos hacia la identificación del blanco celular a la hipertermia (Harris, 1967; Westra y Dewey, 1971; Johnson y Pavelec, 1972; Johnson, 1974; Gerweck y col., 1975; Harisiadis y col., 1975; Gerner y Schneider, 1975, Dewey y col., 1977; Laundry y Marceau, 1978; Ross-Rivero y Leith, 1979; Bauer y Henle, 1979; Henle y = Dethlefsen, 1980; Elkon y McGrath, 1981).

IV. 9. 2. Estudio termodinámico en la teoría del blanco

Tal como se describió en la introducción, a tiempos = cortos de tratamiento, existen células que poseen todos los = blancos dañados, células con algún blanco sin dañar y otros dañados y también células que tienen todos sus blancos intactos. A medida que aumenta el tiempo de tratamiento, se va incrementando el número de células con los blancos dañados, hasta un momento a partir del cual se observa que la curva de supervivencia = es ya exponencial. Esto indica que las células se comportan a = estos tiempos como organismos monoblanco, en donde cada impacto en un blanco origina la muerte de una célula. Por tanto, y = siempre a tiempos en los cuales la mortalidad mantiene una relación exponencial con el tiempo de tratamiento, la cinética de

inactivación de los blancos se corresponderá con la de la pérdida de la integridad reproductiva de las células.

Esta es la razón por la que los resultados obtenidos en procesos de inactivación térmica en enzimas, ácidos nucleicos, etc. (candidatos a blancos celulares por hipertermia) pueden compararse con los obtenidos del estudio de la mortalidad celular.

En la figura 9, se representa el logaritmo de las velocidades de muerte frente a la inversa de la temperatura absoluta de tratamiento (Representación de Arrhenius). Queda clara la existencia de un tramo recto "único", que indica que a estas temperaturas no existe ningún cambio de blancos.

Mediante la expresión de Arrhenius se puede deducir el valor de la Energía de activación característico del proceso y que se corresponderá con el de la inactivación de los blancos.

A su vez, estos valores resultan similares a los obtenidos en el ajuste conjunto de todas las fracciones de supervivencia al nuevo modelo propuesto (Tabla 7).

IV. 9. 3. Estudio comparado de los parámetros termodinámicos obtenidos según la cinética celular con los que se deducen de la inactivación de las moléculas "in vitro".

El valor de la Entropía de activación correspondiente a la reacción que conduce a la inactivación del blanco y según la cinética de muerte celular, ha sido 652 u.e. Este ΔS^\ddagger sólo puede ser explicado como consecuencia de variaciones muy im-

den: 19 Kcal/mol en la pérdida de la infectividad del ARN del virus del mosaico del tabaco por calor (Ginoza, 1958), por lo que según estos criterios es también descartado como blanco.

Los resultados anteriores pueden indicar que la muerte celular por hipertermia se produce como consecuencia de la desnaturalización de una proteína, ya en la formación de su estado activado.

Johnson (1974) considera que el ΔH^* puede ser interpretado como la suma de las energías de los enlaces rotos en el proceso de la formación del estado activado y que, por tanto, dados los valores de ΔH^* y el rango de las energías de distintos enlaces, es posible hacer una estimación de las roturas producidas en el blanco, al pasar al estado activado. Mediante la cinética de muerte, este autor obtuvo un $\Delta H^* = 180$ Kcal/mol, que podría representar la rotura de unos treinta-cuarenta enlaces de puente de hidrógeno o bien incluso de algún enlace covalente. Puesto que este autor no observó capacidad en las células para acumular daño subletal, hipotetizó que la lesión sólo podría producirse en una estructura de tanta importancia como el ADN.

Aunque alguno de sus postulados es posible que no encaje en el contexto de los parámetros termodinámicos deducidos del estudio de las moléculas "in vitro" (ΔS^* no corresponde con el obtenido por alteraciones termoinducidas en el ADN) su hipótesis sí puede ser utilizada para estimar el tipo de las roturas que se producen en el blanco, así como también para considerar la importancia que supone la capacidad de acumulación del daño subletal termoinducido en las células.

portantes de la estructura del blanco, en el proceso de formación del estado activado, por lo que del estado de alta organización que poseía la molécula, se pasa a obtener una distribución con múltiples conformaciones.

En la Tabla 9, pueden observarse los valores de ΔS^* para la desnaturación por calor de algunas proteínas. Si los comparamos con los ΔS^* obtenidos en procesos de liberación de bases del ADN por calor, se aprecia una gran diferencia, puesto que en este caso los valores de ΔS^* varían entre 3 y 8 u.e. (Greer y Zamenhof, 1969).

Estudios de este tipo han sido realizados con la finalidad de comprobar si a semejanza de lo que ocurre con las radiaciones ionizantes, el ADN es también el blanco para la hipertermia. Los resultados indican que la pérdida de viabilidad de las células por calor se deberá a alteraciones producidas en los blancos, que no se corresponden con la lesión termoinducida en el ADN.

Por otra parte, la Entalpía de activación, deducida de la muerte celular, fué de 223 Kcal/mol. Este valor, aunque algo superior, se asemeja nuevamente al de la desnaturación de algunas proteínas (Tabla 13) y resulta muy superior al ΔH^* obtenido en procesos de depurinización por calor del ADN: 28-34 Kcal/mol (Ginoza y Zimm, 1961; Greer y Greer y Zamenhof, 1962), en procesos de escisión de cadenas de ADN por calor: 25 Kcal/mol (Eigner y col., 1961) o en la pérdida de la actividad transformante de ADN del B. Subtillis: 28 Kcal/mol (Lindahl y Nyberg, 1972). En lo que respecta al ARN, el ΔH^* resulta del mismo or-

Substance	t (°C)	k^* (sec ⁻¹)	ΔH^\ddagger (cal)	ΔS^\ddagger (cal)	ΔF^\ddagger (cal)	$T\Delta S^\ddagger$	pH
Insulin	80.0	1.0×10^{-4}	35,600	23.8	27,200	8,400	1.5
Pepsin	25.0	5.47×10^{-4}	55,600	113.3	21,900	33,750	6.44
Leucosin	55.0	1.2×10^{-4}	84,300	185.0	23,620	-60,680	6.1
Egg albumin	65.0	2.54×10^{-4}	132,100	315.7	25,400	106,700	5.0
Hemoglobin	60.5	4.3×10^{-4}	75,600	152.7	24,700	50,900	5.7
Trypsin	50.0	2.83×10^{-4}	40,160	44.7	25,700	14,440	6.5
Enterokinase	50.0	7.37×10^{-4}	42,160	52.8	25,100	17,050	
Trypsin kinase	50.0	3.17×10^{-4}	44,260	57.6	25,700	18,600	
Proteinase (pancreatic)	50.0	1.27×10^{-4}	37,860	40.6	24,750	13,100	
Lipase (pancreatic)	50.0	1.18×10^{-4}	45,360	68.2	23,330	22,030	
Hemolysin (goat)	50.0	2.09×10^{-4}	198,000	537.0	24,550	173,500	
Vibriolysin	50.0	3.0×10^{-4}	127,950	326.0	22,650	105,300	
Tetanolysin	50.0	2.1×10^{-4}	172,650	459.0	24,350	148,000	
Peroxidase (milk)	70.1	5.1×10^{-4}	185,300	466.4	25,300	160,000	
Rennen	50.0	6.7×10^{-4}	89,350	208.1	22,130	67,200	
Amylase (malt)	60.0	8.0×10^{-4}	41,630	52.3	24,230	17,400	
Invertase (yeast)	50.0	7.7×10^{-4}	52,350	84.7	25,000	27,350	5.7
Invertase (yeast)	55.0	5.0×10^{-4}	86,350	185.0	25,700	60,680	5.2
Invertase (yeast)	50.2	3.5×10^{-4}	110,350	262.5	25,500	84,840	4.0
Invertase (yeast)	55.0	3.75×10^{-4}	74,350	152.4	24,400	50,000	3.0
Emulsin (wet)	60.0	4.0×10^{-4}	44,930	65.3	23,200	21,750	
Emulsin (dry)	100.0	1.48×10^{-4}	25,550	-7.86	28,500	-2,950	
Lipase (dry)	120.0	4.0×10^{-4}	(24,200)	(-13.0)	(29,300)	(-5,100)	

t (°C)	pH	Catalyst	k^* (sec ⁻¹)	ΔH^\ddagger (cal)	ΔS^\ddagger (E.U. or cal/deg)	ΔF^\ddagger (cal)	$T\Delta S^\ddagger$
-------------	----	----------	-------------------------------	------------------------------	---	------------------------------	----------------------

Egg Albumin

65.0	5.0	Water	2.54×10^{-4}	132,100	315.7	25,400	106,700
	6.76	Water	2.8×10^{-4}	128,200	295.2	28,400	99,800
	7.7	Water	1.8×10^{-4}	134,300	317.1	27,100	107,200
70.2	5.0	Water	5.1×10^{-4}	132,100	315.7	23,750	108,350
	6.76	Water	5.15×10^{-4}	128,200	295.2	26,900	101,300
	7.7	Water	3.8×10^{-4}	134,300	317.1	25,500	108,800
51.1	3.4	Water	2.76×10^{-4}	96,750	223.7	24,300	72,500
56.2	3.4	Water	2.88×10^{-4}	96,750	223.7	23,100	73,640
64.8	9.8	Water	1.15×10^{-4}			27,500	

Hemoglobin

60.5	5.7	Water	4.3×10^{-4}	75,600	152.7	24,700	50,900
	6.3	Water	1.05×10^{-4}	76,300	152.0	25,600	51,700
	8.0	Water	3.35×10^{-4}	77,300	157.3	24,840	52,460
68.0	5.7	Water	5.4×10^{-4}	75,600	152.7	23,530	52,070
	6.8	Water	1.35×10^{-4}	76,300	152.0	24,470	51,830
	8.0	Water	4.45×10^{-4}	77,300	157.3	23,660	53,640
64.0	6.76	0.15 N $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.41×10^{-4}	76,500	152.5	25,100	51,400

Tabla 9. Parámetros termodinámicos correspondientes a la inactivación por calor de algunas moléculas "in vitro". (Tomado de "The kinetic Basis of Molecular Biology", Johnson, Eyring, Polissar. U.S.A., 1954).

Puesto que nuestro ΔH^* es del mismo orden, aunque algo superior, al obtenido por Jonhson, el tipo de las roturas = que se produzcan deberá ser semejante. Sin embargo, consideramos que ha quedado suficientemente clara la multiplicidad de blancos del precursor G-M de CDA, por lo que si resultan ciertas = sus hipótesis , el blanco ante la hipertermia no tendrá por que ser el ADN y en concreto el desenrollamiento de una de sus cadenas . Por el contrario, más bien parece que nuestros datos se = inclinan hacia la idea de que éste sea una determinada proteína.

IV. 9. 4. Implicaciones termodinámicas deducidas del estudio de los efectos de la hipertermia en distintas líneas celulares.

Las Entalpías de activación que se obtuvieron en distintas células resultaron ser semejantes a las calculadas para la inactivación de numerosas enzimas y proteínas. Tanto en CHO (Westra y Dewey, 1971), como en PK (Harris, 1966), las entalpías fueron de 141 Kcal/mol, a pesar de que las velocidades de muerte eran muy distintas y del orden de diez veces superior en CHO.

En numerosos casos, la representación de las velocidades en coordenadas de Arrhenius presenta un "codo" en la recta que define la relación entre la velocidad y la inversa de la = temperatura absoluta de tratamiento; es decir, que a partir de una determinada temperatura (próxima a 43º C, en opinión de algunos autores), la Energía de activación se modifica, y muy frecuentemente a ello se le ha asociado con un cambio en el blanco celular.

El análisis de los parámetros obtenidos por diversos =

autores (Tabla 10), nos muestra como además de las modificaciones del ΔH^* e ΔS^* producidas a temperaturas próximas a 43°C, también se producen otras; de manera que tratamientos con temperaturas elevadas van siempre acompañados de valores ΔH^* e ΔS^* inferiores a los obtenidos para temperaturas más bajas.

Como puede apreciarse en la misma tabla, independientemente de la línea celular estudiada, cuando las temperaturas de tratamiento son las mismas, los valores de ΔH^* y de ΔS^* son semejantes, exceptuando el caso de la CFU-CD correspondiente al trabajo de Elkon antes citado.

Dado que en los procesos de inactivación "in vitro" de moléculas, también han sido descritas alteraciones en el ΔH^* , como consecuencia de modificaciones de la viscosidad, difusión, etc., con la temperatura, consideramos que no todas las variaciones de ΔH^* deben ser atribuidas a un cambio en el blanco de la célula, aunque en ocasiones, si éstas son muy pronunciadas, es posible que efectivamente así suceda.

Atendiendo a nuestros resultados y puesto que en la representación de Arrhenius queda clara la existencia de una sola recta (Figura 9), consideramos que la muerte de las células, debido al tratamiento hipertérmico se debe a un mismo mecanismo en el intervalo de 42,5°C-44°C, sin que existan cambios en los blancos de las células.

Por otra parte, y debido a que entre los diferentes tipos de células revisados, la gran mayoría presenta valores de ΔH^* y de ΔS^* similares, en los mismos rangos de temperatura, podemos pensar que la muerte por hipertermia se produce como consecuencia de la lesión de un blanco semejante en todas ellas.

Linea celular	Referencia	T ^o (°C)	ΔH^* (Kcal/mol)	ΔS^* (u.e.)	ΔG^* (Kcal/mol)
<u>GHL</u>	Massicotte y col., 1981	42,0-46,8	146	388	23
	Jonhson, 1974	41,0-46,0	180	505	12
<u>HeLa</u>	Roti Roti y col., 1979	44,0-48,0	154	420	19
	Laundry y Marceau, 1978	41,0-44,0	375	1.111	26
		42,0-45,0	217	610	24
		44,0-47,0	141	370	23
		45,0-49,0	119	304	22
		49,0-55,0	47	80	21
<u>CHO</u>	Bauer y Henle, 1979	41,5-43,0	302	893	20
		43,5-48,0	131	353	20
	Westra y Dewey, 1971	43,5-46,5	141	396	15
	Dewey y col., 1977	41,5-43,0	365		
		43,0-46,5	148		

Línea celular	Referencia	T ^o (°C)	ΔH^* (Kcal/mol)	ΔS^* (u. e.)	ΔG^* (Kcal/mol)
<u>CFU-CD</u>	Elkon y McGrath, 1981	41,5-43,5	210	622	13
		43,5-45,5	83	216	14
<u>PK</u>	Harris, 1967	44,0-48,0	141	398	14
<u>Cel. Cepa intestinal</u>	Hume, 1979	42,0-44,5	143	405	15
<u>CFU-s</u>	Maganto y Nieto, 1981	42,0-45,0	181	522	15
<u>Precursor G-M de CDA</u>		42,5-44,0	223	652	17

Tabla 10. Parámetros termodinámicos correspondientes a la pérdida de la viabilidad celular por tratamientos de hipertermia.

CAPITULO V. CONCLUSIONES

1. Partiendo de la técnica de cultivo en cámara de difusión elaborada por Gordon, se ha conseguido el cultivo de los precursores que originan las series granulocítica y macrófaga de la sangre y su expresión mediante colonias. El método de contaje ha sido mejorado, al extraer, tras el cultivo, la lámina de acetato que cubre uno de los costados de las cámaras, y teñir las colonias con Giemsa. De esta manera, se consigue mantener en mejores condiciones el gel de agar que contiene las colonias y destacar su presencia en los contajes. A su vez, ello ha permitido establecer un criterio de clasificación de las colonias en granulocíticas y macrófagas, según el tamaño de sus células, que resulta más seguro que aquel que atiende al grado de su empaquetamiento.

2. Mediante la cuantificación de los distintos tipos de colonias se ha podido seguir su evolución a lo largo de un período de 8 días, quedando de manifiesto que las colonias de macrófagos se caracterizan por ser de una evolución más lenta que las de granulocitos, así como también que tan sólo una pequeña minoría de ellas contienen granulocitos y macrófagos conjuntamente. Por tanto, la propia naturaleza de las colonias apoya la hipótesis que considera la existencia de precursores que originan de una manera determinada la serie granulocítica o la macrófaga independientemente. En este contexto se ha calculado que existirá un "precursor granulocítico" por cada 4.400 células de médula ósea de ratón y al menos un "precursor de macrófagos" por cada 1.000 células de médula, mientras que si consideramos al precursor granulocítico-macrófago común como el que prolifera en la cá

mara de difusión, su concentración en la médula será de al menos 1 por cada 800 células.

3. Como en los tratamientos de hipertermia realizados en las diferentes experiencias, la cinética con que se produjo la pérdida de la viabilidad celular se ha correspondido con la descrita por el modelo multiblanco de 1 impacto mencionado, sus implicaciones teóricas han sido aceptadas para explicar el comportamiento de los precursores ante este agente .

En el caso de la hipertermia, la termosensibilidad de los hipotéticos precursores "determinados" no ha mostrado diferencias significativas entre sí. Los valores de T_0 , determinados según el total de las colonias contadas y que correspondería al precursor común, son: 42,5°C - 10,87 min; 43°C - 5,18 min; 43,5°C - 3,58 min y 44°C - 1,58 min, con un número de blancos comprendido entre 1,4 y 3,0 . De estos resultados se deduce que el precursor G-M de CDA se comporta como una de las células más termosensibles que aparecen en la bibliografía.

4. Ha sido elaborado un modelo según el cual todas las fracciones de supervivencia correspondientes a las cuatro temperaturas estudiadas se ajustan conjuntamente. Los resultados obtenidos sugieren que en el intervalo 42,5 - 44°C la pérdida de la viabilidad celular se produce como consecuencia de la inactivación de un mismo número de blancos y que el mecanismo por el cual se produce esta inactivación es también el mismo dentro del intervalo.

5. A través del fraccionamiento de una exposición hipertérmica, ha quedado comprobada la capacidad de los precursores a acumular y reparar daño subletal termoinducido, lo que implica la posibilidad de reactivación de los blancos en las células que permanecen viables.

6. La interpretación termodinámica de la cinética con que se produce la pérdida de la viabilidad celular sugiere, en concordancia con otros estudios termodinámicos, y a diferencia de lo que ocurre en las radiaciones ionizantes, que la molécula blanco ante la hipertermia es una proteína y no el ADN.

CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA

- ALGIRE, G.H., BORDERS, M.L. and EVANS, V.J.: Studies on heterografts in diffusion chambers in mice. J.Nat.Cancer Inst. 20 (1958) = 1187.

- BARNES, D.W.R., FORD, C.E., GRAY, S.M. and LOUTIT, J.F., Prog.Nucl.Energy. Ser.VI.Vol.2 (1959) 1.

- BARRAT, G.M. and WILLS, E.D.: Effects of misonidazole, irradiation and hyperthermia on lisosomal enzyme activity in mouse tumors., Europ.J.Cancer 17 (1980) 21.

- BAUER, K.D. and HENLE, K.J.: Arrhenius analysis of heat survival = curves from normal and thermotolerant CHO cells., Radiat.Res. = 78 (1979) 251.

- BECKER, A.J., McCULLOCH, E.A., SEMENOVITCH, L. and TELL, J.E.: The = effect of differing demands for blood cell production in DNA = synthesis by hemopoietic colony forming cells of mice., Blood 26 (1965) 296.

- BEN-ISHAY, Z.: Ultrastructural analysis of erythroid colonies in diffusion chambers in irradiated rats., Scand.J.Haematol. 14 (1975) 369.

- BENESTAD, E.B.: Formation of granulocytes and macrophages in dif = fusion chamber cultures of mouse blood leucocytes., Scand.J. = Haematol. 7 (1970) 279.

cyte-macrophage colony stimulating factors., Blood 56 (1980) 947.

- BUSCH, W.: Ueber den einfluss welchen heftigere Erysipeln zuweilen auf organisierte nebildungen ausuben., Verh. Naturh. Preuss. Rhein. Westphal. 23 (1866) 28.
- CARRETERO, Y.: GRAFIC-subrutina para la representaci3n de gráficas., Rep. J. E. N. 362 (1977) 40.
- CAVALIERE, R., CIOCATTO, E. C. and GIOVANELLA, B. C.: Selective heat sensitivity of cancer cells: Biochemical and clinical studies., Cancer 20 (1967) 1351.
- CHEN, T. T. and HEILDERBERGER, C.: Quantitative studies on the malignant transformation of mouse prostate cells by carcinogenic hydrocarbons in vitro., Int. J. Cancer 4 (1969) 166.
- CLINE, M. J. and SUMNER, M. A.: Bone marrow macrophage precursors. I. Some functional characteristics of the early cells of the mouse macrophage series., Blood 40 (1972) 62.
- CLINE, M. J., WARNER, N. L. and METCALF, D.: Identifivation of the bone marrow colony mononuclear phagocyte as macrophage., Blood 39 (1982) 326.

- BERMAN, I. and KAPLAN, H.S.: The cultivation of mouse bone marrow in vivo., Blood 14 (1959) 1040.
- BHUYAN, B.K., DAY, K.J., EGGERTON, C.E. and OGUNBASE, O.: Sensitivity of different cell lines and of different phases in the cell cycle to hyperthermia., Cancer Res. 37 (1977) 3780.
- BOL, S. and WILLIAMS, N.: The maturation state of three types of granulocyte/macrophage progenitor cells from mouse bone marrow., J.Cell.Physiol. 102 (1980) 233.
- BOYUM, A. and BORGTRON, R.; The concentration of the granulocytic stem cells in mouse bone marrow determined with a diffusion chamber technique., Scand.J.Haematol. 7 (1970) 294.
- BOWDEN, G.T., KASUNIC, M. and CRESS, A.E.: Thermal enhancement of X-Ray induced DNA crosslinking., Radiat.Res. 89 (1982) 203.
- BRADLEY, T.R. and METCALF, D.: The growth of mouse bone marrow cells in vitro., Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci. 44 (1966) 287.
- BRENNAN, J.K., LICHTMAN, M.A., DI PERSIO, J.F. and ABBOUT, C.N.: Chemical mediators of granulopoiesis., Exp.Hematol. 8 (1980) 441.
- BURGESS, A.W. and METCALF, D.: The nature and action of granulo-

- CLINE, M.J. and GOLDE, D.W.: Improved tecnicis for liquid culture of human and mouse bone marrow., Blood 47 (1976) 369.
- CLOW, D.J. and GILLETE, E.L.: Survival of tipe A spermatogonia = following X-irradiation., Radiat. Res. 42 (1970) 397.
- COLEY, W.S.: The treatament of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases., Amer. J. Med. Sci. 105 (1893) 487.
- CONNOR, W.G., GERNER, E.W., MILLER, R.C. and BOONE, M.L.M.: Prospects for hyperthermia in human cancer therapy., Radiology 123 (1977) 497.
- CRESS, A.E., HERMAN, T.S. and GERNER, E.W.: Cholesterol content and thermal sensitivity of mammalian cells in vitro., Radiat. = Res. 74 (1978) 447.
- DEWEY, W.C., HOPWOOD, L.E., SAPARETO, S.A. and GERWECK, L.E.; Cellular responses to combinations of hyperthermia and radiation., Radiology 123 (1977) 463.
- DICKE, K.A., PLATENBURG, M.G.C. and BEKNUM, D.W.V.: Colony forma-- tion in agar: in vitro assay for haemopoietic stem-cells., = Cell Tissue Kinet. 4 (1971) 463.

- DICKSON, J.A. and SHAH, D.M.: The effects of hyperthermia on the biochemistry and growth of a malignant cell line., *Europ. J. cancer* 8 (1972) 561.
- DIXON, R.A., LINCH, D., BAINES, P. and ROSENDAL, M.: Autoclaved agar contains an inhibitor of granulocyte-macrophage colony growth in vitro., *Exp. Cell Res.* 131 (1981) 478.
- DOMOM, M.: A biological variability model of cell survival curves., *Radiat. Res.* 82 (1980) 611.
- EIGNER, J., BOEDTKER, H. and MICHAELS, G., *Biochim. Biophys. Acta* = 51 (1961) 165.
- ELKIND, M.M.: The initial part of the survival curves. Implications for low-dose radiation responses., *Radiat. Res.* 71 (1977) 9.
- ELKON, D. and McGRATH, H.L.: Thermal inactivation energy of granulocyte-monocyte stem cells., *Radiat. Res.* 87 (1981) 368.
- FORD, C.E., HAMERTON, J.H., BARNES, D.W.H. and LOUTIT, J.H.: Spontaneous and induced changes in cell populations in heavily irradiated mice., *Nature* 177 (1956) 452.
- FREEMAN, M.L., RAAPHORST, G.P., HOPWOOD, L.E. and DEWEY, W.C.: The =

effect of pH on cell lethality induced by hyperthermic treatment., *Cancer* 45 (1980) 2291.

- GARRET, W.R. and PAYNE, M.G.: Applications of models for cell survival: The fixation time picture., *Radiat. Res.* 71 (1978) 128-148.
- GERNER, E.W. and SCHNEIDER, M.J.: Induced thermal resistance in HeLa cells., *Nature* 256 (1975) 500.
- GERWECK, L.E., GILLETE, E.L. and DEWEY, W.E.: Killing of Chinese hamster cells in vitro by heating under hypoxic or aerobic conditions., *Eur. J. Cancer.* 10 (1974) 691.
- GERWECK, L.E., GILLETE, E.L. and DEWEY, W.C.: Effect of heat and radiation on synchronous chinese hamster cells: Killing and repair., *Radiat. Res.* 64 (1975) 611.
- GERWECK, L.E. and ROTTINGER, E.: Enhancement of mammalian cell sensitivity to hyperthermia by pH alteration., *Radiat. Res.* 67 (1976) 508.
- GERWECK, L.E.: Modification of cell lethality at elevated temperatures. The pH effect., *Radiat. Res.* 70 (1977) 224.
- GINOZA, W.: Kinetics of heat inactivation of ribonucleic acid

of tobacco mosaic virus., Nature 181 (1958) 958 .

- GINOZA, W. and ZIMM, B.H.: Mechanisms of inactivation of DNA by heat., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 47 (1961) 639.
- GIOVANELLA, B.C. and HEILDELBERGER, C.: Biochemical and biological effects of heat on normal and neoplastic cells., Proc. = Amer. Ass.Cancer. Res. 9 (1968) 24.
- GIOVANELLA, B.C., MOSTI, R. and HEILDELBERGER, C.: Further studies of the lethal effects of heat on tumor cells., Proc.Amer.Ass. Cancer Res. 10. (1969) 29.
- GIOVANELLA, B.C., MORGAN, A.C., STEHLIN, J.S. and WILLIAMS, M.J.: selective lethal effects of supranormal temperatures on mouse = sarcoma cells., Cancer Res. 33 (1973) 2568.
- GOLDE, D.W. and CLINE, M.J.: Growth of human bone marrow in liquid culture., Blood 41 (1973) 45.
- GORDON, M.Y.: Quantitation of haemopoietic cells from normal and leukaemic RFM mice using an in vivo colony assay., Br.J.Cancer 30 (1974) 421.
- GOUD, T.J., SCHOTTE, C. and VAN FURT, R.: Identification and characterization of the monoblast in mononuclear phagocyte colonies grown in vitro., J.Exp.Med. 142 (1975) 1180.

- GREER, S. and ZAMENHOFF, S.: Studies on depurination of DNA by heat., J.Mol.Biol. 4 (1962) 123.

- HAHN, G.M.: Metabolic aspects of the role of hyperthermia in mammalian cell inactivation and their possible relevance to cancer treatment. Cancer Res. 34 (1974) 3117.

- HARIADIS, L., HALL, E. J., KRALJEVIĆ, U. and BOREC, C.: Hyperthermia Biological studies at cellular level., Radiology 117 (1975) = 447.

- HARRIS, M.: Temperature resistant variants in clonal populations of pig kidney cells., Exp.Cell.Res. 46 (1967) 301.

- HARRIS, J.R., MURTHY, A.K. and BELLI, J.A.: The effect of hyperthermia on the repair of radiation damage in plateau phase cells., Radiology 119 (1976) 227.

- HASKILL, J.S., McNEILL, T.A. and MOORE, M.A.S.: Density distribution analysis of in vivo and in vitro Colony Forming Cells in bone marrow., J.Cell.Physiol. 75 (1970) 167.

- HENLE, K.J. and LEEPER, D.B.: Interaction of hyperthermia and radiation on CHO cells: recovery kinetics., Radiat.Res. 66 (1978) 505.

- HENLE, K.J. and ROTI-ROTI, J.L.: Time temperature conversions in

- biological applications of hyperthermia., Radiat.Res. 82 =
(1980) 138.
- HENLE, K.J. and LEEPER, D.B.: The modification of radiation damage on CHO cells by hyperthermia at 40 and 45°C., Radiat, Res. 70 (1977) 415.
- HENLE, K.J. and DETHELFSEN, L.A.: Time-temperature relationships for heat-induced killing of mammalian cells., Annals N.Y.Acad. Sci. (1980) 234.
- HOFER, K.G., HOFER, M.G., IERACITANO, J and McLAUGHLING, W.H.: Radio sensitization of hypoxic tumor cells by simultaneous administration of hyperthermia and nitroimidazoles., Rad.Res. 70 = (1977) 362.
- HUME, S.P., MARIGOLD, C.L. and FIELD, S.B.: The effect of local = hyperthermia on the small intestine of the mouse., Br.J.Radiol 52 (1979) 657.
- ICHIKAWA, Y., PLUZNIK, D.H. and SACHS, L.: In vitro development = of macrophage and granulocyte colonies., Proc.Nat.Acad.Sci. 56 (1966) 448.
- JACOBSEN, N.: Chamber centrifugation; A harvesting technique = for stimulation of the growth of human haemopoietic cells in diffusion chambers., Br.J.Haematol. 29 (1975) 171.

- JACOBSEN, N., BROXEMEYER, H. E., GROSSBARD, E. and MOORE, M. A. S.: Diversity of human granulopoietic precursor cells: separation of cells that form colonies in diffusion chambers (CFU-d) from populations of colony forming cells in vitro (CFU-c) by velocity sedimentation., Blood 52 (1978) 221.
- JACOBSEN, N., BROXEMEYER, H. E., GROSSBARD, E. and MOORE, M. A. S.: Colony Forming Units in diffusion chambers (CFU-d) and Colony Forming Units in agar culture (CFU-c) obtained from normal human marrow: a possible parent progeny relationship., Cell Tissue Kinet. 12 (1979) 213.
- JAMES, F.: Program MINUIT. Long write-up., TC program library. CERN (1976).
- JOHNSON, F. H., EYRING, H. and POLISSAR, M. J.: The kinetic basis of molecular biology., Ed. Willey. New York, (1954) 187.
- JOHNSON, G. R., DRESCH, C. and METCALF, D.: Heterogeneity in human neutrophil, macrophage and eosinophil progenitor cells demonstrated by velocity sedimentation separation., Blood 50 (1977) 823.
- JOHNSON, H. A. and PAVELEC, M.: Thermal injury due to normal body temperature., Am. J. Pathol. 66 (1972) 557.
- JOHNSON, H. A.: On the thermodynamics of cell injury., Am. J. Pathol. 75 (1974) 13.

- KIM, S.H., KIM, J.H. and HAHN, E.W.: The enhanced killing of irradiated HeLa cells in synchronous culture by hyperthermia., = Radiat. Res. 66 (1976) 337.
- KURLAND, J.I., BOCKMAN, R.S., BROXMEYER, R.S. and MOORE, M.A.S.: = Limitation of excessive mielopoiesis by the intrinsic modulation of macrophage-derived prostaglandin.E., Science 190 = (1978) 552.
- LAJTHA, L.G., POZZI, L.V., SCHOFIELD, R. and FOX, M.: Kinetic properties of haemopoietic stem cells., Cell Tissue Kinet. 2 (1969) 39.
- LAJTHA, L.G.: Stem cell concepts., Nouv.Rev.Fr.Hematol. 21 = (1979) 59.
- LAUNDRY, J. and MARCEAU, N.: Rate-limiting events in hyperthermic cell killing., Radiat.Res. 75 (1978) 573.
- LI, G.C., SHIU, E.C. and HAHN, G.M.: Similarities in cellular inactivation by hyperthermia or by ethanol., Radiat.Res. 82 (1980) 257.
- LINDAHL, T. and NYBERG, B.: Rate of depurination of double-stranded native deoxiribonucleic acid., Biochemistry 11 (1972) = 3610.

- MAGANTO, G. y NIETO, M.: Inactivación térmica de las CFUs de ratón., Real Sociedad Española de Física y Química. XVII Reunión Bienal. Burgos, 29 Sept-3 Octubre, 1980.

- MASSICOTTE-NOLAN, P., GLOFCHESKI, D. J., KRUVV, J. and LEPOCK, J. R.: Relationship between hyperthermic cell killing and protein denaturation by alcohols., Radiat. Res. 87 (1981) 284.

- McLEOD, D. L., SHREEVE, M. M. and AXELRAD, A. A.: Improved plasma culture system for production erythrocytic colonies in vitro: Quantitative assay method for CFU-E., Blood 44 (1974) 517.

- METCALF, D., BRADLEY, T. R. and ROBINSON, W.: Analysis of colonies developing in vitro from mouse bone marrow cells stimulated by kidney feeder layers or leukemic serum., J. Cell. Physiol. 69 (1967) 93.

- METCALF, D.: Studies on colony formation in vitro by mouse bone marrow cells. II. Action of Colony Stimulating Factor., J. Cell. Physiol. 76 (1970) 89.

- METCALF, B. and MOORE, M. A. S.: Haemopoietic cells., Ed. North Holland publishing company. Amsterdam (1971), 123.

- METCALF, D.: Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies in vitro., J. Cell. Physiol. 77 (1971) 277.

- NISKANEN, E. and CLINE, M.J.: Growth of human bone marrow in diffusion chambers in mice., Cell Tissue Kinet. 12 (1979) 59.
- OKADA, S.: DNA as target molecule responsible for cell killing. - Radiation Biochemistry., Ed. Altman, R.I., Gerner, G.B. and Okada, S. Academic Press Inc. London (1970) 103.
- OVERGAARD, K. and OVERGAARD, J.: Investigations on the possibility of a thermic tumor therapy-short wave treatment of a transplanted isologous mouse mammary carcinoma. Eur. J. Cancer 8 (1972) 65.
- PAYNE, M.G. and GARRET, W.R.: Models for cell survival with low LET radiation., Radiation Res. 62 (1975) 169.
- PIZZARELLO, D.J. and WITCOFSKI, R.L.: Basic Radiation Biology. Ed. Lea and Febiger., London (1967).
- PLUZNEK, D.H. and SACHS, L.: The cloning of normal "mast" cells in tissue culture., J. Cell Comp. Physiol. 66 (1965) 319.
- RAAPHORST, G.P., ROMANO, S.L., MITCHEL, S.L., BEDFORD, J.S. and DEWEY, J.S.: Intrinsic differences in heat and/or X ray sensitivity of seven mammalian cell lines cultured and treated under identical conditions., Cancer Res. 39 (1979) 396.
- REEVES, J.P.: Mechanisms of acquired resistance to heat shock in cultured mammalian cells., J. Cell. Physiol. 79 (1971) 157.

- ROBINSON, H.A. and WIZEMBERG, M.: Thermal sensitivity and the effect of elevated temperatures on the radiation sensitivity of Chinese Hamster cells., Acta Radiol. 3 (1974) 1013.

- ROTI-ROTI, J.L. and HENLE, K.J.: Comparison of two mathematical models for describing heat-induced cell killing., Radiat. Res. 81 (1980) 374.

- ROTI-ROTI, J.L., HENLE, K.J. and WINWARD, R.T.: The kinetics of increase in chromatin protein content in heated cells: A possible role in cell killing., Radiat. Res. 78 (1979) 522.

- ROSS-RIVEROS, P. and LEITH, J.H.: Response of 9L Tumor cells to hyperthermia and X irradiation., Radiat. Res. 78 (1979) 296.

- SELAWRY, D.S., GOLDSTEIN, M.N. and McCORMICK; Hyperthermia in tissue cultured cells of malignant origin. Cancer Res. 17 (1957) 785.

- SHELDON, S.P., GOLDE, H.D. and CLINE, M.J.: Neutrophil products that inhibit cell proliferation: Relation to granulocytic "chalone"., Blood 51 (1978) 207.

- SCHULMAN, N. and HALL, E.J.: Hyperthermia: its effects on proliferative and plateau phase cell cultures., Radiology 113 (1974) 207.

- SPIRO, I.J., DENMAN, D.L. and DEWEY, W.C.: Effect of hyperthermia on

- MICHAELS, H.B. and HUNT, J.W.: A model for radiation damage in cells by direct and indirect effect: A radiation chemistry approach., *Radiat. Res.* 74 (1978) 23.
- MIURA, D. and USAMI, Y.: Heat sensitivity of tumor cells., *Tohoku Exp. Med.* 113 (1974) 291.
- MONDOVI, B., STROM, R., ROTILIO, G., AGRO, A.F., CAVALIERI, R. and FANELLI, A.R.: The biochemical mechanism of selective heat sensitivity of cancer cells. I. Studies on cellular respiration., *Europ. J. Cancer* 5 (1969) 129.
- MONETTE, F.C., KENT, R.B., WEINER, E.J., LAVANIS, E.J. and LYDON, P.J.: Cell cycle properties and proliferation kinetics of late erythroid progenitor cells. (abs.), *Exp. Hematol.* 6 (suppl.3) (1978) 12.
- MORADET, N. and PARMENTIER, C.: Description of a suicide technique in vitro for granulocytic stem cells (CFU-G) by hydroxyurea on normal human bone marrow., *Biomedicine* 27 (1977) 349.
- MUCKE, D.S. and DICKSON, J.A.: The selective inhibitory effect of hyperthermia on the metabolism and growth of malignant cells., *Br. J. Cancer* 15 (1978) 771.
- NAREFF, A. and DANIELS-McQUEEN, S.: In vitro colony assay for a new class of megacariocyte precursor: Colony Forming Unit megacariocyte (CFU-m)., *Proc. Soc. Exp. Biol.* 151 (1976) 587.

CHO DNA polymerases α and β ., Radiat.Res. 89 (1982) 134.

- STANDEM, G., PHIPPIP, M.A. and FLETCHER, J.: The proliferative state of granulocytic progenitor cells in human blood and marrow., = Cell Tissue Kinet. 13 (1980) 105.
- STEINBERG, H.N., HANDLER, E.S. and HANDLER, E.E.: Assessment of erythrocytic and granulocytic colony formation in an in vivo plasma clot diffusion chamber culture system., Blood 47 (1976) 1041.
- STEVENSON, H.N.: The effect of heat upon tumor tissue., J.Cancer Res. 4 (1919) 54.
- STEWART, C.C. and PEREZ, C.A.: Effect of radiation on immune responses., Radiology 118 (1976) 201.
- STORM, F.K., HARRISON, W.H., ELLIOT, R.S. and MORTON, D.L.: Hyperthermic therapy for human neoplasms: thermal death time., Cancer 46 (1980) 1849.
- STROM, R., SANTORO, A.F., CRIFFO, C., BOZZI, A., MONDOVI, B. and FANELLI, A.R.: The biochemical mechanism of selective heat sensitivity of cancer cells.IV. Inhibition of RNA synthesis., Europ. J. Cancer 9 (1973) 103.
- SUGIURA, K.: Effect of high and low body temperatures upon growth of irradiated mouse sarcoma., Radiology 37 (1941) 85.

- TEPPERMAN, A. D., CURTIS, J. D. and McCULLOCH, E. A.: Erythropoietic colonies in cultures of human marrow., *Blood* 44 (1974) 659.
- TILL, J. E. and McCULLOCH, E. A.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells., *Radiat. Res.* 14 (1961) 213.
- TOMASOVIC, S. P., TURNER, G. N. and DEWEY, W. C.: Effect of hyperthermia on nonhistone proteins isolated with DNA., *Radiat. Res.* 73 (1978) 535.
- TOMMASINO, L., WHITMORE, G. F. and SILINI, G.: A new approach to the analysis of the survival data., *Radiat. Res.* 77 (1978) 128.
- U, R., NOELL, K. T., WOODWARD, K. T., WORDE, B. T., FISHBURN, R. I., MILLER, H. S.: Microwave induced local hyperthermia in combinations with radiotherapy of human malignant tumors., *Cancer*, 45 (1980) 638.
- URANO, M., GERWECK, L. E., EIPSTEIN, R., CUNNINGHAM, M. and SUIT, H. D.: Response of a spontaneous murine tumor to hyperthermia; Factors which modify the thermal response in vivo., *Radiat. Res.* 83 (1988) 312.
- VERMA, D. S., SPITZER, G., ZANDER, A. R., FISHER, R., McCREDIE, K. B. and DICKE, K. A.: The myeloid progenitor cell: A parallel study of subpopulations in human marrow and peripheral blood., *Exp. Hematol.* 8 (1980) 32.

- WARREN, S.L.: Preliminary study of the effect of artificial fever upon hopeless tumor cases., Amer.J.Roentgenol. 33 (1935) 75.
- WATSON, J.V.: A linear transform of the multitarget survival curve. Br. J. Radiol. 51 (1978) 534.
- WESTRA, A. and DEWEY, W.C.: Variation in sensitivity to heat shock during cell cycle of Chinese Hamster Cells in vitro., 19 (1971) 467.
- WILLEMZE, R., WALKER, R.I., HERION, J.K. and PALMER, J.G.: Marrow culture in diffusion chambers in rabbits. I. Effects of mature granulocytes on cell production. Blood 51 (1978) 21.
- WILSON, F.D., STITZ, K.A., KLEIN, A.K., SCHIFFRINE, M., GRAHAM, R., JONES, M., BRADLEY, E. and ROSENBLATT, L.S.: Quantitative response of bone marrow Colony Forming Units (CFU-C and PFU-C) in weanling beagles exposed to acute whole body irradiation., Radiat. Res. 74 (1978) 289.
- WORTON, R.G., McCULLOCH, E.A. and TILL, J.E.: Physical separation of hemopoietic stem cells from cells forming colonies in culture., J. Cell Physiol 74 (1969) 171.
- WU, A.M., SIMINOVITCH, L., TILL, J.E. and McCULLOCH, E.A.: Evidence for a relationship between mouse hemopoietic stem cells and cells forming colonies in culture., Proc. Nat. Acad. Sci. 59 (1968) 1209.

The results indicate the high thermosensitivity of these cells and also their multiplicity of targets that, in agreement with the statement of other authors, seem to be composed of proteins. The capacity of the precursors to accumulate and repair sublethal damage has been evidenced too.

INIS CLASSIFICATION AND DESCRIPTORS: C10. Radiosensitivity. Mice. Precursor. In vivo. Hyperthermia. Cell flow systems. Leukocytes. Macrophages. Bone marrow.

The results indicate the high thermosensitivity of these cells and also their multiplicity of targets that, in agreement with the statement of other authors, seem to be composed of proteins. The capacity of the precursors to accumulate and repair sublethal damage has been evidenced too.

INIS CLASSIFICATION AND DESCRIPTORS: C10. Radiosensitivity. Mice. Precursor. In vivo. Hyperthermia. Cell flow systems. Leukocytes. Macrophages. Bone marrow.

The results indicate the high thermosensitivity of these cells and also their multiplicity of targets that, in agreement with the statement of other authors, seem to be composed of proteins. The capacity of the precursors to accumulate and repair sublethal damage has been evidenced too.

INIS CLASSIFICATION AND DESCRIPTORS: C10. Radiosensitivity. Mice. Precursor. In vivo. Hyperthermia. Cell flow systems. Leukocytes. Macrophages. Bone marrow.

The results indicate the high thermosensitivity of the cells and also their multiplicity of targets that, in agreement with the statement of other authors, seem to be composed of proteins. The capacity of the precursors to accumulate and repair sublethal damage has been evidenced too.

INIS CLASSIFICATION AND DESCRIPTORS: C10. Radiosensitivity. Mice. Precursor. In vivo. Hyperthermia. Cell flow systems. Leukocytes. Macrophages. Bone marrow.

J.E.N. 526

Junta de Energía Nuclear. División de Química y Medio Ambiente. Madrid.

Thermo-radiosensitivity of the granulocyte and macrophage precursor cells of mice. I.- Development of the "in vivo" culture and effects induced by the hyperthermia".

BUEREN, J.A.; NIETO, M. (1983). 151 pp. 15 figs. 129 refs.

The present report shows the agar diffusion chamber technique for culturing granulocyte-macrophage precursor cells, obtained from mice bone marrow.

Diffusion chambers containing the bone marrow suspension are implanted intraperitoneally into mice and constitute a compartment which avoids the migration of cells, but allows the transit of the mouse biological fluxes, necessary for the cellular proliferation.

By means of this technique, we studied the lethal effects of the hyperthermia on the precursors and their capacity to repair sublethal damage.

J.E.N. 526

Junta de Energía Nuclear. División de Química y Medio Ambiente. Madrid.

"Thermo-radiosensitivity of the granulocyte and macrophage precursor cells of mice. I.- Development of the "in vivo" culture and effects induced by the hyperthermia".

BUEREN, J.A.; NIETO, M. (1983) 151 pp. 15 figs. 129 refs.

The present report shows the agar diffusion chamber technique for culturing granulocyte-macrophage precursor cells, obtained from mice bone marrow.

Diffusion chambers containing the bone marrow suspension are implanted intraperitoneally into mice and constitute a compartment which avoids the migration of cells, but allows the transit of the mouse biological fluxes, necessary for the cellular proliferation.

By means of this technique, we studied the lethal effects of the hyperthermia on the precursors and their capacity to repair sublethal damage.

J.E.N. 526

Junta de Energía Nuclear. División de Química y Medio Ambiente. Madrid.

Thermo-radiosensitivity of the granulocyte and macrophage precursor cells of mice. I.- Development of the "in vivo" culture and effects induced by the hyperthermia".

BUEREN, J.A.; NIETO, M. (1983) 151 pp. 15 figs. 129 refs.

The present report shows the agar diffusion chamber technique for culturing granulocyte-macrophage precursor cells, obtained from mice bone marrow.

Diffusion chambers containing the bone marrow suspension are implanted intraperitoneally into mice and constitute a compartment which avoids the migration of cells, but allows the transit of the mouse biological fluxes, necessary for the cellular proliferation.

By means of this technique, we studied the lethal effects of the hyperthermia on the precursors and their capacity to repair sublethal damage.

J.E.N. 526

Junta de Energía Nuclear. División de Química y Medio Ambiente. Madrid.

"Thermo-radiosensitivity of the granulocyte and macrophage precursor cells of mice. I.- Development of the "in vivo" culture and effects induced by the hyperthermia".

BUEREN, J.A.; NIETO, M. (1983) 151 pp. 15 figs. 129 refs.

The present report shows the agar diffusion chamber technique for culturing granulocyte-macrophage precursor cells, obtained from mice bone marrow.

Diffusion chambers containing the bone marrow suspension are implanted intraperitoneally into mice and constitute a compartment which avoids the migration of cells, but allows the transit of the mouse biological fluxes, necessary for the cellular proliferation.

By means of this technique, we studied the lethal effects of the hyperthermia on the precursors and their capacity to repair sublethal damage.

J.E.N. 526

Junta de Energía Nuclear. División de Química y Medio Ambiente. Madrid

"Termo-radiosensibilidad del precursor hematopoyético que origina las series granulocítica y macrófaga de ratón. I.- Desarrollo del cultivo "in vivo" y efectos producidos por la hipotermia".

BUEREN, J.A.; NIETO, M. (1983) 151 pp. 15 figs. 129 refs.

El presente trabajo muestra la técnica de cultivo "in vivo" en cámara de difusión de agar, de los precursores granulocítico-macrófagos procedentes de la médula ósea de ratón.

Las cámaras de difusión, conteniendo una suspensión de médula ósea, se implantan intraperitonealmente en ratones hospedadores y constituyen un comportamiento que impide el tránsito celular a su través, pero que por el contrario permite el paso de los fluidos biológicos del ratón, necesarios para la proliferación celular.

Mediante esta técnica se ha podido estudiar el efecto de la hipotermia sobre la

J.E.N. 526

Junta de Energía Nuclear. División de Química y Medio Ambiente. Madrid.

"Termo-radiosensibilidad del precursor hematopoyético que origina las series granulocítica y macrófaga de ratón. I.- Desarrollo del cultivo "in vivo" y efectos producidos por la hipotermia".

BUEREN, J.A.; NIETO, M. (1983) 151 pp. 15 figs. 129 refs.

El presente trabajo muestra la técnica de cultivo "in vivo" en cámara de difusión de agar, de los precursores granulocítico-macrófagos procedentes de la médula ósea de ratón.

Las cámaras de difusión, conteniendo una suspensión de médula ósea, se implantan intraperitonealmente en ratones hospedadores y constituyen un comportamiento que impide el tránsito celular a su través, pero que por el contrario permite el paso de los fluidos biológicos del ratón, necesarios para la proliferación celular.

Mediante esta técnica se ha podido estudiar el efecto de la hipotermia sobre la

J.E.N. 526

Junta de Energía Nuclear. División de Química y Medio Ambiente. Madrid.

"Termo-radiosensibilidad del precursor hematopoyético que origina las series granulocítica y macrófaga de ratón. I.- Desarrollo del cultivo "in vivo" y efectos producidos por la hipotermia".

BUEREN, J.A.; NIETO, M. (1983) 151 pp. 15 figs. 129 refs.

El presente trabajo muestra la técnica de cultivo "in vivo" en cámara de difusión de agar, de los precursores granulocítico-macrófagos procedentes de la médula ósea de ratón.

Las cámaras de difusión, conteniendo una suspensión de médula ósea, se implantan intraperitonealmente en ratones hospedadores y constituyen un comportamiento que impide el tránsito celular a su través, pero que por el contrario permite el paso de los fluidos biológicos del ratón, necesarios para la proliferación celular.

Mediante esta técnica se ha podido estudiar el efecto de la hipotermia sobre la

J.E.N. 526

Junta de Energía Nuclear. División de Química y Medio Ambiente. Madrid.

"Termo-radiosensibilidad del precursor hematopoyético que origina las series granulocítica y macrófaga de ratón. I.- Desarrollo del cultivo "in vivo" y efectos producidos por la hipotermia".

BUEREN, J.A.; NIETO, M. (1983) 151 pp. 15 figs. 129 refs.

El presente trabajo muestra la técnica de cultivo "in vivo" en cámara de difusión de agar, de los precursores granulocítico-macrófagos procedentes de la médula ósea de ratón.

Las cámaras de difusión, conteniendo una suspensión de médula ósea, se implantan intraperitonealmente en ratones hospedadores y constituyen un comportamiento que impide el tránsito celular a su través, pero que por el contrario permite el paso de los fluidos biológicos del ratón, necesarios para la proliferación celular.

Mediante esta técnica se ha podido estudiar el efecto de la hipotermia sobre la

Integridad reproductiva de los precursores, así como la capacidad que poseen para reparar daño subletal acumulado.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la elevada termosensibilidad de estas células y la multiplicidad de blancos, que en concordancia con otros trabajos parece ser de naturaleza protéica. Por otra parte, queda expresada también la capacidad de los precursores para acumular y reparar daño subletal termoinducido.

CLASIFICACION INIS Y DESCRIPTORES: C10. Radiosensitivity. Mice. Precursor. In vivo. Hypertermia. Cell flow systems. Leukocytes. Macrophages. Bone marrow.

Integridad reproductiva de los precursores, así como la capacidad que poseen para reparar daño subletal acumulado.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la elevada termosensibilidad de estas células y la multiplicidad de blancos, que en concordancia con otros trabajos parece ser de naturaleza protéica. Por otra parte, queda expresada también la capacidad de los precursores para acumular y reparar daño subletal termoinducido.

CLASIFICACION INIS Y DESCRIPTORES: C10. Radiosensitivity. Mice. Precursor. In vivo. Hypertermia. Cell flow systems. Leukocytes. Macrophages. Bone marrow.

Integridad reproductiva de los precursores, así como la capacidad que poseen para reparar daño subletal acumulado.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la elevada termosensibilidad de estas células y la multiplicidad de blancos, que en concordancia con otros trabajos parece ser de naturaleza protéica. Por otra parte, queda expresada también la capacidad de los precursores para acumular y reparar daño subletal termoinducido.

CLASIFICACION INIS Y DESCRIPTORES: C10. Radiosensitivity. Mice. Precursor. In vivo. Hypertermia. Cell flow systems. Leukocytes. Macrophages. Bone marrow.

Integridad reproductiva de los precursores, así como la capacidad que poseen para reparar daño subletal acumulado.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la elevada termosensibilidad de estas células y la multiplicidad de blancos, que en concordancia con otros trabajos parece ser de naturaleza protéica. Por otra parte, queda expresada también la capacidad de los precursores para acumular y reparar daño subletal termoinducido.

CLASIFICACION INIS Y DESCRIPTORES: C10. Radiosensitivity. Mice. Precursor. In vivo. Hypertermia. Cell flow systems. Macrophages. Bone marrow.